

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GUILHERME PAZ MONTEIRO

**RELAÇÃO FILOGENÉTICA, VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella* spp ISOLADAS DE ALIMENTOS E
PACIENTES CLÍNICOS: INTERFACE ENTRE SEGURANÇA ALIMENTAR E
SAÚDE PÚBLICA**

**UBERLÂNDIA
2020**

GUILHERME PAZ MONTEIRO

**RELAÇÃO FILOGENÉTICA, VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella* spp ISOLADAS DE ALIMENTOS E
PACIENTES CLÍNICOS: INTERFACE ENTRE SEGURANÇA ALIMENTAR E
SAÚDE PÚBLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal
Orientadora: Prof^a. Dra. Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA
2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M775 Monteiro, Guilherme Paz, 1988-
2020 Rela o filogenética, virulência e resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* spp isoladas de alimentos e pacientes clínicos [recurso eletrônico] : Interface entre segurança alimentar e saúde pública / Guilherme Paz Monteiro. - 2020.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Coorientadora: Ana Laura Grazziotin.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, P -gradua o em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.385>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustra es.

1. Veterinária. I. Rossi, Daise Aparecida, 1963-, (Orient.). II. Grazziotin, Ana Laura, 1985-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. P -gradua o em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

| | | | | | |
|------------------------------------|---|-----------------|--------------|-----------------------|--------------|
| Programa de Pós-Graduação em: | CIÊNCIAS VETERINÁRIAS | | | | |
| Defesa de: | TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/006/2020 | | | | |
| Data: | 31 de março de 2020 | Hora de início: | 13:30 | Hora de encerramento: | 16:15 |
| Matrícula do Discente: | 11613VET007 | | | | |
| Nome do Discente: | GUILHERME PAZ MONTEIRO | | | | |
| Título do Trabalho: | RELAÇÃO FILOGENÉTICA, VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE <i>Salmonella</i> spp ISOLADAS DE ALIMENTOS E PACIENTES CLÍNICOS: INTERFACE ENTRE SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE PÚBLICA | | | | |
| Área de concentração: | SAÚDE ANIMAL | | | | |
| Linha de pesquisa: | INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA | | | | |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | EPIDEMIOLOGIA DE ZOONOSES | | | | |

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Roberta Torres de Melo - UFU; Belchiolina Beatriz Fonseca - UFU; Eliane Pereira Mendonça - UNIUBE; Dália dos Prazeres Rodrigues - FIOCRUZ; Daise Aparecida Rossi** orientadora do candidato e Presidente do Colegiado do Programa.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Daise Aparecida Rossi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daise Aparecida Rossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/03/2020, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Belcholina Beatriz Fonseca, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/03/2020, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Torres de Melo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/03/2020, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane Pereira Mendonça, Usuário Externo**, em 31/03/2020, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **DALIA DOS PRAZERES RODRIGUES, Usuário Externo**, em 13/04/2020, às 21:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1957335** e o código CRC **B2A9CC53**.

GUILHERME PAZ MONTEIRO

**RELAÇÃO FILOGENÉTICA, VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella* spp ISOLADAS DE ALIMENTOS E
PACIENTES CLÍNICOS: INTERFACE ENTRE SEGURANÇA ALIMENTAR E
SAÚDE PÚBLICA**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias da Universidade Federal
de Uberlândia, como parte dos
requisitos para a obtenção do título
de Doutor em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Saúde
Animal

Uberlândia, 31 de março de 2020

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi (Orientadora) – FAMEV-UFU

Profa. Dra. Roberta Torres de Melo – FAMEV-UFU

Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca – FAMEV-UFU

Profa. Dra. Eliane Pereira Mendonça – UNIUBE

Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues – IOC/FIOCRUZ

À minha família, pelo apoio, amor incondicional e
por sempre acreditarem no meu potencial.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

O sentimento de gratidão sempre é algo que me enche de alegria, me faz refletir e faz eu me sentir privilegiado por ter pessoas e oportunidades tão boas na minha jornada.

Primeiramente sou grato à Deus, ao Universo, ou qualquer que seja a energia que nos move, simplesmente por estar vivo, me dar a capacidade de sonhar e forças pra realizar estes sonhos.

Minha gratidão mais genuína é para minha família. Mamãe me ensinou desde criança que o estudo é primordial, que nunca é um investimento perdido e equilibrando exigências com carinho me inspirou a ser quem sou hoje. Papai, que agora me acompanha do céu, me ensinou a ser mais leve e paciente...e hoje a lembrança de saudades e sua presença ao meu lado, me ajudam a continuar sonhando. Com meus irmãos, Rodrigo e Hugo, aprendi que de diferentes personalidades e jeitos de ser, existe um elo de companheirismo e a certeza que sempre estaremos aqui uns pelos outros. Vocês são tudo na minha vida, amo vocês!

À minha cunhada Camila, pela amizade e por compartilharmos uma visão de mundo bem semelhantes. Ao meu querido sobrinho Benício, por me encher de alegria sempre que vejo, pela sinceridade no sorriso e pela mesma sinceridade em sair correndo quando ganha um dinossauro feio do titio. Amo vocês!

Ao meu namorado Thiago, agradeço por ser a pessoa mais presente na minha vida nesses quase seis anos. Meu aprendizado com você é diário...me dá conforto, conselhos e está sempre na torcida por mim. Sonhando juntos tenho certeza que iremos longe, sou grato por cada momento ao seu lado. Te amo muito!

Aos meus amigos, Pedro, Anderson, Paula e Giovanna. Conviver com vocês morando juntos ou não, é um presente na minha vida. Obrigado pela amizade de sempre, mas para mim vocês são mais que amigos...são a família que eu escolhi.

Isa e Gu, meus queridos amigos que a faculdade me deu de presente, mesmo após dez anos de formados, são presença constante na minha vida e

pessoas que posso contar. Que nossa amizade perdure sempre assim, nessa mesma intensidade.

Ao querido Wini, por ter sido um dos primeiros a me convencer a fazer o doutorado, mesmo quando eu ainda pensava que não era a hora. Hoje você mora no céu, mas sei que você está presente...guardarei sempre as boas lembranças. Obrigado também por ter me unido à Valéria, uma mãe de coração, que tem me ensinado a importância da espiritualidade e me inspira a ser alguém melhor.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de pesquisa. Eliane por compartilhar comigo este projeto, por me ajudar sempre em tudo que precisei e por ser uma amiga tão especial. À Rob, por me auxiliar nas estatísticas, por ter me ensinado muito do que sei hoje e pela amizade de longos anos. A Bia pela disposição em ajudar e conseguir parcerias na pesquisa, por ter me indicado pra oportunidades importantes, pela militância por causas importantes que muito me admira e pela amizade de sempre. Ao Phelipe, por todo auxílio sempre que precisei, pelas risadas, por deixar o ambiente de trabalho mais irreverente e por sua grande amizade. Ao Edson, por me ensinar tanta coisa de assuntos variados, por embarcar comigo e me ajudar nas fases iniciais deste projeto, admiro sua inteligência e agradeço pela sua amizade. À Fernanda por ter me ajudado na execução deste projeto, agradeço muito pela força e por saber trabalhar bem em equipe, te desejo todo sucesso. A Priscila, grande amiga que conheci no laboratório, e mesmo hoje estando distante sempre tem uma mensagem de carinho e afeto, sei de sua torcida por mim!

À equipe LABIO: Tchesca, Marcelo e Silvia, pelas várias vezes que se disponibilizaram a me ajudar, seja me salvando quando faltava algum material, ou cedendo o espaço de trabalho de vocês para meu uso. Aos demais amigos e estagiários que compartilharam essa jornada comigo no laboratório. Sou grato pela amizade de todos vocês.

À minha querida orientadora, Daisinha, que me acompanha desde a graduação. Se hoje estou aqui, muito se deve aos seus ensinamentos, conselhos, amizade e por cumprir um papel de “segunda mãe”. Sou muito grato por ter você na minha história e estarei sempre torcendo pelas suas conquistas. Você e as “filhotas” são exemplos da força das mulheres na pesquisa! São meus orgulhos!

À minha co-orientadora, Professora Ana Laura, por ter me auxiliado nas dúvidas e correções, especialmente nas partes de análise genômica, meu muito obrigado.

À Dra. Dália e a FIOCRUZ agradeço pela seleção e disponibilização das cepas utilizadas nesta pesquisa. Tenho certeza que renderá bons frutos.

Agredeço também ao Professor Vasco da UFMG e ao Rodrigo Profeta, por terem me auxiliado em toda a parte de sequenciamento genômico desta pesquisa, intermediada pela Professora Bia. Ciência se faz em conjunto, e espero ter a oportunidade de ter novas parcerias com vocês no futuro.

Obrigado a Universidade Federal de Uberlândia, por me acolher por tantos anos e ser praticamente minha segunda casa. Tenho muito orgulho desta instituição. Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, incluindo os professores pelos ensinamentos, os colegas pelo companheirismo e aos técnicos por todo o suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - código de Financiamento 001, pela bolsa de pesquisa. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) – Processo 442778/2016-3 pelo financiamento do projeto.

Finalmente, agradeço à todos os membros da banca, por se disponibilizarem a ler este trabalho e darem suas contribuições. Tenho certeza que todas serão essenciais para melhoria dos nossos resultados!

Obrigado à todos!!!

“Não precisamos de muita coisa. Só precisamos de uns dos outros...e de sonhos.”

(Oscar Wilde)

RESUMO

A salmonelose é uma das doenças transmitidas por alimentos mais prevalentes no mundo, com impacto na economia e saúde pública. Dentre os vários sorovares, destacamos *S. Typhimurium* por ser um dos mais envolvidos em surtos de origem alimentar e *S. Heidelberg* por ser um sorovar emergente associado a surtos humanos. A tese foi dividida em três capítulos. O primeiro, considerações gerais, relata os temas gerais e considerados importantes para contextualização do leitor sobre o que foi abordado nos capítulos seguintes. As cepas analisadas nos capítulos II e III foram isoladas de alimentos e pacientes humanos em diversos estados do Brasil entre 2011 e 2017, provenientes da coleção de culturas de Enteropatógenos Bacterianos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ-RJ), que também forneceu as informações sobre a sua origem. No segundo capítulo foram avaliadas 43 cepas de *S. Typhimurium* quanto a presença de genes de virulência (*sefA*, *invA*, *agfA*, *avrA*, *lpfA*, *sivH*, *hilA*, *spvC*, *sopE*) e genes associados a resistência aos antimicrobianos (*qnrS* e *qnrA* – fluoroquinolonas; *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* - β-lactâmicos) pela técnica de PCR. A concentração inibitória mínima (CIM) determinou a resistência fenotípica às classes de antimicrobianos consideradas importantes: meropenem: β lactâmicos/ carbapenêmicos; colistina: polimixinas; ciprofloxacina: fluoroquinolonas; ceftriaxona: β-lactâmicos/cefalosporinas de 3^a geração. Os resultados da PCR e CIM foram utilizados para construção de perfis de virulência e resistência. A disseminação e associação dos perfis de resistência e virulência foram discutidas após a genotipagem pela técnica do *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). No terceiro capítulo foram analisadas 36 cepas de *S. Heidelberg*, com objetivos e metodologia idênticas às do capítulo II, adicionado do sequenciamento do genoma completo de duas cepas filogeneticamente distintas realizado pelo Illumina HiSeq 2500, com o intuito de identificar o potencial virulento, de resistência, dificuldades de tratamento e risco a saúde pública.

Palavras-chave: Salmonelose. Patogenicidade. CIM. PFGE. Sequenciamento genômico completo.

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most prevalent foodborne diseases in the world, with an impact on the economy and public health. Among the various serovars, we highlight *S. Typhimurium* for being one of the most involved in food-borne outbreaks and *S. Heidelberg* for being an emerging serovar associated with human outbreaks. The thesis was divided into three chapters. The first, general considerations, reports the general themes considered important for the reader's contextualization of what was discussed in the following chapters. The strains analyzed in chapters II and III were isolated from food and human patients in several states of Brazil, between 2011 and 2017, from the collection of Bacterial Enteropathogens cultures of the Oswaldo Cruz Institute (IOC / FIOCRUZ-RJ), which also provided the information about its origin. In the second chapter, 43 strains of *S. Typhimurium* were evaluated for the presence of virulence genes (*sefA*, *invA*, *agfA*, *avrA*, *lpfA*, *sivH*, *hilA*, *spvC*, *sopE*) and genes associated with antimicrobial resistance (*qnrS* and *qnrA* - fluoroquinolones; *bla_{TEM}* and *bla_{SHV}* - β -lactams) by the PCR technique. The minimum inhibitory concentration (MIC) determined the phenotypic resistance to the classes of antimicrobials considered important: meropenem: β lactam / carbapenem; colistin: polymyxins; ciprofloxacin: fluoroquinolones; ceftriaxone: β -lactams / 3rd generation cephalosporins. The PCR and CIM results were used to build virulence and resistance profiles. The dissemination and association of resistance and virulence profiles were discussed after genotyping using the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique. In the third chapter, 36 strains of *S. Heidelberg* were analyzed, with objectives and methodology identical to those of chapter II, added by the sequencing of the complete genome of two phylogenetically distinct strains carried out by Illumina HiSeq 2500, in order to identify the virulent, resistance potential, treatment difficulties and public health risk.

Keywords: Salmonellosis. Pathogenicity. CIM. PFGE. Whole Genomic Sequencing.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 2

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1. | Genes e funções, condições de amplificação, tamanho do amplicon e referências utilizadas na avaliação de <i>S. Typhimurium</i> . | 56 |
| Tabela 2. | Perfis de virulência de <i>S. Typhimurium</i> isoladas de alimentos e humanos no Brasil entre 2011 e 2017 | 59 |
| Tabela 3. | Distribuição da CIM e percentuais de resistência e resistência intermediária em cepas de <i>Salmonella Typhimurium</i> isoladas de amostras de alimentos e humanos no Brasil de entre 2011 e 2017. | 62 |
| Tabela 4. | Perfis de resistência aos antimicrobianos em <i>S. Typhimurium</i> isoladas de alimentos e humanos no Brasil entre 2011 a 2017. | 63 |
| S1 Tabela | Identificação e dados do isolamento das cepas de <i>Salmonella Typhimurium</i> provenientes de alimentos e indivíduos infectados no Brasil, no período de 2011 a 2017. | 75 |

CAPÍTULO 3

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1. | Peso molecular (pb), fator de virulência, sequência dos <i>primers</i> , protocolo de amplificação e referências utilizadas para identificação de genes de virulência em SH. | 85 |
| Tabela 2. | Peso molecular (pb), classe de antimicrobianos, sequência dos <i>primers</i> , protocolo de amplificação e referências utilizadas para identificação de Genes de resistência em SH. | 86 |

| | | |
|------------------|---|-----|
| Tabela 3. | Perfil gênico de virulência de <i>S. Heidelberg</i> isoladas de alimentos e humanos no Brasil de 2011 a 2017. | 80 |
| Tabela 4. | Distribuição da CIM e da resistência aos antimicrobianos em <i>S. Heidelberg</i> isoladas de alimentos e humanos isoladas no Brasil, 2011 a 2017. | 92 |
| Tabela 5. | Perfis de resistência aos antimicrobianos de <i>S. Heidelberg</i> isoladas de alimentos e humanos no Brasil entre 2011 a 2017. | 93 |
| Tabela A1 | Identificação e dados do isolamento das cepas de <i>Salmonella</i> Heidelberg isoladas de alimentos e indivíduos infectados no Brasil, no período de 2011 a 2017. | 111 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

S2 Figura. Dendrograma com padrões de DNA produtos do PFGE de 73 isolados provenientes de amostras humanas e de alimentos de *S. Typhimurium*. A análise pelo método de Dice/UPGMA (tolerância de 0,5%, otimização de 0,5%, similaridade > 80%).

CAPÍTULO 3

Figura A1. Dendrograma dos perfis de DNA de linhagens humanas e 113 de alimentos de *S. Heidelberg*, baseado na eletroforese em campo pulsado (PFGE). A análise pelo método de Dice/UPGMA (tolerância de 0,5%, otimização de 0,5%, similaridade > 80%

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA: Associação Brasileira de Produção Animal

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: American Type Culture Collection

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CFT: Ceftriaxona

CIDRP: Center for Infectious Disease Research and Policy

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CIP: Ciprofloxacina

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

COL: Colistina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

EFSA: European Food Safety Authority

ESBL: Betalactamase de espectro estendido

EUA: Estados Unidos da América

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FIOCRUZ: Fundação Instituto Oswaldo Cruz

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

OMS: Organização Mundial da Saúde

PB: Pares de Base

PCR: Polymerase Chain Reaction

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed

UE: União Europeia

WHO: World Health Organization

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUILHERME PAZ MONTEIRO - Nascido em Catalão, Estado de Goiás, em 01 de dezembro de 1988, filho de Ronaldo Antônio Monteiro e Aparecida Maria da Paz Monteiro. Biólogo, graduado em agosto de 2010 pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Em 2011, iniciou o mestrado na mesma instituição, no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (UFU), concluído em agosto de 2013. Em 2016, iniciou o doutorado no mesmo programa de pós-graduação. Atuou como Biólogo na Fundação de Desenvolvimento Agropecuário entre 2011 e 2016. Tem experiência nas seguintes áreas: microbiologia, patógenos de origem alimentar, biologia molecular e saúde pública.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo Geral | 17 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 17 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 3.1 Taxonomia e nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i> | 18 |
| 3.2 Características gerais do gênero <i>Salmonella</i> | 20 |
| 3.3 Características e dados epidemiológicos do gênero <i>Salmonella</i> | 20 |
| 3.4 Sintomatologia e prevenção de salmonelose em humanos | 23 |
| 3.5 <i>Salmonella</i> e cadeia produtiva avícola | 25 |
| 3.6 <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Heidelberg</i> : implicações na avicultura e saúde pública | 28 |
| 3.7 Gênero <i>Salmonella</i> e resistência aos antimicrobianos | 29 |
| 3.7.1 β -lactâmicos | 31 |
| 3.7.2 Quinolonas e fluoroquinolonas | 32 |
| 3.7.3 Polimixinas | 34 |
| 3.7.4 Fosfomicinas | 36 |
| 3.7.5 <i>Salmonella</i> multirresistentes | 37 |
| 3.7.6 Marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos em <i>Salmonella</i> | 38 |
| 3.8 Virulência | 40 |
| 3.9 Similaridade genética de <i>Salmonella</i> spp | 44 |
| CAPÍTULO 2 – Potencial virulento, susceptibilidade aos antimicrobianos e a relação filogenética de <i>Salmonella</i> Typhimurium isoladas de alimentos e humanos no Brasil. | 48 |
| CAPÍTULO 3 – <i>Salmonella</i> Heidelberg isoladas de alimentos e pacientes humanos no Brasil: perigo potencial a saúde pública? | 78 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 114 |
| REFERÊNCIAS | 115 |
| ANEXOS | 127 |
| 1 Normas do periódico Current Microbiology - Capítulo 2 | 128 |
| 2 Normas do periódico Food Control - Capítulo 3 | 142 |

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 1 INTRODUÇÃO

3 *Salmonella* é um dos patógenos mais envolvidos em infecções
4 alimentares humanas em todo o mundo, destacando-se dentre os demais
5 micro-organismos responsáveis por doenças transmitidas pelos alimentos
6 devido à alta prevalência e consequências na saúde pública e na economia
7 (WHO, 2020).

8 A gravidade da salmonelose humana está relacionada a relação
9 hospedeiro-parasita. Características do hospedeiro como idade, genética,
10 doenças crônicas pré-existentes, comprometimento do sistema imune, entre
11 outros, são complicadores e diretamente proporcionais à gravidade da doença
12 (MENDONÇA, 2016). Por outro lado, as características do patógeno, como
13 resistência aos antimicrobianos, capacidade de invasão, produção de fímbrias,
14 codificação de proteínas efetoras, formação de biofilmes e muitas outras, estão
15 relacionadas aos danos ao hospedeiro, assim como, na sua manutenção no
16 ambiente, e consequentemente, na maior possibilidade de infectar um
17 hospedeiro suscetível (SILVA, 2019).

18 Em países com vigilância epidemiológica ativa, os sorovares mais
19 prevalentes na salmonelose humana são *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (CDC,
20 2018; EFSA, 2019). Esses sorovares também são frequentemente destacados
21 em diferentes programas de controle de diferentes países, inclusive o Brasil
22 (BRASIL, 2016a; WHO, 2018). Porém, outros sorovares tem ganhado atenção
23 por sua frequência ou virulência, como *S. Heidelberg*. Esse sorovar tem
24 despontado em relação os demais pelo crescente envolvimento em infecções
25 humanas e surtos de origem alimentar, onde tem demonstrado caráter de
26 multirresistência aos antimicrobianos e cepas mais invasivas que causam
27 complicações nos quadros clínicos em pacientes humanos (NAKAO et al,
28 2018).

29 No Brasil, *S. Heidelberg* tem sido considerado um sorovar emergente
30 pelo aumento no número de isolamentos, especialmente na cadeia de
31 produção de aves (WEBBER et al, 2019). O mesmo tem sido observado nos
32 Estados Unidos (CDC, 2013a) e Canadá (CHITTICK et al., 2006). Isso refletiu em
33 aumento no número de notificações emitidas pelo RASFF por países
34 importadores (RASFF, 2019).

35 A prevenção da salmonelose humana não é uma tarefa fácil quando se
36 considera que os principais desafios estão associados a complexidade
37 epidemiológica de *Salmonella* spp. Esse micro-organismo possui múltiplas
38 formas de infectar os animais e são inúmeras as possibilidades de
39 contaminação das carcaças durante o abate (MENDONÇA et al., 2019). Além
40 disso, possui caráter zoonótico, estando associado a diversos hospedeiros,
41 (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2019), e ainda, possui inúmeros sorotipos (LAMAS
42 et al., 2018) que se diferem quanto a patogenicidade, resistência aos agentes
43 antimicrobianos e adaptação ambiental (CHENG, EADE e WIEDMANN, 2019).

44 Em muitos países, incluindo o Brasil, não é usual a identificação e
45 caracterização de *Salmonella* isoladas de alimentos, sendo suficiente sua
46 presença em 25g para a condenação do alimento. Apesar disso, devido às
47 características do gênero, é desejável o monitoramento constante e avaliação
48 conjunta de cepas isoladas de alimentos e humanos infectados. Conhecer as
49 cepas circulantes, seu potencial virulento e de resistência aos antimicrobianos,
50 e também a disseminação de fenótipos e genótipos específicos pode auxiliar
51 no entendimento das rotas de disseminação, formas de transmissão e origem
52 das infecções. Todas essas informações servem como subsídio para
53 implementação de estratégias de controle, definir sorovares prioritários no
54 monitoramento, assim como, avaliar as possibilidades de tratamento das
55 infecções graves em humanos.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69 **2. OBJETIVOS**

70

71 **2.1. GERAL**

72 Determinar em *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium* isoladas de amostras de
73 alimentos e de pacientes com quadro de salmonelose a presença de genes de
74 virulência e de resistência, a susceptibilidade aos antimicrobianos e a
75 similaridade genética entre as cepas.

76

77 **2.1. ESPECÍFICOS**

78 Avaliar em *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*:

79 - a susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de concentração
80 inibitória mínima (CIM);

81 - os dados fenotípicos da CIM e agrupar as cepas em perfis de
82 resistência/multirresistência;

83 - a presença de genes associados à resistência aos antimicrobianos:
84 *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* (classe dos betalactâmicos) e *qnrS* e *qnrA* (classe das
85 fluorquinolonas), utilizando a técnica de PCR;

86 - a correlação dos resultados fenotípicos e genotípicos de resistência
87 antimicrobiana para discussão dos possíveis mecanismos de resistência.

88 - a presença de genes associados à virulência: *agfA*, *avrA*, *lpfA*, *invA*,
89 *sefA*, *hilA*, *sopE*, *sivH* e *spvC* pela técnica de PCR;

90 - os dados da PCR para criar perfis de patogenicidade;

91 - a similaridade genética pela técnica de *Pulsed Field Gel*
92 *Electrophoresis* (PFGE);

93 - a sequência genômica completa de duas cepas de *S. Heidelberg*,
94 geneticamente distintas, para verificar a correlação entre características
95 fenotípicas e genotípicas e elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na
96 casos resistência aos antimicrobianos;

97 - Discutir para cada sorovar os perigos que representam para saúde
98 pública.

99

100 **3 REVISÃO DE LITERATURA**

101

102 **3.1 Taxonomia e nomenclatura do gênero *Salmonella***

103

104 O gênero *Salmonella* recebeu essa denominação em homenagem ao
105 pesquisador Dr. Daniel Elmer Salmon. O primeiro isolamento foi realizado por
106 seu assistente de pesquisa, Theobald Smith, no ano de 1855, de amostras
107 intestinais de suínos doentes, sendo identificada como *Salmonella*
108 *Choleraesuis*. Desde então, já foram identificados mais de 2600 mil subtipos
109 pertencentes a este gênero (ENG et al., 2015). O gênero possui duas espécies,
110 *S. bongori* e *S. enterica*; e este último agrupa seis outras subespécies
111 (TANNER e KINGSLEY, 2018).

112 O sistema de classificação do gênero *Salmonella* mais difundido na
113 literatura é o proposto pela *World Health Organization* (WHO), que se baseia
114 nas diferenças sequenciais da região 16S dos ribossomos. Este sistema é
115 utilizado inclusive por órgãos de referência como o *Centers for Disease Control*
116 and *Prevention* (CDC, 2018).

117 O nome dado aos sorovares de *Salmonella* normalmente está associado
118 à espécie do hospedeiro que acomete, o local de isolamento ou o tipo de
119 síndrome que causa. Devido à variedade de sorovares, a nomenclatura em
120 *Salmonella* sempre foi controversa e passou por diversas mudanças, tanto na
121 classificação quanto na grafia (FARIA, 2013).

122 Em literatura mais antiga é possível encontrar sorotipos de *Salmonella*
123 grafados em itálico e com a letra inicial minúscula, divergindo da forma utilizada
124 em outras espécies, que normalmente são identificadas pela fórmula antigênica
125 (GRIMONT & WEILL, 2007). Posteriormente, foi adotada uma nomenclatura
126 específica para o gênero, utilizada até os dias de hoje, com o gênero grafado
127 em itálico seguido do nome do sorotipo em maiúsculo, o qual não deve ser
128 grafado em itálico (FARIA, 2013).

129 O sistema de sorotipagem proposto por Kauffmann-White é o exemplo
130 mais utilizado para este tipo de classificação e é baseado nas diferenças
131 estruturais antigênicas presentes na superfície celular, como os antígenos

132 somáticos, flagelares e capsulares representados respectivamente pelas letras
133 “O”, “H” e “Vi” (RYAN, O'DWYER e ADLEY, 2017).

134 A sorotipagem pode ser realizada considerando todas as estruturas
135 antigênicas, no entanto, para facilitar a coleta de dados epidemiológicos é
136 comum utilizar reações mais simples e rápidas, específicas para o antígeno O,
137 possibilitando a separação das estirpes em seis diferentes sorogrupos: A, B,
138 C1, C2, D e E (ENG et al., 2015).

139 Dessa forma, o antígeno O é capaz de determinar o grupo ao qual o
140 isolado pertence, enquanto o antígeno H determina o sorovar, já o antígeno
141 capsular ocorre apenas em *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e em *S. Dublin* (RYAN,
142 O'DWYER e ADLEY, 2017).

143 O antígeno O é um polissacarídeo termoestável presente na superfície
144 do lipopolissacarídeo e pode expressar mais de um tipo no mesmo sorotipo.
145 Cada antígeno O é composto por 5-6 unidades de açúcar e qualquer variação
146 nas unidades de açúcar, nas ligações covalentes ou entre subunidades do
147 antígeno, resultam em diferentes antígenos O. A identificação é realizada em
148 duas etapas. Primeiramente, o isolado é testado usando soros de agrupamento
149 O por aglutinação em lâmina. Uma vez identificado o grupo O, os testes são
150 realizados com antissoros específicos que reagem com antígenos individuais
151 (HU e KOPECKO, 2003).

152 Os antígenos H são compostos de subunidades da flagelina e são a
153 porção filamentosa dos flagelos bacterianos, responsáveis por estimular o
154 desencadeamento do sistema imune no hospedeiro. Quando os sorovares de
155 *Salmonella* expressam um tipo de antígeno H, são chamados de monofásicos e
156 quando expressam dois tipos, são chamados difásicos. Ambas as fases podem
157 ser detectadas em uma população, mas acredita-se que células individuais de
158 isolados difásicos expressem apenas o antígeno H de uma fase por vez. Os
159 isolados de *Salmonella* são testados primeiro com antissoros de tipagem H que
160 reconhecem múltiplos antígenos e depois com antissoros de fator único H que
161 identificam antígenos específicos (RYAN, O'DWYER e ADLEY, 2017).

162 O antígeno capsular Vi é um subtipo dos antígenos capsulares K, mais
163 comumente encontrado em *S. Typhi*, mas também é ocasionalmente
164 identificado em *S. Dublin*, *S. Paratyphi C* e algumas cepas de *Citrobacter*. A

165 identificação é realizada por aglutinação de lâminas com antissoros específicos
166 (MOORE et al., 2019).

167

168 **3.2 Características gerais do gênero *Salmonella***

169

170 O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, possui
171 morfologia de bastonetes Gram-negativos, é anaeróbio facultativo e não
172 formador de esporos. A grande maioria dos sorovares possui mobilidade por
173 apresentar flagelos peritríticos, exceto os patógenos avícolas, *S. enterica*
174 sorovares *Pullorum* e *Gallinarum* (WHO, 2018).

175 *Salmonella* está amplamente distribuída no ambiente e pode causar uma
176 variedade de doenças em humanos e animais. São micro-organismos
177 intracelulares facultativos e podem se multiplicar e sobreviver no interior de
178 fagócitos. Nos humanos, a infecção por *Salmonella* pode causar doenças
179 diferentes, como febre tifóide, septicemia, infecções localizadas de vários
180 tecidos corporais e gastroenterite (CDC, 2018).

181 A temperatura ideal de crescimento das salmonelas é de 37°C; no
182 entanto, podem crescer em maior amplitude de temperatura, variando de 4-
183 54°C. Quanto a amplitude do pH, podem sobreviver entre 3,8 a 9,5, com faixa
184 de pH ótimo entre 6,5 a 7,5 e necessitam de atividade de água (Aw) mínima de
185 0,94 (ADLEY e RYAN, 2016).

186 As características bioquímicas usadas para identificação fenotípica de
187 *Salmonella* incluem a produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), ausência de
188 produção de indol, redução de nitratos a nitritos, descarboxilação da lisina e
189 ornitina, não hidrolisar a uréia, utilizar o citrato como fonte de carbono, produzir
190 gás pela fermentação da glicose, não fermentar a lactose e sacarose,
191 positividade para os testes de catalase e vermelho de metila e negativa para os
192 testes de oxidase, urease e fenilalanina (ATIKUR et al., 2019).

193

194 **. 3.3 Características e dados epidemiológicos do gênero *Salmonella***

195

196 A salmonelose é uma das principais causas de gastroenterite bacteriana
197 em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto nos países em
198 desenvolvimento. Isso se deve ao fato de *Salmonella* spp ser bastante

199 disseminada no ambiente, sendo considerado um micro-organismo ubíquo
200 (CDC, 2018).

201 *Salmonella* spp. está presente principalmente no trato intestinal de
202 animais de sangue quente, como aves, suínos e bovinos, mas também pode
203 ser encontrada em répteis e invertebrados. Na natureza, as principais fontes de
204 contaminação são a água, as fezes de animais, o solo, além de insetos e
205 roedores que ajudam na disseminação deste patógeno (EFSA, 2017; BRASIL,
206 2018).

207 Muitas vezes os animais destinados para a produção de alimentos
208 atuam como hospedeiros assintomáticos deste agente, e dessa forma, as
209 carcaças acabam passando ilesas pelo crivo da fiscalização e pelo controle de
210 qualidade, dificultando seu controle na indústria alimentícia e aumentando as
211 chances para a infecção humana (SOUZA, 2015; BRASIL, 2018). Essas
212 características somadas à variedade de sorotipos e sua alternância fazem com
213 que o controle de *Salmonella* spp. seja muito difícil e favorecem para que o
214 agente se mantenha como um dos mais associados as doenças transmitidas
215 pelos alimentos (DTAs) com impacto na saúde pública (WHO, 2018).

216 A maioria dos sorovares pode acometer espécies variadas, uma vez que
217 não dependem da especificidade para colonização de um hospedeiro. Por
218 outro lado, existem sorovares que são espécie-específicos, ou seja, possuem
219 preferência pela colonização de uma determinada espécie. Sorovares
220 hospedeiro-específicos, como por exemplo, *S. Gallinarum*, são responsáveis
221 por doenças sistêmicas mais graves em seu hospedeiro primário, as aves,
222 enquanto os sorovares com faixas de hospedeiros mais amplas, como *S.*
223 *Typhimurium* e *S. Enteritidis* são frequentemente restritos a doenças
224 gastrointestinais em seus diferentes hospedeiros (LUPOLOVA et al., 2017).

225 Durante o processo evolutivo de cada sorovar há acúmulo de mutações,
226 que muitas vezes selecionam cepas que acabam por desenvolver mecanismos
227 singulares para infecção de um hospedeiro específico (JAJERE, 2019). Dentre
228 eles, podemos citar como sorovares espécie-específicos *S. Pullorum* para as
229 aves, *S. Dublin* em bovinos, *S. Cholerasuis* em suínos e *S. Typhi* e *Paratyphi*
230 em humanos. A infecção de humanos por sorovares específicos para outras
231 espécies normalmente podem levar a complicações, uma vez que essas

232 estirpes podem ser altamente invasivas, e em casos mais graves, pode levar a
233 óbito (NAKAO et al., 2018).

234 A salmonelose é uma das principais DTAs em todo o mundo, e órgãos
235 de vigilância como o CDC e a *European Food Safety Authority* (EFSA)
236 destacam a carne e ovos de aves e seus derivados como os principais grupos
237 de alimentos que veiculam a doença. Também há envolvimento frequente de
238 alimentos a base de carnes bovina e suína, leite e água contaminados (EFSA,
239 2017; CDC, 2018).

240 Tanto nos EUA quanto na Europa os órgãos de vigilância são muito
241 ativos, se preocupando com a identificação do patógeno envolvido e fazer as
242 notificações, para que os dados epidemiológicos ajudem na rastreabilidade e
243 na identificação de possíveis surtos. No Brasil, apesar de se ter órgãos de
244 vigilância sanitária, a identificação e a subnotificação ainda é uma realidade,
245 sendo que muitos casos são registrados sem a identificação do agente
246 envolvido, o que dificulta a coleta de dados epidemiológicos oficiais. Portanto, a
247 real incidência do envolvimento de *Salmonella* spp. nos casos de infecção
248 alimentar é desconhecido (RODRIGUES, 2016).

249 Apesar da identificação dos patógenos e das notificações serem
250 carentes no Brasil, o Ministério da Saúde (MS) reportou em 2016 a
251 identificação de *Salmonella* spp. em 90% dos casos de DTAs que ocorreram
252 entre 2007 a 2016, nas quais houve a identificação do patógeno (BRASIL,
253 2016b). Em 2018, o MS divulgou um novo boletim epidemiológico, afirmado
254 que entre 2000 a 2017, as regiões mais prevalentes em relação a surtos
255 causados por DTAs foram Sudeste, Sul e Nordeste respectivamente. No total,
256 12.503 surtos foram notificados no país, sendo que apenas em 2.593 deles
257 houve identificação do patógeno, e dentre eles *Salmonella* spp. esteve
258 envolvida em pouco mais de 30% (BRASIL, 2018).

259 Estima-se que se todos os surtos fossem notificados e os agentes
260 etiológicos identificados, os números seriam bem superiores. Por isso, estudos
261 científicos de prevalência são essenciais e agregam informações importantes
262 sobre a epidemiologia de *Salmonella* e outros micro-organismos no Brasil.

263 Nos Estados Unidos, a Rede de Vigilância Ativa de Doenças
264 Transmitidas por Alimentos (FoodNet) do Programa de Infecções Emergentes
265 do CDC monitora casos de infecção diagnosticada em laboratório causada por

266 patógenos transmitidos comumente por alimentos. Um relatório parcial,
267 referente aos dados de 2018, demonstrou que a incidência da maioria das
268 infecções está aumentando quando comparadas ao ano de 2015, incluindo as
269 causadas por *Campylobacter* e *Salmonella*. Em 2018, a FoodNet identificou
270 25.606 casos de infecção de origem alimentar que resultaram em 5.893
271 hospitalizações e 120 mortes. A incidência de infecção (por 100.000
272 habitantes) foi mais alta para *Campylobacter* (19,5%) seguida por *Salmonella*
273 (18,3%). Dentre os isolados de *Salmonella* sorotipados, os três sorotipos mais
274 comuns foram Enteritidis, Newport e Typhimurium respectivamente (TACK et
275 al., 2019).

276 A nível global, os sorovares Typhimurium e Enteritidis são os mais
277 envolvidos em surtos de origem alimentar (CDC, 2018). No Brasil, *S.*
278 Typhimurium tem sido reportado como o principal sorovar isolado de infecções
279 sistêmicas em humanos e *S. Enteritidis* está mais relacionada a surtos
280 alimentares (REIS et al., 2018).

281 Apesar da maior incidência de *S.Typhimurium* e *S. Enteritidis*, a
282 emergência de sorovares de *Salmonella* é dinâmica e passa por alterações
283 frequentes. O sorovar Heidelberg, por exemplo, tem se destacado tanto pelo
284 alto número de isolamento em alimentos, especialmente a carne de frango,
285 quanto pelo seu envolvimento em infecções humanas (NAKAO et al., 2018).
286 Em 2019, o sistema de alerta europeu (RASFF) relatou alta incidência de *S.*
287 Heidelberg identificados nos produtos avícolas importados do Brasil, resultando
288 em mais de 100 notificações (RASFF, 2019).

289

290

291 **3.4 Sintomatologia e prevenção de salmonelose em humanos**

292

293 Os sintomas clássicos de salmonelose humana são gastroenterite
294 acompanhada de náuseas, cólicas abdominais, febre e algumas vezes podem
295 ocorrer vômitos (WHO, 2018). Baptista e colaboradores (2018) identificaram
296 em seu estudo, pacientes que apresentavam sintomas menos comuns, como
297 dores nas articulações, que foram diagnosticadas como artrite reativa. Essa
298 manifestação é de difícil tratamento, e muitas vezes torna-se um sintoma

299 crônico que pode levar de meses a anos para desaparecer (BAPTISTA et al.,
300 2018).

301 O período de incubação de *Salmonella* pode variar entre 6 e 72 horas,
302 com média de 12 a 36 horas para manifestação dos primeiros sintomas, que
303 podem durar até sete dias (EFSA, 2017). Entretanto, tanto o tempo de
304 incubação quanto a gravidade da infecção dependem de diversos fatores
305 relacionados tanto ao hospedeiro quanto ao micro-organismo. Crianças,
306 idosos, gestantes e pacientes com o sistema imune comprometido são mais
307 susceptíveis a salmonelose com quadro clínico mais complicado. O potencial
308 virulento da cepa, seu poder de invasão, de resistência aos antimicrobianos e
309 sua dose infectante também influenciam na gravidade da doença (CDC, 2018).

310 Normalmente a infecção por *Salmonella* é autolimitante sem
311 necessidade de antibioticoterapia. Entretanto, alguns casos podem evoluir e
312 gerar complicações como a desidratação, sendo indicada a hospitalização. Em
313 casos mais graves, a bactéria pode ser carreada para outros órgãos e causar
314 septicemia. Nestes, é primordial que haja um tratamento adequado e rápido,
315 com a administração de antibióticos, pois caso contrário pode levar a morte
316 (WHO, 2015).

317 A rota de infecção normalmente é via oral, pela ingestão de alimentos
318 contaminados. Em seguida, *Salmonella* inicia o processo de adesão na mucosa
319 intestinal e se aloja junto às células M e enterócitos absorтивos, mantendo uma
320 infecção localizada com quadro comum de gastroenterite. Entretanto, quando
321 consegue invadir os fagócitos, se multiplica intracelularmente e chega ao baço
322 e ao fígado, onde pode evoluir para septicemia, e em alguns casos ocasionar o
323 óbito (YUKI et al., 2019).

324 A prevenção da salmonelose consiste numa série de medidas de
325 controle que devem ser aplicadas do campo à mesa, ou seja, no ambiente de
326 produção agrícola, nas indústrias alimentícias, no transporte, acondicionamento
327 e manipulação dos produtos de origem animal, bem como nas cozinhas
328 industriais e residenciais. Em todas essas etapas, a higienização adequada do
329 ambiente, das instalações e fômites é mandatória para o controle do patógeno,
330 cabendo ao consumidor continuar as práticas de higienização na residência e
331 realizar o preparo/cozimento adequado do alimento (CDC, 2018).

332

333 **3.5 *Salmonella* e cadeia produtiva avícola**

334 O Brasil, frente aos outros países, se destaca quanto à produção
335 avícola. No ranking de maiores exportadores da carne de frango, ocupa o
336 primeiro lugar desde 2008 e o segundo lugar na lista de maiores produtores.
337 Aproximadamente um terço da carne de frango que o Brasil produz é exportada
338 a países como os da União Europeia, Arábia Saudita, Japão, Rússia, dentre
339 outros (ABPA, 2018).

340 O mercado avícola brasileiro atingiu esse patamar devido aos
341 investimentos e implementações de novas tecnologias na área. Essa
342 atualização foi essencial para impulsionar a capacidade produtiva, no entanto,
343 junto a isso, houve um aumento expressivo no tamanho dos lotes das aves, o
344 que facilitou a permanência e a transmissão de micro-organismos patogênicos
345 dentro das unidades produtivas e, por consequência, por todas as etapas
346 posteriores de produção e processamento das carcaças. Em compensação, a
347 gestão e o controle de qualidade se tornaram mais rigorosos ao aplicarem
348 mecanismos para prevenir e controlar, cujo foco é a certificação da qualidade
349 do que é produzido, investindo em medidas protetivas contra doenças que
350 possam afetar as aves e garantindo a inocuidade da carne aos seus
351 consumidores, além de considerar as exigências dos mercados importadores
352 (ABPA, 2016).

353 Em 2003, a fim de manter o país como um dos maiores produtores, o
354 governo brasileiro instituiu o Programa Nacional de Redução de Patógenos. A
355 adoção dessa medida possuiu como objetivo monitorar e controlar *Salmonella*
356 spp em frangos, galinhas e perus de corte e reprodução (BRASIL, 2003). Mais
357 tarde em 2016, o Ministério da Agricultura publicou a Instrução Normativa de
358 número 20, vigente até os dias de hoje, como atualização para as medidas de
359 controle de *Salmonella* spp em amostras avícolas a fim de reduzir a prevalência
360 desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor
361 (BRASIL, 2016a).

362 Como a *Salmonella* tem as aves como seu hospedeiro preferencial,
363 pode-se inferir que esse micro-organismo é fortemente vinculado ao sistema de
364 produção e, desse modo, se dispersar sem muitas dificuldades ao longo da
365 cadeia produtiva de aves, da granja à indústria. É de suma importância, em

366 vista disso, encontrar os pontos críticos de controle a fim de impedir a
367 permanência e perpetuação de *Salmonella* em ambientes de produção e nos
368 alimentos (BRASIL, 2018; ETTER et al., 2019).

369 Durante a criação de aves, a *Salmonella* é capaz de se disseminar de
370 duas formas: horizontal ou verticalmente. A transmissão horizontal, que é a
371 transmissão do agente patogênico de um indivíduo a outro, acontece em todos
372 os sorotipos devido a adaptabilidade desse micro-organismo às diversas
373 condições ambientais. A disseminação pode ocorrer do contato direto entre as
374 aves, já que a *Salmonella* é eliminada nas fezes. Além disso, pode ocorrer a
375 disseminação indireta, envolvendo veículos intermediários, como por exemplo
376 fômites e biofilmes. Esse tipo de disseminação pode acontecer, por exemplo,
377 por meio de roedores assintomáticos e alguns organismos invertebrados que
378 transportam esses micro-organismos para bebedouros e comedouros, assim
379 como outras diversas áreas. Por consequência, ocorre contaminação da ração
380 e da água e *Salmonella* coloniza o trato alimentar de outras aves via fecal-oral
381 (BONI; CARRIJO; FASCINA, 2011; BRASIL, 2018).

382 Depois de surtos de salmonelose ligados ao consumo de ovos crus ou
383 mal cozidos, foi identificada a transmissão vertical ou transovariana de
384 *Salmonella*, que é o modo de transmissão de uma geração à próxima por meio
385 da infecção do embrião ou do feto enquanto está no ovo. Os sorovares
386 relatados foram *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Virchow* e *S.*
387 *Heidelberg* (WHITE, FEDORKA-CRAY, CHILLER, 2006; MICHAELIDIS;
388 THEODORIDIS; AVDI, 2011; OLORUNSOLA et al., 2012).

389 Falhas nos cuidados higiênico-sanitários em processamento de
390 alimentos de origem animal implicam em perdas financeiras de milhões de
391 dólares à indústria alimentar. Esse prejuízo está relacionado ao não
392 atendimento dos padrões nacionais, mas de modo especial, por restringir a
393 exportação desses alimentos a determinados países estrangeiros que possuem
394 diretrizes que estabelecem um elevado padrão de qualidade aos alimentos a
395 serem importados (EFSA, 2019).

396 Na indústria, pode ocorrer a contaminação da carcaça ao decorrer do
397 abate das aves. Nesse ambiente, há manutenção e dispersão das estirpes
398 principalmente nos pontos críticos de processamento. No entanto, vale
399 destacar que a detecção de cepas na indústria está relacionada às condições

400 que as aves apresentam no momento do abate, ou seja, geralmente reflete a
401 intensidade de contaminação das instalações de produção e outras condições
402 de manejo (MOORE et al., 2019).

403 Estudos comprovam que a privação de alimentos prolongada anterior ao
404 abate modifica o pH intestinal das aves e propicia o crescimento microbiano.
405 Dentre esses micro-organismos que se multiplicam, pode-se citar as bactérias
406 do gênero *Salmonella*, que se propagam e contaminam as instalações e
407 equipamentos da indústria no momento do abate caso ocorra ruptura das alças
408 intestinais durante a evisceração. Dessa maneira, quando o patógeno alcança
409 outros pontos dentro do frigorífico, há risco de ocorrer contaminação cruzada,
410 que é a transferência accidental do contaminante, direta ou indiretamente, a
411 outros alimentos, por meio, por exemplo, do manipulador, das instalações e
412 dos utensílios usados no processamento. Essa situação pode-se exacerbar se
413 as estirpes possuírem potencial para formar biofilmes, que promoverão
414 constante contaminação na indústria e favorecerão a manutenção do micro-
415 organismo no ambiente (PARRA-SUESCUN, AGUDELO-TRUJILLO e LOPEZ-
416 HERRERA, 2015; MELO et al., 2017).

417 Há um grande empenho para se controlar *Salmonella* na produção
418 avícola, já que a presença desse micro-organismo nas granjas, nos frigoríficos
419 ou nos alimentos disponíveis ao consumidor leva a deletérios e significativos
420 prejuízos econômicos e à saúde humana. A positividade nas granjas pode ser
421 causa de perdas zootécnicas ou mortalidade de lotes e embargos sanitários
422 instituídos por países que importam a carne de frango brasileira. Somado a
423 isso, há o efeito na saúde pública gerado por casos de salmonelose contraída
424 por consumo de alimentos contaminados (BRASIL, 2016a).

425 Vários países importadores de produtos de origem animal brasileiros
426 possuem órgãos e legislações que monitoram e controlam a qualidade dos
427 alimentos importados. A União Europeia, como exemplo, faz o uso do RASFF,
428 *Rapid Alert System for Food and Feed*, um sistema de vigilância que identifica
429 e alerta a detecção de patógenos que ofereçam riscos à saúde pública. Assim,
430 para que não ocorram efeitos negativos causados por restrições sanitárias às
431 exportações brasileiras é de suma importância adotar medidas de
432 monitoramento, prevenção e controle deste micro-organismo patogênico
433 (RASFF, 2019; EFSA, 2019).

434

435 **3.6 S. Typhimurium e S. Heidelberg: implicações na avicultura e saúde**
436 **pública**

437

438 O termo salmonelose aviária corresponde a diferentes patologias
439 causadas por sorovares do gênero *Salmonella*. Dentre elas, o paratifo aviário
440 que é uma doença provocada por qualquer sorovar de *Salmonella*, exceto
441 *Gallinarum* e *Pullorum* que causam, nessa ordem, tifo aviário e pulorose. *S.*
442 *Typhimurium* é um dos principais sorovares que causam o paratifo aviário, mas
443 possui também grande importância em infecções alimentares humanas. Aves
444 jovens têm maior susceptibilidade a essa doença e os sinais clínicos são bem
445 semelhantes aos de pulorose (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

446 Quanto aos impactos na saúde pública, *S. Typhimurium* foi o segundo
447 sorovar mais notificado como causa da salmonelose humana em 2013 na
448 União Europeia, correspondendo a 20,2% dos casos descritos nesse ano,
449 ficando atrás somente do sorovar *Enteritidis*. Nos Estados Unidos da América,
450 o CDC apontou esse sorovar como o terceiro mais frequentemente isolado em
451 humanos que apresentaram salmonelose em 2016 (EFSA, 2015; CDC, 2018).

452 No Brasil, uma pesquisa conduzida por Medeiros e colaboradores (2011)
453 demonstrou que *S. Typhimurium* era um dos mais frequentes sorovares
454 isolados em carcaças de frangos. Esse achado corrobora com a alta
455 prevalência desse sorotipo como agente transmissor de *Salmonella* spp. a
456 humanos a partir de animais (CDC, 2017; EFSA, 2015; WHO, 2020).

457 Como a principal fonte de infecção de *Salmonella* spp. aos homens são
458 alimentos de origem avícola contaminados, é recomendado controlar paratifo
459 aviário nas granjas produtoras de aves e estabelecer métodos mais eficientes
460 de prevenção e controle relativos à contaminação do produto final durante o
461 abate e processamento de frangos (BRASIL, 2016a).

462 Embora os sorovares *Typhimurium* e *Enteritidis* sejam os mais
463 envolvidos na salmonelose humana no mundo, *S. Heidelberg* vem sendo
464 apontada como um sorotipo emergente. Esse sorovar é comumente isolado na
465 produção de frangos, galinhas e perus, com tendência ao aumento no número
466 de isolamentos em carne e ovos; além de estar associado a surtos em

467 humanos (SIVARAMALINGAN et al., 2013; SOUZA, 2015; CDC, 2018; NAKAO
468 et al., 2018; EFSA, 2019).

469 O Brasil teve sucesso em diminuir a prevalência dos sorovares
470 *Enteritidis* e *Typhimurium* em seu território por meio do PNCP - Programa
471 Nacional de Controle de Patógenos e também devido a Instrução Normativa nº
472 20 de 2016. No entanto, sorovares que possuíam baixa prevalência
473 começaram a se tornar mais expressivos, como ocorreu com *S. Heidelberg*
474 (WEBBER et al., 2019).

475 Quanto à epidemiologia, o sorovar *Heidelberg* tem distribuição global e
476 está entre os dez sorovares mais isolados em episódios de salmonelose
477 humana (GRIMONT e WEILL, 2007; CDC, 2013a). De acordo com o sistema
478 de vigilância europeu, RASFF, ele é usualmente constatado em alimentos,
479 sendo incluso na lista dos mais isolados em 2013, 2014 e 2016. Em 2018 e
480 2019, esse sistema relatou mais de 100 ocorrências desse sorotipo em
481 produtos derivados de aves de origem brasileira enviados à União Europeia
482 (RASFF, 2019).

483 Relatórios de órgãos de países com vigilância epidemiológica ativa
484 apontam o sorovar *Heidelberg* dentre os mais relevantes. Nos Estados Unidos
485 da América, o CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*, mencionou
486 esse sorovar como o sexto mais frequentemente isolado em humanos que
487 apresentaram salmonelose em 2013 (CDC, 2013a). Dois anos depois, em
488 2015, o CDC relatou uma incidência superior a mil casos, nos EUA, em que *S.*
489 *Heidelberg* foi confirmado como agente etiológico; os casos foram associados
490 ao consumo de carne de frango ou peru e sucederam de 2011 a 2014 (CDC,
491 2015). No Canadá, *S. Heidelberg* é listado como o terceiro de maior frequência
492 na avicultura e alterna entre a segunda e terceira posição no âmbito da saúde
493 pública (CHITTICK et al., 2006).

494 Em alguns outros países, infecções por esse sorovar não representam
495 tamanha relevância à saúde pública; como é o caso da União Europeia, de
496 acordo com os dados do relatório de 2014 do ECDC, *European Centre for*
497 *Disease Prevention and Control* (EU, 2014).

498 No Brasil, o crescimento do número de isolamentos desse sorovar em
499 alimentos e, também, o número de casos de infecções humanas são um alerta

500 e motivo de preocupação aos órgãos de saúde pública do governo (BRASIL,
501 2018).

502 Desde o ano de 1962, *S. Heidelberg* é isolada em amostras derivadas
503 de aves no território brasileiro. Em 1997, o sorotipo foi listado como o terceiro
504 mais detectado em carcaças de frango analisadas por Nascimento e
505 colaboradores (1997). Dentre os isolados, 11% foram identificados como do
506 sorovar *Heidelberg*, que ficou atrás somente de *Enteritidis* (51%) e *Hadar*
507 (26%). Em 2004, Dickel (2004) visitou três frigoríficos distintos na região sul do
508 Brasil e realizou amostragem de carcaças antes e após a imersão no *chiller*.
509 Teve como resultado, anterior ao *chiller*, 31,7% de carcaças positivas para
510 *Salmonella* e 20%, após. Ao identificar os sorovares, *S. Heidelberg* foi o
511 sorovar mais prevalente dentre os positivos (64%). Entre os anos de 2012 e
512 2014, esse sorovar foi descrito como o terceiro mais isolado em granjas
513 produtoras de frango, correspondendo a 20 a 33% das amostras positivas para
514 bactérias do gênero *Salmonella* (VOSS-RECH et al., 2015).

515 Em comparação com outros sorovares paratípicos, *S. Heidelberg* pode
516 provocar quadros de salmonelose mais graves em humanos devido à alta
517 capacidade invasiva das cepas. Na evolução da doença, a bactéria pode atingir
518 outros sistemas do organismo e causar infecções extra intestinais, situação que
519 é relatada em cerca de 13% dos que adquirem a infecção (JONES et al., 2008;
520 DUTIL et al., 2010).

521 A salmonelose humana associada a *S. Heidelberg* resulta em uma alta
522 porcentagem de hospitalizações dos acometidos. Além disso, o
523 estabelecimento de um tratamento adequado aos pacientes é considerado um
524 desafio, já que são identificadas de forma frequente, cepas deste sorovar com
525 perfis de multirresistência aos antimicrobianos (CDC, 2018; EFSA, 2019;
526 ETTER et al., 2019).

527

528 **3.7 Gênero *Salmonella* e resistência aos antimicrobianos**

529

530 A mudança no perfil de resistência de representantes do gênero
531 *Salmonella* aos antimicrobianos, principalmente quando associado a aquisição
532 de novos mecanismos de evasão à ação dos fármacos, é razão de
533 preocupação de pesquisadores e profissionais de saúde em todo o mundo. Na

534 transição entre as décadas de 1970 e 1980, a porcentagem média de estirpes
535 em território brasileiro que apresentavam resistência saltou de 17% para 31%,
536 inclusive a fluoroquinolonas, que correspondem a uma classe de
537 antimicrobianos de eleição no tratamento de salmoneloses (BRASIL, 2018).

538 O crescimento do número de bactérias resistentes, em geral, exprime
539 um real risco à saúde pública, uma vez que a eficácia e as opções de
540 intervenções terapêuticas contra infecções tornam-se reduzidas. Portanto, há a
541 necessidade a nível global de vigilância epidemiológica constante no
542 acompanhando dos níveis de resistência, para que se encontrem novas
543 possibilidades e alternativas para modificação nesse quadro (WHO, 2011).

544 Debates sobre a resistência aos antimicrobianos são levantados com o
545 intuito de encontrar alternativas e respostas para essa problemática em
546 encontros da OMS, Organização Mundial da Saúde, e no *Codex Alimentarius*,
547 programa da FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* -
548 que tem a função de estabelecer padrões internacionais de produção, controle,
549 verificação e comercialização de alimentos (WHO/FAO/OIE, 2003).

550 Os micro-organismos do gênero *Salmonella* são zoonóticos, possuem
551 distribuição mundial e têm potencial para infectar grande parte das espécies
552 exploradas para alimentação humana, assim, o aumento do número de cepas
553 resistentes torna-se alarmante (KICH, CARDOSO, 2012). Por mais que a
554 salmonelose humana seja uma doença auto-limitante e não seja necessária a
555 prescrição de antimicrobianos em grande parte dos casos clínicos, a
556 preocupação se mantém, pois há ocorrências de processos infecciosos mais
557 graves e com estirpes que apresentam fatores de virulência que as tornam
558 mais invasivas, e nesses casos, o uso de antimicrobianos é indispensável
559 (WHO, 2018). Somado a isso, é grande a chance da resistência ser transmitida
560 a outras estirpes e a outras espécies e/ou gêneros bacterianos por troca de
561 material genético ou pressão de seleção para essa característica, uma vez que
562 a prevalência desse micro-organismo é elevada. Acentua-se, portanto, a
563 preocupação ao surgimento de estirpes multirresistentes nessas circunstâncias
564 (JAJERE, 2019).

565 No âmbito de produção animal, a pressão de seleção é ininterrupta, já
566 que a utilização de antimicrobianos ultrapassa a aplicação terapêutica, sendo
567 usada também na profilaxia, metaprofilaxia e como promotor de crescimento. O

568 emprego excessivo desses fármacos favorece o surgimento de cepas
569 resistentes (ANTUNES et al., 2016)

570 No Brasil e em outros países emergentes não existe um órgão ativo
571 responsável pelo monitoramento da condição de resistência aos
572 antimicrobianos em bactérias isoladas de humanos, animais de produção e em
573 alimentos. Também não há um intercâmbio dos dados levantados em cada elo
574 do complexo agroindustrial avícola, o que compromete a percepção da
575 contribuição de cada parte da produção, seja no momento de criação dos
576 animais ou no abate e processamento da carcaça, e seu impacto direto na
577 saúde pública e transmissão. Essas afirmações, adicionadas à ideia de uso
578 indiscriminado e em dosagem inadequada de agentes antimicrobianos,
579 favorecem a intensificação da pressão de seleção a cepas que possuem
580 fenótipo resistente que circulam entre seres vivos e ambiente (BRASIL, 2018;
581 CDC, 2018; EFSA, 2019).

582

583 **3.7.1 β -lactâmicos**

584 Os fármacos β -lactâmicos pertencem a uma classe de antimicrobianos
585 importante para a terapêutica de infecções bacterianas, e é plurivalente, já que
586 engloba as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenêmicos e os
587 monobactâmicos. As moléculas que representam esse grupo possuem um anel
588 β -lactâmico em sua estrutura química que confere habilidade antimicrobiana ao
589 fármaco (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008; KONATÉ et al., 2019).

590 O principal modo de atuação dos β -lactâmicos é impossibilitar a
591 construção coesa da porção de peptideoglicanos, que forma a parede celular.
592 Esse fenômeno acontece no momento de bipartição bacteriana e prejudica a
593 estrutura responsável por realizar a osmorregulação ocasionando a morte do
594 micro-organismo (YORK, 2018).

595 Existem três mecanismos de resistência desenvolvidos por bactérias a
596 essa classe: i) síntese de enzimas β -lactamases que quebram o anel β -
597 lactâmico e inativam o fármaco, impossibilitando sua atuação na parede celular
598 bacteriana; ii) alteração em um sítio das PBP- *Penicillin Binding Proteins*; e iii)
599 transformações no formato de porinas bacterianas reduzindo a troca de
600 substâncias (CARATTOLI, 2008).

601 A aplicação constante e em massa dos fármacos β -lactâmicos em
602 humanos, animais de companhia e de produção favoreceu a seleção de
603 estirpes produtoras de enzimas β -lactamases. São relatadas mais de 340
604 variedades dessas enzimas para o gênero *Salmonella* (KONATÉ, 2019).

605 As β -lactamases são expressas por distintos genes, dentre eles *bla_{TEM}*,
606 *bla_{SHV}*, *bla_{CMY}* e *bla_{CTX}*, que codificam as ESBLs (*Extended-spectrum β -Lactamase* ou β -lactamases de espectro estendido). Esses genes podem ser
607 transmitidos a outras bactérias por incorporação de DNA cromossomal ou
608 plasmideal, e também, via transposons e integrons, elementos genéticos
609 móveis. Estudos evidenciam que, eventualmente, o fenótipo de resistência não
610 é constatado a nível de genótipo, pois não há detecção de genes *bla* em
611 provas moleculares para cepas fenotipicamente resistentes. Esse fato ratifica
612 que há outras formas, além da via cromossomal, de adquirir resistência, como
613 por meio de plasmídeos, transposons ou integrons, que são elementos
614 genéticos que podem ser mais facilmente adquiridos ou perdidos (MICHAEL et
615 al., 2006; KONATÉ, 2019).

617 As ESBLs atribuem resistência a várias cefalosporinas e penicilinas. O
618 CDC (2014) calcula que os valores aproximados de infecções e mortes
619 causadas por cepas capazes de secretar essas enzimas sejam,
620 respectivamente, 26 mil ocorrências de infecções e 1,7 mil mortes nos EUA
621 (CDC, 2014).

622 Os antimicrobianos amoxicilina e ampicilina pertencem à classe das
623 penicilinas de espectro estendido e são empregados em grande quantidade no
624 tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos. Contudo, devido ao fato
625 de serem hidrolisadas por β -lactamases, diversas estirpes expressam
626 resistência a esses fármacos (TRABULSI; MIMICA; MIMICA, 2008. YORK,
627 2018).

628 O gene *bla_{CMY}* carrega a mensagem para sintetizar a enzima β -
629 lactamase AmpC, responsável pela resistência às cefalosporinas, e está
630 associado a plasmídeos. Esse tipo de associação facilita a permuta do gene
631 que promove a resistência entre bactérias e pode ser propagada à população
632 bacteriana. Pode-se inferir que o aumento expressivo de micro-organismos
633 resistentes às cefalosporinas na atualidade é resultante dessa associação
634 (AARESTRUP, 2004; CARSON et al., 2019).

635 Dentre as cefalosporinas, a resistência em estirpes do gênero
636 *Salmonella* a ceftriaxona se destaca. Uma hipótese que justifica essa alta
637 resistência é a utilização frequente e exagerada de ceftiofur, um antimicrobiano
638 da mesma classe licenciado exclusivamente para o uso em medicina
639 veterinária. Possivelmente, a resistência adquirida por bactérias ao ceftiofur
640 estimulou a resistência cruzada à ceftriaxona (CARATTOLI et al., 2002;
641 CARSON et al., 2019).

642 Por fim, quanto aos carbapenêmicos, três moléculas compõem essa
643 classe: meropenem, imipenem e ertapenem. Por se tratar de fármacos
644 empregados em casos de infecções por bactérias multirresistentes, deve-se
645 ponderar criticamente o seu uso, de modo que não seja considerado como
646 antimicrobiano de eleição em um primeiro momento, e ainda, que seja
647 administrado em dose e frequência adequadas para que a pressão de seleção
648 seja mínima possível (GOUVEIA, LINS e SILVA, 2019).

649

650 **3.7.2 Quinolonas e fluoroquinolonas**

651

652 Quinolonas são antimicrobianos sintéticos, ou seja, são quimioterápicos,
653 que possuem ação bactericida e atuam em amplo espectro, possuindo como
654 base o alcaloide quinina. O mecanismo de ação desses quimioterápicos é a
655 inibição de duas enzimas que cooperam na síntese de DNA, a girase e a
656 topoisomerase IV (VAN BAMBEKE et al., 2005; COSTA, 2016).

657 Pode-se destacar a relevância das quinolonas frente a outras classes de
658 antimicrobianos, já que são considerados como primeira escolha na terapêutica
659 de salmonelose humana. Assim, a OMS a reconhece como essencial à saúde
660 pública e, ainda, aconselha que seu uso seja submetido a controle e reduzido o
661 quanto possível em profilaxia e tratamento de animais de produção, para que
662 se evite pressão seletiva sobre estirpes resistentes e que, eventualmente,
663 possam infectar humanos por meio da ingestão de alimentos contaminados
664 (WHO, 2011; EU, 2014; EFSA, 2017).

665 No Brasil, foi proibido, no ano de 2009, a utilização de quinolonas como
666 promotores de eficiência alimentar ou como profilaxia na produção animal,
667 sendo lícito seu emprego somente para fins terapêuticos (BRASIL, 2009).

668 Um fármaco que se sobressai dentro do grupo das fluoroquinolonas é a
669 ciprofloxacina, a saber, uma das mais utilizadas no mundo. No Brasil, baixas
670 porcentagens de resistência (0,4%) foram descritas no ano de 2012 (BRASIL,
671 2012a). Entretanto, também no Brasil, Mendonça e colaboradores (2019)
672 detectou aproximadamente 7% de resistência em 111 estirpes do sorotipo
673 *Enteritidis* provenientes de carcaças de frango. Lin e colaboradores (2015), na
674 China, analisaram 82 cepas de múltiplos sorovares de *Salmonella* e
675 constataram que 39% delas eram resistentes a ciprofloxacina e emitiram uma
676 advertência sobre o aumento, ao longo dos anos, da prevalência de resistência
677 bacteriana às fluoroquinolonas na Ásia. Já nos EUA, pesquisadores não
678 observaram resistência a ciprofloxacina em estirpes pertencentes ao sorovar
679 Heidelberg isoladas de aves (NISAR et al., 2017).

680 A resistência às fluoroquinolonas são expressas de diversos modos: i) por
681 formação de sistemas de efluxo; ii) transformação da arquitetura molecular do
682 fármaco; iii) por modificações na conformação das enzimas girase e
683 topoisomerase; iv) como resultado de mutações cromossômicas; e iv) alteração
684 ou depleção de porinas presentes nas membranas celulares bacterianas que
685 interferem no acesso do antimicrobiano à célula (GAY et al., 2006;
686 ALTERTHUM, 2008).

687 Embora a resistência à classe das fluoroquinolonas seja considerada
688 baixa, é de suma importância que seja acompanhada por órgãos de vigilância
689 em saúde humana e veterinária. Além disso, os dados levantados devem ser
690 comunicados para servir de alerta e sejam tomadas medidas de controle
691 assertivas, se preciso for, já que esse grupo é o mais adequado para
692 intervenções terapêuticas em casos de infecções por *Salmonella* (WHO, 2011;
693 BRASIL, 2018).

694

695 **3.7.3 Polimixinas**

696

697 Polimixinas são uma categoria de antimicrobianos que possuem
698 mecanismo de ação que se distingue dos outros grupos. Esses fármacos são
699 peptídeos que têm a membrana citoplasmática bacteriana Gram-negativa como
700 alvo, e quando interagem com essa estrutura, se inserem entre os

701 polissacarídeos, provocam desordem e desencadeiam então, instabilidade e
702 ruptura da membrana citoplasmática. Essa classe de antimicrobianos, além de
703 causar a morte do micro-organismo, tem a habilidade de neutralizar toxinas
704 secretadas pelas bactérias por meio do bloqueio da ação do lipídeo A, que
705 representa a endotoxina da bactéria Gram-negativa (ALTERTHUM, 2008;
706 MELETIS e SKOURA, 2018).

707 Por possuir esse modo de atuação distinto, dificilmente haverá
708 resistência cruzada a polimixinas causada por outros grupos, portanto, esses
709 fármacos são destinados, na maioria das vezes, a casos de maior gravidade
710 nos quais há o envolvimento de cepas multirresistentes (WHO, 2011).

711 O mais importante fármaco desse grupo é a colistina, que é considerada
712 pela OMS como primordial, por se tratar de uma das últimas alternativas no
713 tratamento de casos em que se configure a seriedade da infecção causada por
714 bactérias resistentes a diversos antimicrobianos. Por mais que seja estável
715 quanto a resistência cruzada com outras classes de antimicrobianos, a
716 resistência pode ocorrer pela redução da afinidade do fármaco à membrana
717 celular bacteriana Gram-negativa (WHO, 2011; LIMA, DOMINGUES e da
718 SILVA, 2019).

719 Estudo realizado no Brasil em 2005 constatou que nenhuma das 96
720 cepas de *Salmonella* testadas apresentavam resistência a colistina (REZENDE
721 et al., 2005), mas em 2013, 21/94 (22%) das cepas desse mesmo gênero
722 foram resistentes (FIGUEIREDO et al., 2013). Ao longo do tempo, as
723 publicações científicas mostraram uma tendência no aumento de resistência a
724 colistina globalmente, de acordo com o levantamento bibliográfico realizado por
725 Lima, Domingues e da Silva (2019), que apresenta uma análise sobre a
726 disseminação horizontal de resistência a colistina a outras bactérias via
727 transmissão de elementos genéticos móveis que contenham genes do tipo *mcr*.

728 Ao observarem o quadro de evolução da resistência dentro do gênero
729 *Salmonella*, a OMS e outras agências de saúde ao redor do planeta levantaram
730 alertas sobre a influência que esse fenômeno pode ter nos tratamentos de
731 processos infecciosos provocados por bactérias super-resistentes. Baseando-
732 se nisso, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento ministério
733 brasileiro - MAPA, proibiu em 2016 o emprego desse fármaco como promotor

734 de eficiência alimentar em animais de produção no Brasil (WHO, 2011;
735 BRASIL, 2016c; LIMA, DOMINGUES e da SILVA, 2019).

736

737 **3.7.4 Fosfomicinas**

738

739 Fosfomicina é uma classe relativamente nova de antimicrobianos que
740 tem ação bactericida por comprometer a síntese da parede celular. O fármaco
741 inibe a enzima sintetase do fosfoenolpiruvato e, desse modo, prejudica a
742 produção de peptideoglicano (ALTERTHUM, 2008).

743 Ao estudar uma cepa do gênero *Salmonella* isolada de alimento, Lin e
744 Chen (2015) descreveram um mecanismo de resistência a esse fármaco
745 mediado por *fosA3*, o primeiro gene de resistência a fosfomicina, localizado em
746 um plasmídeo conjugativo. Nessa pesquisa, constatou-se que esse mesmo
747 plasmídeo carreava, além do gene *fosA3*, o *bla_{CTX-M-55}* e levantou-se a hipótese
748 de que ele possa propagar entre enterobactérias.

749 No Brasil, Mendonça (2016) analisou a resistência antimicrobiana em
750 cepas de *S. Enteritidis*, *Typhimurium* e *Typhimurium* variante monofásica
751 provindas de carcaças de frango isoladas entre os anos de 2009 a 2011. A
752 autora encontrou os seguintes resultados acerca de resistência a fosfomicina:
753 *Enteritidis*, 1/111 (0,9%); *Typhimurium*, 1/45 (2,2%); e *Typhimurium* variante
754 monofásica, 0/31 (0,0%).

755 Nascimento (2017) pesquisou a presença de genes de resistência aos
756 antimicrobianos em 14 genomas de *Salmonella* spp disponíveis na plataforma
757 NCBI, sendo oito deles pertencentes ao sorovar Heidelberg e seis, ao
758 *Typhimurium* (STM), provindos do Brasil e dos EUA. O gene de resistência a
759 fosfomicina *fosA7* foi observado em 50% das cepas analisadas, sendo sete
760 cepas de Heidelberg (três do Brasil e quatro dos EUA). Esse dado alarmante
761 aponta o surgimento e expansão da não susceptibilidade bacteriana a essa
762 nova classe, ao menos no sorovar Heidelberg. Por se tratar de um tema novo,
763 é necessário que novos estudos acompanhem esse quadro de resistência.

764

765 **3.7.5 *Salmonella* multirresistentes**

766

767 Infecções por bactérias do gênero *Salmonella* chegam a mais de um
768 milhão de casos anualmente e somam \$350 milhões de despesa aos governos.
769 De acordo com o CDC, aproximadamente 5% dos casos envolvem cepas
770 resistentes a cinco antimicrobianos ou mais (CDC, 2018).

771 Por ser um dos principais agentes etiológicos de doenças transmissíveis
772 por alimentos, o número de estirpes de *Salmonella* que apresentam
773 multirresistência antimicrobiana é descrito em publicações científicas como
774 uma situação alarmante em razão dos riscos que pode oferecer à saúde
775 pública e pelos desafios impostos ao tratamento de doentes (PARISI et al.,
776 2018; CHIOU et al.; 2019; GUPTA et al., 2019)

777 O sorovar Heidelberg, de acordo com o CIDRP - *Center for Infectious*
778 *Disease Research and Policy* dos EUA, é declarado como emergente por
779 demonstrar ascensão da prevalência de perfis de multirresistência no decorrer
780 dos anos (CIDRP, 2017).

781 Um estudo realizado no Brasil, em 2012, testou 250 estirpes
782 pertencentes ao gênero *Salmonella* provindas de carcaças de frango e apontou
783 que 76,8% (192/250) das cepas eram resistentes a três ou mais grupos
784 distintos de antimicrobianos. Cerca de 100 perfis distintos de multirresistência
785 foram reconhecidos, dentre eles, 30% do sorovar Enteritidis e 28% de
786 Typhimurium eram resistentes a pelo menos cinco classes de antimicrobianos.
787 No mesmo estudo, uma cepa do sorovar Enteritidis se destacou por ser
788 resistente a 16 fármacos de seis classes diferentes, incluindo antimicrobianos
789 de última geração. Essa estirpe foi submetida a provas moleculares e não
790 foram detectados os fatores de resistência genotípica correspondentes aos
791 grupos de antimicrobianos aos quais expressou fenótipo de resistência. Uma
792 hipótese levantada é de que a característica foi adquirida via plasmídeos ou
793 elementos móveis (BRASIL, 2012b).

794 De modo conjunto, médicos veterinários e de humanos devem atuar
795 para reduzir o avanço da resistência aos antimicrobianos, pois vários dos
796 fármacos empregados em processos infecciosos que se desenvolvem em
797 humanos são também prescritos a animais de produção (NARMS, 2013; WHO,
798 2018).

799 Uma ação necessária para ampliar o entendimento acerca da complexa
800 epidemiologia do gênero *Salmonella* é o acompanhamento da resistência em

801 estirpes provindas de humanos, alimentos, animais e ambiente. O
802 levantamento desses dados pode auxiliar na determinação de prováveis locais
803 em que a resistência se originou, listar os sorotipos mais envolvidos, mensurar
804 os impactos causados na saúde pública e a estabelecer métodos mais
805 eficientes de prevenção e controle (BRASIL, 2012b; CDC, 2018; WHO, 2018).

806 A comunidade internacional se preocupa com o aumento da resistência
807 aos antimicrobianos e estabelece recomendações que auxiliem no controle.
808 Assim, durante a análise de resistência antimicrobiana, deve-se atentar à
809 identificação correta do micro-organismo para que os fármacos a serem
810 testados sejam escolhidos de forma assertiva. Após a avaliação, como forma
811 de evitar a pressão seletiva sobre cepas resistentes, o antimicrobiano e a
812 dosagem devem ser estabelecidos tendo como base a interpretação de
813 resultados de análises e dados epidemiológicos (CLSI, 2019; EUCAST, 2019;
814 JAJERE, 2019).

815 A técnica de disco-difusão é uma das mais aplicadas em avaliações de
816 susceptibilidade aos antimicrobianos e classifica as cepas em sensíveis,
817 intermediárias ou resistentes de forma qualitativa. Outra técnica, mas de
818 caráter quantitativo, é a CIM - Concentração Inibitória Mínima, que mensura a
819 menor concentração do fármaco capaz de impedir o crescimento bacteriano e,
820 por seu intermédio, a dosagem correta a ser aplicada na terapêutica (CLSI,
821 2019; EUCAST, 2019).

822 Por tornar possível a determinação da dosagem eficaz de
823 antimicrobianos em intervenções terapêuticas, é cada vez mais comum a
824 predileção por técnicas quantitativas, como a CIM, pois emitem resultados de
825 maior confiabilidade. Além disso, esses métodos evitam a prescrição de sub-
826 doses, uma das principais condições que propiciam a seleção e aumento na
827 prevalência de bactérias resistentes (EUCAST, 2019).

828

829 **3.7.6 Marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos em** 830 ***Salmonella***

831

832 O crescimento recente do número de cepas de *Salmonella enterica*
833 resistentes aos antimicrobianos é motivo de preocupação internacional, porque
834 as alternativas terapêuticas tornam-se reduzidas. Por consequência, a OMS

835 classificou como de alta prioridade monitorar bactérias dessa espécie que
836 apresentem resistência a antibióticos (WHO, 2011).

837 Relevantes contribuições ao tema podem ser obtidos pela identificação
838 de marcadores genéticos de resistência, sua relação como a resistência
839 fenotípica e como são transferidos a outras bactérias. De modo adicional à
840 transferência clonal dos genes, por replicação do material genético, e às
841 mutações que possam ser eventualmente adquiridas, o intercâmbio de
842 plasmídeos e integrons entre cepas são mecanismos importantes de obtenção
843 de novos fatores de resistência genotípica, por meio dos quais, vários genes
844 que atribuem resistências a diferentes antimicrobianos podem ser adquiridos
845 ao mesmo tempo (SEKYERE; ASANTE, 2018).

846 Várias formas de resistência bacteriana a classe de antimicrobianos β -
847 lactâmicos são descritos, sendo a mais comum e eficiente, a síntese e
848 secreção de enzimas β -lactamases pelo micro-organismo. Essas enzimas
849 hidrolisam o anel β -lactâmico e tornam o fármaco uma molécula inativada. As
850 β -lactamases são sintetizadas por diversas bactérias que são caracterizadas,
851 portanto, como resistentes aos β -lactâmicos (CARATTOLI, 2008).

852 Há mais de 30 tipos de β -lactamases em bactérias Gram-negativas que
853 são codificadas por genes situados em plasmídeos. As enzimas β -lactamases
854 observadas no gênero *Salmonella* são diversas, formam vários grupos e é
855 considerável a quantidade de genes que carregam a informação para sintetizá-
856 las. É possível citar ao menos dez subgrupos de genes *bla* correspondentes a
857 β -lactamases, sendo eles, TEM, SHV, KPC, PSE, DHA, OXA, ACC, PER, CMY
858 ou CTX-M, dando ênfase especial aos genes *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* por permitirem a
859 síntese de β -lactamases de espectro estendido (MICHAEL et al., 2006).

860 Quanto aos mecanismos de resistência à classe das fluorquinolonas,
861 existem alguns que são disseminados a outras bactérias por genes presentes
862 em plasmídeos. Dentre esses mecanismos, pode-se citar a família de
863 peptídeos *qnr* que inibe alostericamente o antimicrobiano e dificulta sua ligação
864 à enzima alvo. Dois importantes genes que codificam a síntese de *Qnr* são
865 *qnrS* e *qnrA* (ROBICSEK et al., 2006).

866 Considerando que determinados genes de resistência podem facilmente
867 ser transmitidos a outras cepas por estarem localizados em elementos
868 genéticos móveis, é importante monitorar constantemente os sorovares do

869 gênero *Salmonella* que os abrigam. Por outro lado, a elevada biodiversidade
870 genômica dentro desse gênero constitui entrave à criação e estabelecimento
871 de medidas de mitigação para controle do patógeno.

872

873

874 **3.8 Virulência**

875

876 Por possuir ancestralidade em comum, todos os sorotipos do gênero
877 *Salmonella* provocam doenças basicamente, do mesmo modo, pois o grupo
878 adquiriu genes-chave de virulência antes da irradiação evolutiva. No começo,
879 esse gênero coevoluiu com hospedeiros pecilotérmicos e uma subespécie,
880 isoladamente, expandiu o número de hospedeiros com os quais interagia e
881 passou a colonizar animais homeotérmicos, principais reservatórios de infecção
882 humana (TANNER et al., 2018).

883 *Salmonella* spp evoluiu sobretudo como um patógeno do trato
884 gastrointestinal, com potencial para infectar a mucosa intestinal e tecido linfoide
885 associado a mucosa - MALT. Para superar o microbioma normal na competição
886 por melhores condições de replicação no nicho intestinal, esse gênero adota a
887 estratégia de invasão da mucosa intestinal. Ao acessar e consumir
888 biomoléculas disponíveis em tecidos do hospedeiro, o micro-organismo suscita
889 um processo inflamatório nesse órgão, fazendo com que seja necessário
890 resistir às defesas estabelecidas pelo sistema imune do hospedeiro. Desta
891 forma, é crucial para a bactéria possuir meios em seu aparato gênico que a
892 permitam resistir e, ainda, se preciso for, ter a capacidade de regular a síntese
893 das proteínas codificadas nesses genes (OLIVEIRA et al., 2013; TANNER et
894 al., 2018).

895 Para infectar, a bactéria precisa se aderir, invadir, replicar e resistir às
896 defesas do sistema imune do hospedeiro. Nesse sentido, existe uma gama de
897 genes que codificam peptídeos e proteínas que, ao serem sintetizados,
898 exercem mecanismos específicos e atuam em cada um dos estágios citados.
899 Esses genes podem estar localizados em plasmídeos e transposons, ou até em
900 setores cromossomais conhecidos como ilhas de patogenicidade (IPs).
901 Somados, esses elementos genéticos contribuem à virulência da cepa
902 (OCHOA & RODRÍGUES, 2005; VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005).

903 Certos genes, em particular, estão vinculados à patogenicidade e são
904 tidos como relevantes, são eles, *invA*, *sivH*, *agfA*, *lpfA*, *avrA*, *sefA*, *sopE*, *hilA* e
905 o *spvC*.

906 Ao decorrer da fase de adesão, as moléculas adesinas, expressas pela
907 bactéria, interagem e se fixam em receptores específicos presentes na
908 superfície de células do hospedeiro. Contudo, as adesinas possuem
909 determinantes antigênicos que alertam o sistema imune acerca da existência
910 de um corpo estranho invasor e há uma resposta inflamatória com ativação de
911 células de defesa como neutrófilos e linfócitos B (OLIVEIRA et al., 2013).

912 A sinalização que ocorre nas células do infectado pode induzir a
913 alterações em suas superfícies e mudança na conformação dos receptores.
914 Dessa forma, o patógeno pode trocar seu padrão de adesina por outro para se
915 adequar melhor ao novo formato de receptores e dar continuidade à
916 colonização bacteriana (OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

917 As adesinas de bactérias Gram-negativas são representadas pela
918 cápsula, pili, fímbrias, flagelos e LPS. Por dispor de várias delas, *Salmonella*
919 spp tem sucesso ao aderir em superfícies vivas e não-vivas e, ainda, obtém
920 estabilidade para formar biofilmes (OLIVEIRA et al., 2013).

921 Os genes *agfA* e *lpfA*, por codificarem a síntese de fímbrias, contribuem
922 na fixação das bactérias entre si e ao substrato. Eles são associados ao
923 potencial de formação de biofilmes, à adaptação ambiental e participam do
924 processo de invasão celular. As fímbrias sintetizadas colaboram, inclusive, no
925 estabelecimento da colonização bacteriana das células epiteliais do organismo
926 infectado (DARWIN e MILLER, 1999; YOO et al., 2013). Borges e
927 colaboradores (2013) e Weber e colaboradores (2019) estudaram a prevalência
928 desses genes em cepas de *Salmonella* e tiveram como resultado 100% de
929 positividade para ambos genes.

930 O acesso da bactéria ao interior celular ocorre por meio de um grupo de
931 genes bastante preservados no gênero *Salmonella*, denominados *inv*. Eles
932 levam à modificação do citoesqueleto das células epiteliais e induzem para a
933 formação de uma vesícula que internaliza o patógeno. Somado a isso, a ação
934 do gene em uma célula estimula a reorganização do citoesqueleto das células
935 adjacentes. Após isso, dá-se início à inflamação do tecido invadido, a secreção
936 do íon sódio é inibida, a de cloreto e água é estimulada e, juntamente com a

937 provável ação de endotoxinas, o quadro culmina em diarreia (DARWIN &
938 MILLER, 1999; OLIVEIRA et al., 2013).

939 O gene *avrA* é responsável por codificar a construção da biomolécula
940 AvrA, uma proteína efetora que atua na colonização, crescimento da população
941 bacteriana e dificulta a ação do sistema imune do hospedeiro contra a infecção
942 estabelecida ao induzir a apoptose celular em fagócitos. Esse gene está
943 presente em diversas cepas por se situar em um trecho bem preservado do
944 material genético de bactérias do gênero *Salmonella* (BEN-BARAK et al., 2006;
945 BORGES et al., 2013; LABRIOLA, ZHOU e NAGAR, 2018; ARAVENA et al.,
946 2019; WEBBER et al., 2019).

947 Os genes *sivH* e *sopE* estão associados a cepas com potencial para
948 causar surtos epidêmicos e ambos atuam na fase de invasão celular e
949 colonização da mucosa intestinal do hospedeiro (BORGES et al., 2013). O
950 gene *sivH* tem como principal porta de entrada as placas de Peyer. O *sopE*,
951 codifica a proteína SopE, uma das moléculas produto do operon *SopABCDE*, e
952 que compõe a membrana externa e age como indutora nos rearranjos do
953 citoesqueleto e da membrana, abrindo a possibilidade para que o micro-
954 organismo aja intracelularmente (MIRMOMENI, KIANI e SISAKHTNEZHAD,
955 2008).

956 O gene *hilA* atua na regulação central necessária para etapa de invasão
957 intracelular, além de ser um indutor para apoptose de fagócitos, especialmente
958 os macrófagos (CAMPIONI, BERGAMINI e FALCÃO, 2012). Por ser altamente
959 conservado, este gene tem sido utilizado amplamente como alvo para
960 identificação do gênero *Salmonella* (BORGES et al., 2013). No entanto, há
961 estudos que não confirmam 100% de positividade para este gene nos isolados,
962 já que Webber e colaboradores (2019), identificaram 66% de amplificação em
963 um grupo com 126 isolados de *S. Heidelberg*, sugerindo que é preferencial
964 utilizar outros genes como *invA* ou o *ompC* como alvo de identificação.

965 O gene plasmidial *spvC* pertencente ao operon *spvRABCD*, é o mais
966 prevalente nos sorotipos Enteritidis, Typhimurium, Pullorum e Gallinarum e está
967 associado a multiplicação da população bacteriana e replicação extra intestinal,
968 além de atuar em mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro.
969 (BARTH e BAUERFEIND, 2005; BORGES et al., 2013).

970 A fímbria SEF14 é um importante fator de virulência codificado pelo gene
971 *sefA*, que está incluso no operon *sefABCDE*. Essa fímbria está ligada à etapa
972 de colonização das células epiteliais intestinais e à evasão dos mecanismos de
973 destruição mediados por fagócitos após sua internalização. Só há registros do
974 gene *sefA* no grupo D do gênero *Salmonella*, composto pelos sorovares
975 Moscow, Dublin, Blegdon e Enteritidis (OCHOA e RODRIGUEZ, 2005). Embora
976 esteja restrito somente a esse grupo, é importante acompanhar outros
977 sorovares para observar possíveis alterações nesse quadro ao longo do tempo,
978 já que existe a possibilidade de transferência de genes de virulência de uma
979 cepa a outra.

980 Ao longo dos anos, a variabilidade genética pode ocorrer nos micro-
981 organismos, principalmente de genes que estejam situados em elementos
982 móveis, já que são facilmente obtidos ou perdidos. Estudo em *S. Heidelberg*
983 apontou essa variação temporal gênica no Brasil. Webber et al. (2019)
984 comprovaram que estirpes isoladas entre os anos de 2016 e 2017 eram
985 distintas geneticamente de outras identificadas em 2006. Para compreender o
986 atual quadro epidemiológico de salmonelose e escolher de forma eficaz
987 métodos de prevenção e controle dessa doença, é importante monitorar os
988 perfis de virulência no gênero.

989

990 **3.9 Similaridade genética de *Salmonella* spp**

991

992 A análise genotípica de cepas do gênero *Salmonella* pode ser realizada
993 por diferentes técnicas e os dados obtidos podem contribuir para o melhor
994 entendimento da complexa epidemiologia do gênero *Salmonella*. De acordo
995 com o método escolhido, existe a possibilidade de conhecer o modo como a
996 disseminação se deu, descobrir as fontes de contaminação, compreender as
997 condições que propiciaram a emergência dos genes, apontar mutações e
998 recombinações gênicas, verificar a resistência a fármacos antimicrobianos e
999 constatar se a cepa é capaz de formar biofilmes ou não, entre outras
1000 possibilidades (GOGOI et al., 2018).

1001 Por fornecerem resultados de maior confiabilidade e ultrapassar os
1002 limites impostos aos métodos fenotípicos, os testes moleculares têm sido
1003 selecionados de modo preferencial para caracterizar os micro-organismos

1004 isolados. Dentre esses, o PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, por
1005 submeter todo o genoma bacteriano a prova, é reconhecido como o padrão-
1006 ouro no estudo de enterobactérias (WASSENAAR; NEWELL, 2000;
1007 FITZGERALD et al., 2001; CDC, 2013b).

1008 No PFGE, o DNA íntegro é submetido à atuação de enzimas de
1009 restrição, que clivam a molécula em locais específicos gerando fragmentos de
1010 diversos tamanhos. A variação entre os pontos de lise enzimática aponta a
1011 diversidade genética entre as cepas testadas. Após isso, com o auxílio da
1012 eletroforese configurado para alternar periodicamente a direção do campo
1013 elétrico ao qual as amostras são submetidas, os fragmentos do genoma, por
1014 possuírem pesos moleculares distintos, apresentam migração diferencial ao
1015 longo do gel de agarose e formam uma coluna com várias bandas (CHAMPION
1016 et al., 2005; GOERING, 2010).

1017 A avaliação da biodiversidade genética dentro de um conjunto de
1018 isolados pertencentes a uma mesma espécie é realizada pela comparação
1019 entre os padrões de banda formados após a PFGE. Como ferramenta auxiliar,
1020 existem programas de computadores que processam os dados e criam
1021 dendogramas que indicam, estatisticamente, a similaridade genética entre as
1022 estirpes submetidas à técnica (GOERING, 2010).

1023 Nos EUA, os surtos de DTAs, Doenças Transmitidas por Alimentos, de
1024 origem bacteriana, inclusive por *Salmonella* spp, são analisados pelo *PulseNet*,
1025 uma rede de laboratórios, administrada pelo CDC, que realiza testes
1026 moleculares padronizados e armazena os resultados de PFGE. Nesse banco
1027 de dados estão inclusos os resultados obtidos de micro-organismos provindos
1028 de pessoas infectadas e de alimentos contaminados o que permite, dessa
1029 forma, agrupar esses micro-organismos em clusters pela semelhança
1030 genotípica, possibilitando fazer algumas considerações epidemiológicas como
1031 a origem do surto, rotas de infecção, e como as cepas se distribuem e circulam
1032 no país (GIERALTOWSKI et al., 2016).

1033 Outra técnica molecular tem sido utilizada em pesquisas, o
1034 sequenciamento de parte ou do genoma bacteriano completo. Ao interpretar o
1035 genoma sequenciado, é possível avaliar se a cepa possui determinados genes
1036 de virulência já descritos e que são relacionados à resistência antimicrobiana, à
1037 patogenicidade ou à adaptação ambiental, inclusive genes que facilitam a

1038 formação de biofilmes. Além de caracterizar o agente, a técnica permite
1039 identificar a fonte de infecção ao comparar com uma base de dados já
1040 existente de outros sequenciamentos genômicos (IBRAHIM e MORIN, 2018).

1041 Laboratórios clínicos podem identificar estirpes de forma mais precisa a
1042 partir dos dados de sequenciamento genômico e associar a possíveis surtos.
1043 Por caracterizar a cepa completamente, destacando-se aí o perfil de resistência
1044 aos antimicrobianos, os tratamentos podem ser prescritos com o auxílio dessa
1045 metodologia. Além disso, é possível estudar a expressão gênica por meio do
1046 sequenciamento de RNAs bacterianos; analisando, assim, a interação entre o
1047 agente etiológico e seu hospedeiro (OAKESON et al., 2017).

1048 O sequenciamento gênico é apropriado para pesquisas acerca da
1049 evolução dos micro-organismos, detectar pontos de variabilidade genética e
1050 estabelecer a relação filogenética entre as cepas estudadas. Se houver,
1051 também, diferenças entre resultados obtidos em métodos fenotípicos e
1052 genotípicos, como os de susceptibilidade a antimicrobianos, pode-se aplicar a
1053 técnica, pois ela é capaz de detectar todos os genes descritos relacionados à
1054 resistência antimicrobiana (GILCHRIST et al., 2015; AHRENFELDT et al.,
1055 2017).

1056 Existem pesquisas com *Salmonella* que comprovam a superioridade da
1057 capacidade discriminatória do sequenciamento genético comparada a outras
1058 técnicas de sorotipagem ou moleculares (KOSER et al., 2012; DENG et al.,
1059 2015).

1060 Ibrahim e Morin (2018) efetuaram análise retrospectiva em 1041 estirpes
1061 de *Salmonella* spp isoladas entre os anos de 1999 e 2017 a partir de amostras
1062 ambientais, rações de animais e alimentos. Eles submeteram as estirpes a
1063 sorotipagem em um primeiro momento, pela técnica tradicional, tendo como
1064 base o esquema de Kauffmann White e, depois, pela técnica de
1065 sequenciamento genômico e compararam os resultados obtidos. As duas
1066 técnicas tiveram coincidência em 86,4% das sorotipagens e o sequenciamento
1067 apontou divergência em 7,7%, além de identificar 62 estirpes (5,9%) que não
1068 eram previstas no esquema de Kauffmann White (IBRAHIM e MORIN, 2018).
1069 Essa análise mostra os benefícios da técnica de sequenciamento genômico e a
1070 tendência em utilizá-la nos estudos mais recentes para obter resultados mais
1071 acurados.

1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105

1106

1107

1108

CAPÍTULO 2

1109

1110

1111

1112

1113

1114 **Potencial virulento, susceptibilidade aos antimicrobianos e a relação**
1115 **filogenética de *Salmonella Typhimurium* isoladas de alimentos e humanos**
1116 **no Brasil.**

1117

1118

1119

1120 Artigo a ser publicado no periódico
1121 **Current Microbiology**

1122

1123

1124

1125

1126

1127

1128

1129

1130

1131

1132

1133

1134 Potencial virulento, susceptibilidade aos antimicrobianos e a relação filogenética de *Salmonella*
1135 *Typhimurium* isoladas de alimentos e humanos no Brasil
1136 **Guilherme Paz Monteiro¹, Eliane Pereira Mendonça^{1,2}, Fernanda Aparecida Longato dos Santos¹,**
1137 **Edson Campos Valadares Júnior¹, Roberta Torres de Melo¹, Phelipe Augusto Borba Martins**
1138 **Peres¹, Dália dos Prazeres Rodrigues³, Belchiolina Beatriz Fonseca¹, Daise Aparecida Rossi¹**

1139
1140 1. Laboratório de Epidemiologia Molecular, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG,
1141 Brasil.
1142 2. Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil.
1143 3. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Laboratório de Enterobactérias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
1144
1145

1146

1147 *Autor correspondente

1148 E-mail: guil.paz@hotmail.com (GPM)

1149

1150

1151

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160 **Resumo**

1161 *S. Typhimurium* é um dos sorovares mais envolvidos na salmonelose humana no Brasil, EUA e Europa.
 1162 Na maioria das vezes os quadros clínicos são gastroenterites autolimitantes, mas que podem evoluir para
 1163 casos de maior gravidade, com necessidade de antibioticoterapia. Nossa objetivo foi caracterizar e
 1164 verificar a disseminação de perfis de virulência e de resistência a antimicrobianos importantes para o
 1165 tratamento da salmonelose humana por de *S. Typhimurium* isoladas de alimentos e amostras clínicas no
 1166 Brasil entre 2011 e 2017. Quarenta e três cepas de *S. Typhimurium* (20 isoladas de alimentos e 23 de
 1167 pacientes humanos) foram submetidas à avaliação filogenética por meio da técnica *Pulsed Field Gel*
 1168 *Electrophoresis* (PFGE). A virulência foi analisada por meio da identificação de um painel de nove genes
 1169 (*invA*, *hilA*, *avrA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*, *sopE*, *spvC* e *sivH*) pela técnica da PCR. Quanto a resistência
 1170 antimicrobiana realizamos a análise comparativa genotípica, por meio da identificação de genes de
 1171 resistência (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* - β-lactâmicos e *qnrS* e *qnrA* - fluoroquinolonas) e fenotípica por meio da
 1172 determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os genes com maior ocorrência foram *invA*,
 1173 *agfA*, *hilA* e *sivH*, os genes *spvC* e *sopE* foram menos prevalente e *sefA* não foi detectado. Os perfis de
 1174 virulência permitiram inferir que as cepas possuíam potencial para infectar o hospedeiro e causar quadros
 1175 clássicos de gastroenterite e também mais graves. A alarmante resistência fenotípica a drogas das classes
 1176 dos carbapenêmicos e polimixinas (81,4% em ambos) alertam à emergência do problema no Brasil.
 1177 Assim como a resistência a ciprofloxacina (52,6%), droga de primeira escolha no tratamento da
 1178 Salmonelose humana. Nossa estudo mostra que não houve relação entre o caráter fenotípico e genotípico
 1179 da resistência antimicrobiana uma vez que apenas *bla_{TEM}* foi identificado em 37% das cepas, o que indica
 1180 envolvimento de outros genes ou mecanismos no fenótipo identificado. O PFGE agrupou 27/43 (62,8%)
 1181 cepas em dez *clusters* (A-J), 24 pulsotipos, sendo três deles clonais e 16/43 (37,2%) cepas apresentaram
 1182 perfis não relacionados. Cinco *clusters* (B, D, E, H e I) correlacionaram cepas de alimentos e humanos,
 1183 indicando possíveis infecções humanas veiculadas por alimentos. *S. Typhimurium* transmitida pelos
 1184 alimentos representa perigo à saúde pública pelo potencial gênico virulento e pelos desafios no tratamento
 1185 de cepas multirresistentes. Os resultados servem como alerta aos órgãos institucionais para a necessidade
 1186 de monitoramento desse sorovar quanto a virulência, resistência aos antimicrobianos e comparação gênica
 1187 entre cepas isoladas de alimentos e humanos infectados para determinar a disseminação de genótipos e
 1188 fenótipos, além das dificuldades no tratamento de infecções mais graves.
 1189

1190 **Palavras-chave:** Salmonelose. Patogenicidade. Multirresistência. PFGE.

1191

1192 **Abstract**

1193 *S. Typhimurium* is one of the main serotypes involved in human salmonellosis in Brazil, USA and
 1194 Europe. Most of the time the clinical conditions are self-limiting gastroenteritis, but they can evolve to
 1195 more serious problems, with the need for antibiotic therapy. The aim of this study was to characterize and
 1196 verify the dissemination of virulence and antimicrobial resistance profiles important for the treatment of

1197 human salmonellosis caused by *S. Typhimurium* isolated from food and clinical samples in Brazil
1198 between 2011 and 2017. Forty-three strains of *S. Typhimurium* (20 isolated from food and 23 from
1199 human patients) were submitted to phylogenetic evaluation using the *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
1200 (PFGE) technique. Virulence was analyzed by identifying a panel of nine genes (*invA*, *hilA*, *avrA*, *agfA*,
1201 *lpfA*, *sefA*, *sopE*, *spvC* and *sivH*) using the PCR technique. Regarding antimicrobial resistance, we
1202 performed the comparative genotypic analysis, through the identification of resistance genes (*bla_{TEM}*,
1203 *bla_{SHV}* - β -lactam and *qnrS* and *qnrA* - fluoroquinolones) and phenotypic through the determination of the
1204 minimum inhibitory concentration (MIC). The genes with the highest occurrence were *invA*, *agfA*, *hilA*
1205 and *sivH*, the *spvC* and *sopE* genes were less prevalent and *sefA* was not detected. The virulence profiles
1206 made it possible to infer that the strains had the potential to infect the host and cause classic
1207 gastroenteritis and also more severe symptoms. The alarming phenotypic resistance to drugs of the
1208 carbapenem and polymyxin classes (81.4% in both) alert to the emergence of the problem in Brazil. As
1209 well as resistance to ciprofloxacin (52.6%), the drug of first choice in the treatment of human
1210 Salmonellosis. Our study shows that there was no relationship between the phenotypic and genotypic
1211 character of antimicrobial resistance since that only *bla_{TEM}* was identified in 37% of the strains, which
1212 indicates the involvement of other genes or mechanisms in the identified phenotype. The PFGE grouped
1213 27/43 (62.8%) of the strains in ten clusters (A-J), 24 pulsotypes, three of which were clonal and 16/43
1214 (37.2%) strains had unrelated profiles. Five clusters (B, D, E, H and I) correlated food and human strains,
1215 indicating possible foodborne infections in humans. *S. Typhimurium* transmitted by food represents a
1216 danger to public health due to its virulent gene potential and the challenges in the treatment of multidrug-
1217 resistant strains. The results are a warning to institutional bodies for the need to monitor this serotype for
1218 virulence, resistance to antimicrobials and gene comparison between isolated strains of food and infected
1219 humans to determine the spread of genotypes and phenotypes, in addition to difficulties in treating more
1220 serious infections.

1221

1222 **Keywords:** Salmonellosis. Pathogenicity. Multidrug resistance. PFGE.

1223

1224

1225 **Introdução**

1226 A salmonelose é uma das mais prevalentes doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs),
1227 provavelmente por *Salmonella* spp ser um micro-organismo ubíquo, capaz de infectar hospedeiros de
1228 diferentes espécies e possuir grande variedade de sorovares [1]. Esse micro-organismo possui predileção
1229 pela colonização do trato intestinal de animais de sangue quente, como aves, suínos e bovinos, e dessa
1230 forma, durante o abate, contaminam a carne. No ambiente, as principais fontes de contaminação são a
1231 água, as fezes de animais e o solo [2, 3].

1232 Os alimentos mais incriminados na transmissão da salmonelose humana são a carne e os ovos de
1233 aves e seus derivados, mas também há envolvimento frequente de alimentos à base de carnes bovina e
1234 suína, vegetais, leite e água contaminados [4].

1235 No Brasil, apesar de a notificação de surtos alimentares e a identificação dos patógenos
1236 envolvidos não serem tão frequentes quanto nos EUA e Europa, nos casos em que o agente é identificado
1237 há destaque no envolvimento de *Salmonella*. O Ministério da Saúde reportou *Salmonella* spp como agente
1238 etiológico de 90% dos casos de DTAs registrados com patógenos identificados de 2007 a 2016 [5].

1239 Nos humanos, a salmonelose pode causar doenças com diferentes graus de gravidade, sendo
1240 mais comum os casos que apresentam quadro de gastroenterite autolimitante sem necessidade de
1241 antibioticoterapia. No entanto, casos mais complexos com infecção extra intestinal ou septicemia podem
1242 ocorrer e devem ser tratados com antimicrobianos eficazes [1].

1243 *S. Typhimurium* é um dos sorotipos mais envolvidos em surtos de origem alimentar [4] e no
1244 Brasil, destaca-se por ter sido reportado como o principal sorovar isolado de infecções sistêmicas em
1245 humanos [6]. Na União Europeia, em 2013, foi o segundo sorovar mais notificado como causa da
1246 salmonelose humana, correspondendo a 20,2% dos casos [7], e nos Estados Unidos foi apontado como o
1247 terceiro mais frequentemente isolado em humanos [4].

1248 A patogenicidade de *Salmonella* está associada a diversidade de seu aparato gênico, envolvendo
1249 genes de virulência e resistência aos antimicrobianos presentes principalmente nos plasmídeos e no
1250 cromossomo. Os genes de virulência são associados a diversas características que conferem às estirpes o
1251 potencial para infectar, invadir, colonizar e escapar do seu sistema imune do hospedeiro [8]. Uma
1252 preocupação adicional referente a esse patógeno está relacionada a disseminação de estirpes resistentes
1253 aos antimicrobianos, que podem ser transferidas ao homem por via alimentar [9].

1254 Conhecer o potencial virulento e monitorar a resistência aos antimicrobianos de patógenos
1255 alimentares zoonóticos contribui para o entendimento de sua epidemiologia, incluindo identificar
1256 possíveis fontes das infecções, emergência e disseminação de genótipos e fenótipos específicos. Essas
1257 informações são importantes para os órgãos institucionais reguladores e fiscalizadores, que podem
1258 implementar controles mais eficazes na prevenção da salmonelose humana. Dessa forma, objetivou-se
1259 caracterizar e verificar a disseminação de perfis de virulência e de resistência aos antimicrobianos de
1260 importância na medicina humana e veterinária em cepas de *S. Typhimurium* isoladas de alimentos e
1261 pacientes humanos no Brasil entre os anos de 2011 a 2017.

1262

1263 **Material e métodos**1264 **Origem das cepas**

1265 As 43 cepas de *S. Typhimurium* foram provenientes de amostras de alimentos (20) e humanos
1266 com quadro de salmonelose (23). As estirpes foram isoladas entre os anos de 2011 a 2017 e integram a
1267 Coleção Biológica de Bactérias de Interesse em Saúde Pública da FIOCRUZ (Instituto Oswaldo Cruz-
1268 RJ), que gentilmente cedeu os isolados e suas informações de origem (Tabela S1).

1269

1270 **Desenho do estudo**

1271 As cepas de *S. Typhimurium* foram submetidas à pesquisa de nove genes associados a
1272 patogenicidade de *Salmonella* spp, quatro genes relacionados a resistência aos antimicrobianos, a
1273 susceptibilidade fenotípica a quatro drogas representantes de três classes de antimicrobianos importantes
1274 na medicina humana e veterinária e realizada a genotipagem das cepas.

1275 Os resultados foram utilizados para determinar perfis de virulência e resistência que foram
1276 associados e discutidos com a similaridade/disseminação das cepas em relação aos locais de isolamento,
1277 associação e perigos à saúde humana.

1278

1279 **Genes associados à virulência e resistência**

1280 Foi utilizada a técnica de PCR para avaliar um painel composto por 13 genes, sendo nove
1281 associados à virulência (*invA*, *hilA*, *avrA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*, *sopE*, *spvC* e *sivH*) e quatro à resistência
1282 (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* - classe dos β-lactâmicos e *qnrS* e *qnrA* - classe das fluoroquinolonas). Os genes avaliados
1283 foram selecionados com base em estudos prévios [10-17] e em características importantes para o sucesso
1284 de infecção e sobrevivência das cepas, tais como: reconhecimento do hospedeiro, adesão, invasão, escape
1285 do sistema imune, potencial de replicação intra e extracelular, bem como, a resistência a antimicrobianos
1286 pertencentes às classes mais utilizadas na medicina humana e veterinária.

1287 A extração do DNA foi realizada com o kit Wizard Genomic Purification (Promega, EUA)
 1288 conforme orientações do fabricante, posteriormente quantificado em espectrofotômetro Nanodrop
 1289 (Thermo Scientific®).

1290 Para a reação de PCR, 200 ng/µL do DNA *template* foi amplificado em termociclador
 1291 (Eppendorf®, Alemanha) utilizando na reação o kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), os
 1292 pares de *primers forward* e *reverse* (Tabela 1) específicos para cada gene e água ultra-pura, em volume
 1293 final de 25µL.

1294 A cepa *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi utilizada como controle positivo e água ultra-pura
 1295 substituindo o DNA foi utilizada como controle.

1296 Em todas as reações a desnaturação inicial ocorreu à 94 °C por 5 minutos a extensão final à 72 °C
 1297 por 10 minutos, variando as condições de temperatura, tempo e o número de repetições de ciclagens para
 1298 cada um dos genes (Tabela 1).

1299 Após amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% imerso
 1300 em tampão TBE 0,5x (Invitrogen®, EUA), corado com Syber Safe (Invitrogen®). O marcador de 100pb
 1301 (Invitrogen®, EUA) foi utilizado como padrão de referência de peso molecular e as bandas resultantes
 1302 após a corrida foram visualizadas no transiluminador sob luz ultra-violeta (Loccus Biotecnologia®,
 1303 Brasil).

1304

1305

1306

1307

1308

1309

1310 **Tabela 1.** Genes e funções, condições de amplificação, tamanho do amplicon e referências utilizadas na
 1311 avaliação de *S. Typhimurium*.

| Gene | Sequência <i>Primers</i> (5'→ 3') | Amplicon (PB) | Função | Amplificação | Referência |
|-------------|---|---------------|------------------------|--|------------|
| <i>sefA</i> | GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC | 488 | Virulência- Fímbria | 35x (94°C, 45s / 50°C, 30s / 72°C, 90s) | [13] |
| <i>agfA</i> | TCCACAATGGGGCGGGCGCG CCTGACGCACCATTACGCTG | 350 | Virulência- Fímbria | 35x (94°C, 45s / 66°C, 30s / 72°C, | [10] |

| | | | | | |
|--------------------------|---|-----|----------------------------------|---|------|
| | | | | 90s) | |
| <i>lpfA</i> | CTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTAAACAGAAACCAGT | 250 | Virulência- Fímbria | 35x (94°C, 45s / 50°C, 30s / 72°C, 90s) | [12] |
| <i>sopE</i> | ACACACTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTCTGATGTTGACTGG | 398 | Virulência- Proteína efetora | 35x (94°C, 45s / 62°C, 30s / 72°C, 90s) | [15] |
| <i>avrA</i> | GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCCGCCGCC | 385 | Virulência- Proteína efetora | 35x (94°C, 45s / 62°C, 30s / 72°C, 90s) | [15] |
| <i>invA</i> | GTGAAATTATGCCACGTTGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC | 284 | Virulência- Invasão | 35x (94°C, 45s / 58°C, 30s / 72°C, 90s) | [13] |
| <i>hilA</i> | CTGCCGCAGTGTAAAGGATA CTGTCGCCTTAATCGCATGT | 497 | Virulência- Invasão | 35x (94°C, 45s / 50°C, 30s / 72°C, 90s) | [11] |
| <i>sivH</i> | CAGAATGCGAATCCTCGCAC GTATGCGAACAAAGCGTAACAC | 763 | Virulência- Invasão | 35x (94°C, 30s / 56°C, 45s / 72°C, 45s) | [14] |
| <i>spvC</i> | CGGAAATACCATCTACAAATA CCCAAACCCATACTTACTCTG | 669 | Virulência- plasmidial | 30x (93°C, 60s / 42°C, 60s / 72°C, 120s) | [18] |
| <i>bla_{TEM}</i> | CAGCGGTAAGATCCTGAGA ACTCCCCGTCGTGTAGATAA | 643 | Resistência- β-lactâmicos | 30x (94°C, 45s / 50°C, 45s / 72°C, 90s) | [16] |
| <i>bla_{SHV}</i> | GGCCGCGTAGGCATGATAGA CCCGGCGATTGCTGATTTC | 714 | Resistência- β-lactâmicos | 30x (94°C, 45s / 56°C, 45s / 72°C, 90s) | [16] |
| <i>qnrA</i> | AGAGGATTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC | 580 | Resistência- Fluoroquinolonas | 35x (95°C, 60s / 54°C, 60s / 72°C, 90s) | [17] |
| <i>qnrS</i> | GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGCG | 428 | Resistência- Fluoroquinolonas | 35x (95°C, 60s / 54°C, 60s / 72°C, 90s) | [17] |

1313 Concentração inibitória mínima (CIM)

1314 A CIM foi testada para quatro antimicrobianos pertencentes à três classes consideradas de
1315 importância crítica pela Organização Mundial da Saúde e indicadas para o tratamento de salmonelose
1316 humana [19], sendo eles: ceftriaxona (Triaxon – TEUTO, Brasil – classe dos β -lactâmico – subclasse das
1317 cefalosporinas de terceira geração), meropenem (Meropenem – TEUTO, Brasil – classe dos β -lactâmico –
1318 subclasse dos carbapenêmicos), ciprofloxacina (Ciprodez – Biovet, Brasil – classe das fluoroquinolonas)
1319 e colistina (Colis-tek - Opem Pharmaceuticals, Brasil – classe das polimixinas).

1320 A CIM foi determinada pela técnica da microdiluição conforme protocolo da *European*
1321 *Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* e a classificação das cepas em resistentes,
1322 intermediárias e sensíveis também seguiram o guia de *breakpoints* clínicos para bactérias pertencentes à
1323 ordem Enterobacteriales [20].

1324 Resumidamente, preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada na concentração
1325 correspondente a 0,5 na escala MacFarland, e preparadas em microplacas, oito concentrações dos
1326 antibióticos abrangendo valores superiores e inferiores aos *breakpoints* [21]. As concentrações máximas
1327 foram de 16,0 μ g/mL; 1,0 μ g/mL; 32,0 μ g/mL e 32,0 μ g/mL para ceftriaxona, ciprofloxacina, meropenem
1328 e colistina, respectivamente.

1329 Após, a suspensão bacteriana foi inoculada e as microplacas incubadas a 36°C por 16-20 horas.
1330 A leitura foi realizada visualmente com a determinação da CIM como correspondente à menor
1331 concentração onde não foi observada turvação. Para a classificação como resistentes foram utilizados os
1332 *breakpoints*: ceftriaxona e colistina (> 2 mg/L), ciprofloxacina ($> 0,0625$ mg/L) e meropenem (> 8 mg/L)
1333 [21].

1334 O caráter multirresistente da cepas foi determinado por meio do critério de Magiorakos et al.
1335 (2012) [22], que a define como sendo a resistência ou resistência intermediária a pelo menos um fármaco
1336 pertencente a três ou mais categorias de antimicrobianos, sejam elas classes ou subclasses.

1337 Em todos os testes, a cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo e no caso da
1338 colistina foi adicionado um segundo controle positivo, *E. coli* NCTC 13846, que é positiva para o gene
1339 *mcr-1*, associado a resistência a esta droga [20].

1340

1341

1342

1343 **Similaridade genética**

1344 A tipagem molecular foi realizada pela técnica *Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE,
1345 conforme o protocolo descrito pelo CDC (2013) [23], utilizando a *XbaI* (Invitrogen) como enzima de
1346 restrição. Os fragmentos do DNA total foram separados em gel de agarose 1% (SeaKem Gold), imersos
1347 em tampão TBE 0,5X e a eletroforese foi realizada no equipamento CHEF DRIII (Bio-Rad). Os géis
1348 foram corados com brometo de etídio e fotografados em transiluminador (Loccus, Brasil) sob luz UV.

1349 O dendrograma foi construído a partir da análise do padrão de restrição das bandas identificadas
1350 no software GelCompare II pelo método de análise UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de
1351 Dice. Foram consideradas clones as cepas com 100% de similaridade genética, *clusters* os grupos com
1352 similaridade igual ou superior a 80%, e perfis distintos, quando a similaridade era menor que 80% [24].

1353

1354 **Análise dos resultados**

1355 A estatística descritiva foi utilizada para a apresentação dos dados. Para comparar os perfis de
1356 virulência e resistência aos antimicrobianos determinados para cepas isoladas de humanos e alimentos foi
1357 utilizado o teste exato de Fisher com intervalo de confiança de 95%. As análises foram realizadas no
1358 software GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software, EUA)

1359

1360 **Resultados e discussão**

1361 **Genes de virulência**

1362 Houve 100% de positividade para os genes *invA*, *agfA*, *hilA* e *sivH*. O gene *avrA* foi identificado
1363 em 97,7% (42/43) das cepas, *lpfA* em 95,3% (41/43), *spvC* em 39,5% (17/43), *sopE* em 7% (3/43) e o
1364 *sefA* não foi identificado em nenhuma das 43 cepas. O teste de Fisher não apontou diferença ($p>0,05$) na
1365 prevalência dos genes entre as amostras de alimentos e humanos. Foram identificados cinco perfis de
1366 virulência distintos (Tabela 2), com todas as cepas apresentando positividade concomitante para pelo
1367 menos cinco genes.

1368 Os perfis mais prevalentes ($p<0,05$) foram P1 e P3, correspondendo a 37,2% (16/43) e 48,8%
1369 (21/43) do total de isolados, respectivamente, sendo P1 o mais virulento, apresentando sete dos nove

1370 genes pesquisados. A alta prevalência, associada a maior virulência de P1, demonstra o potencial de
 1371 disseminação deste genótipo frente aos demais, e possivelmente, um maior envolvimento em casos de
 1372 infecção humana.

1373

1374 **Tabela 2.** Perfis de virulência de *S. Typhimurium* isoladas de alimentos e humanos no Brasil entre 2011 e
 1375 2017

| Perfis de virulência | Alimentos (%) | Humanos (%) | N (%) |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| | N=20 | N=23 | N=43 |
| P1: <i>lpfA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>hilA</i> , <i>sivH</i> , <i>spvC</i> | 6 (30,0) ^a | 10 (43,5) ^a | 16 (37,2) ^a |
| P2: <i>lpfA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>sopE</i> , <i>hilA</i> , <i>sivH</i> | 1 (5,0) ^b | 2 (8,7) ^b | 3 (7,0) ^b |
| P3: <i>lpfA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>hilA</i> , <i>sivH</i> | 13 (65,0) ^a | 8 (34,8) ^a | 21 (48,8) ^a |
| P4: <i>lpfA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>hilA</i> , <i>sivH</i> , <i>spvC</i> | 0 (0,0) ^b | 1 (4,3) ^b | 1 (2,3) ^b |
| P5: <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>hilA</i> , <i>sivH</i> | 0 (0,0) ^b | 2 (8,7) ^b | 2 (4,7) ^b |

1376 Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo Teste Exato de Fisher (p<0,05).

1377

1378 O diferencial entre P1 e P3 é a presença do gene *spvC* no primeiro perfil. Este gene, presente
 1379 no *operon spvRABCD*, tem origem plasmidial e está mais associado aos sorotipos Enteritidis,
 1380 Typhimurium, Pullorum e Gallinarum, e relacionado à capacidade de proliferação bacteriana intra e extra
 1381 intestinal e ao escape do sistema imune do hospedeiro [25, 26]. Devido a presença deste gene, é provável
 1382 que o genótipo P1, assim como P4, onde *spvC* também foi detectado, sejam perfis mais invasivos e
 1383 tenham maior potencial para o desencadeamento de sintomas mais agudos durante a infecção,
 1384 comparados aos genótipos negativos para o gene *spvC*. Dentre todas as cepas, apenas três foram isoladas
 1385 de sangue humano (5T, 15T e 42T) e as três apresentam o genótipo P1, sugerindo que a presença do gene
 1386 *spvC* pode ter contribuído na gravidade da infecção.

1387 O perfil P2, apesar de ser um dos menos prevalentes, é o único onde foi detectada a presença
 1388 do gene *sopE*, que é um componente da membrana externa codificador da proteína SopE, proveniente de
 1389 um *operon*. Este gene está relacionado a invasão por causar deformações na membrana, rearranjos no
 1390 citoesqueleto das células do hospedeiro e indução da resposta pró-inflamatória [27], e provavelmente, a
 1391 presença deste gene maximiza o potencial invasivo das cepas. Além disso, a proteína SopE confere uma
 1392 vantagem na patogenia de *Salmonella*, beneficiando-a na competição com a microbiota natural do
 1393 hospedeiro, no entanto é importante ressaltar que não é o único determinante e mesmo estíples ausentes
 1394 para o gene *sopE* podem ser altamente infectantes [28]. Acredita-se que sua aquisição pode estar
 1395 associada a surtos epidêmicos, uma vez que Petrovska et al. [29] relataram que a expansão clonal de *sopE*

1396 resultou na associação desse gene a surtos de salmonelose no Reino Unido, passando de pouco incidente
1397 em 2005 para sua identificação em mais de um terço dos isolados epidêmicos em 2010 [29].

1398 A positividade dos genes *invA*, *agfA*, *hilA* e *sivH* em todos os isolados, bem como a alta
1399 prevalência de *avrA* e *lpfA* é condizente com outros estudos com o sorovar *Typhimurium* [28, 30-33].
1400 Mesmo sendo considerados conservados e consequentemente comuns em *Salmonella* é importante
1401 monitorar e acompanhar a evolução gênica dos diversos sorovares, já que as bactérias frequentemente
1402 modulam seu genoma, por aquisição, mutação ou perda de genes, que podem culminar em adaptações,
1403 conquistas de novos hospedeiros, mudança na prevalência dos sorovares e surtos epidêmicos [13, 34].

1404 A presença do gene *invA* em 100% das cepas era esperada, já que é altamente conservado no
1405 gênero *Salmonella*, e por esse motivo, já ter sido amplamente utilizado para identificação deste gênero.
1406 Está relacionado a capacidade de invasão e internalização nas células epiteliais do hospedeiro [26].

1407 Por estarem associados a adesão, capacidade de formação de biofilmes e adaptação ambiental,
1408 os genes *agfA* e *lpfA* auxiliam na perpetuação das cepas, que por expansão clonal acabam disseminando e
1409 facilitando a resistência em diversos tipos de ambientes [35]. Além disso, estes genes também têm papel
1410 importante na infecção do hospedeiro, pois transcrevem as proteínas responsáveis pela produção de
1411 fimbrias, que além de serem importantes na fase de adesão e produção de matriz extracelular para
1412 formação de biofilmes, também são essenciais para fixação e colonização das células epiteliais e
1413 sinalizam o início da expressão da virulência nos hospedeiros [36].

1414 Os genes *hilA*, *sivH* e *avrA* codificam produtos associados ao Sistema de Secreção do Tipo III
1415 (TTSS). O gene *hilA* está diretamente ligado a invasão celular e indução para a apoptose em macrófagos,
1416 atuando com um regulador central no reconhecimento do hospedeiro [26]. Por ser bastante conservado,
1417 também é considerado um gene alvo para identificação de *Salmonella* [37]. O gene *sivH* também exerce
1418 papel na invasão celular e colonização do hospedeiro, além de estar associado, assim como o gene *sopE*, a
1419 surtos [26]. O gene *avrA* é codificador da proteína efetora AvrA, que atua na colonização e crescimento
1420 populacional bacteriano e também limita a resposta imune do hospedeiro, induzindo a apoptose
1421 especialmente em fagócitos [31, 34, 38].

1422 O gene *sefA*, localizado no operon *sefABCDE*, codifica fimbrias associadas a evasão do
1423 sistema imune do hospedeiro e colonização das células epiteliais no intestino. A não detecção do gene
1424 *sefA* era esperada, uma vez que é restrito ao grupo D (sorotipos Enteritidis, Blegdon, Moscow e Dublin),
1425 sendo inclusive considerado *target* para identificação deste grupo [39]. Este gene foi incluído na pesquisa

1426 com o objetivo de monitorar, se assim como outros genes, pode ser transferido para outros sorovares. A
1427 ausência de *sefA* não compromete o potencial invasivo e de evasão do sistema imune, já que outros genes
1428 como por exemplo, *invA* e *spvC*, podem respectivamente desempenhar estas mesmas funções.

1429 De maneira geral, os perfis de virulência identificados permitem inferir que este grupo de cepas
1430 possui aparato gênico potencial para infectar, colonizar, multiplicar e escapar do sistema imune do
1431 hospedeiro, e em alguns casos, evoluir para quadros mais invasivos e severos de salmonelose humana.

1432

1433 Resistência aos antimicrobianos

1434

1435 Os percentuais de resistência e/ou resistência intermediária encontrados para *S. Typhimurium*
1436 foram: meropenem, 81,4% (35/43) de resistência intermediária; colistina, 81,4% (35/43) de resistência;
1437 ceftriaxona 23,2% (10/43) de resistência e 44,2% (19/43) de resistência intermediária e ciprofloxacina
1438 41,9% (18/43) de resistência (Tabela 3).

1439 Não houve diferença entre a resistência das cepas para meropenem, colistina e ceftriaxona, mas a
1440 resistência a ciprofloxacina foi significativamente menor ($p<0,05$). Apesar da menor resistência, nossos
1441 resultados concordam com o alerta de Lin et al. [40] para o aumento de resistência a este antimicrobiano
1442 na Ásia, onde obtiveram 39% de resistência após análise de 82 cepas de diferentes sorovares. A
1443 resistência a ciprofloxacina neste estudo, de 41,9%, contrasta com os resultados obtidos para *S.*
1444 *Heidelberg* isoladas de aves nos Estados Unidos, que não detectou nenhuma cepa resistente [41].

1445

1446

1447

1448

1449

1450

1451

1452

1453

1454

1455

1456 **Tabela 3.** Distribuição da CIM e percentuais de resistência e resistência intermediária em cepas de
 1457 *Salmonella Typhimurium* isoladas de amostras de alimentos e humanos no Brasil de entre 2011 e 2017.

| Concentração do antibiótico (mg/L) | MER | COL | CFT | CIP |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 0,0078 | NA | NA | NA | 16 |
| 0,0156 | NA | NA | NA | 4 |
| 0,0312 | NA | NA | NA | 4 |
| 0,0625 | NA | NA | NA | 1 |
| 0,125 | NA | NA | 1 | 11 |
| 0,25 | 5 | 4 | 1 | 4 |
| 0,5 | - | 1 | 4 | 2 |
| 1 | 1 | - | 8 | 1 |
| 2 | 2 | 3 | 19 | NA |
| 4 | 18 | 22 | 8 | NA |
| 8 | 17 | 10 | - | NA |
| 16 | - | - | 2 | NA |
| 32 | - | 3 | NA | NA |
| Total de resistência - R (%) | 0 (0,0) ^a | 35 (81,4) ^c | 10 (23,2) ^b | 18 (41,9) ^b |
| Total de resistência intermediária - I (%) | 35 (81,4) ^a | 0 ^b | 19 (44,2) ^c | 0 ^b |
| Total de R e I (%) | 35 (81,4) ^a | 35 (81,4) ^a | 29 (67,4) ^a | 18 (41,9) ^b |

1458 Legenda: MER – meropenem; COL - colistina; CFT - ceftriaxona; CIP - ciprofloxacina; (linha) –
 1459 ponto de corte de acordo com EUCAST(2019b); destaque cinza escuro: resistência; cinza claro:
 1460 resistência intermediária e R (%) - percentual de resistência; NA: concentração não avaliada. Letras
 1461 diferentes na linha indicam diferença significativa (Teste de Fisher p<0,05).

1462 ^t
 1463 Quinze perfis fenotípicos de resistência foram obtidos (Tabela 4). O perfil PVIII foi o mais
 1464 prevalente, incluindo 30,4% (13/43) isolados, que apresentaram resistência à colistina e resistência
 1465 intermediária à ceftriaxona e meropenem concomitantemente. Os outros dois perfis mais frequentes foram
 1466 PIV (resistência a colistina e ciprofloxacina e resistência intermediária ao meropenem) e PV (resistência à
 1467 ceftriaxona e colistina e intermediária para meropenem), ambos presentes em 11,7% (5/43) dos isolados.

1468 Os nove primeiros perfis foram classificados como multirresistentes segundo o critério de
 1469 Magiorakos et al. [22] e juntos representam 72,1% (31/43) do total de cepas, sendo 12 provenientes de
 1470 alimentos e 19 de humanos, sem diferença significativa pelo teste exato de Fisher (p<0,05).

1471 Os perfis multirresistentes PV e PVIII incluíram 18 (41,7%) cepas e foi distribuído de forma
 1472 uniforme entre os isolados humanos e de alimentos. Mesmo multirresistentes, essas cepas foram
 1473 suscetíveis à ciprofloxacina, que é a droga de eleição para o tratamento de salmonelose humana [3].
 1474 Somados, o número de isolados multirresistentes de amostras clínicas humanas de PV e PVIII
 1475 representam 52,6% (10/19), isso significa que mesmo com elevada prevalência de multirresistência, em
 1476 mais da metade dos casos o tratamento pode seguir o protocolo usual com uso da ciprofloxacina. O alerta
 1477 fica para os demais perfis multirresistentes que demonstraram resistência a esta droga, por representarem
 1478 impacto direto na saúde pública devido aos desafios para o tratamento [42, 43].

1479

1480 **Tabela 4.** Perfis de resistência aos antimicrobianos em *S. Typhimurium* isoladas de alimentos e humanos
 1481 no Brasil entre 2011 a 2017.

| Perfis de resistência | Alimentos (%) | Humanos (%) | N (%) |
|---------------------------|---------------|-------------|------------------------|
| | N=20 | N=23 | N=43 |
| PI: CFT/COL/CIP/[MER] | 0 (0,0) | 1 (4,3) | 1 (2,3) ^b |
| PII: CFT/COL/CIP | 0 (0,0) | 2 (8,8) | 2 (4,6) ^b |
| PIII: COL/CIP/[CFT]/[MER] | 0 (0,0) | 1 (4,3) | 1 (2,3) ^b |
| PIV: COL/CIP/[MER] | 1 (5,0) | 4 (17,4) | 5 (11,7) ^{ab} |
| PV: CFT/COL/[MER] | 2 (10,0) | 3 (13,1) | 5 (11,7) ^{ab} |
| PVI: COL/CIP/[CFT] | 0 (0,0) | 1 (4,3) | 1 (2,3) ^b |
| PVII: CFT/CIP/[MER] | 1 (5,0) | 0 (0,0) | 1 (2,3) ^b |
| PVIII: COL/[CFT]/[MER] | 6 (30,0) | 7 (30,4) | 13 (30,4) ^a |
| PIX: CIP/[CFT]/[MER] | 2 (10,0) | 0 (0,0) | 2 (4,6) ^b |
| PX: COL/CIP | 2 (10,0) | 0 (0,0) | 2 (4,6) ^b |
| PXI: CFT/COL | 0 (0,0) | 1 (4,3) | 1 (2,3) ^b |
| PXII: COL/[MER] | 1 (5,0) | 1 (4,3) | 2 (4,6) ^b |
| PXIII: CIP/[MER] | 1 (5,0) | 2 (8,8) | 3 (7,1) ^b |
| PXIV: COL/[CFT] | 2 (10,0) | 0 (0,0) | 2 (4,6) ^b |
| PXV: [MER] | 2 (10,0) | 0 (0,0) | 2 (4,6) ^b |
| Total | 20 (100,0) | 23 (100,0) | 43 (100,0) |

1482 Legenda: N (%) - número e porcentagem de cepas resistentes; Colchetes: resistência intermediária. COL -
 1483 colistina; CFT - ceftriaxona; MER - meropenem; CIP - ciprofloxacina; destaque em cinza para
 1484 multirresistência (≥ 3 classes). Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa (Teste de
 1485 Fisher $p<0,05$).

1486

1487 O uso da ciprofloxacina como promotor de crescimento é proibido na produção animal desde
 1488 2009, sendo liberado apenas para uso terapêutico [44]. Apesar disso, os percentuais de resistência de
 1489 *Salmonella* para este fármaco vêm aumentando no Brasil. Mendonça et al. [45] encontraram 7% de

1490 resistência em 111 cepas de *S. Enteritidis* isolados de carne de frango, enquanto Pribul et al. [46]
1491 observaram resultados mais próximos aos deste estudo, com 42,6% de resistência, sendo o sorovar
1492 *Typhimurium* o mais associado a essa característica.

1493 No Brasil, a multirresistência de *S. Typhimurium* não é novidade. Um levantamento realizado
1494 em 2012 determinou que dentre 250 cepas, *S. Typhimurium* foi o segundo sorovar com maior prevalência
1495 de multirresistência (28%), apresentando resistência a pelo menos cinco antimicrobianos distintos,
1496 superado somente por *S. Enteritidis* (30%) [47]. A análise pontual da resistência a cada um dos
1497 antimicrobianos e seus impactos em saúde pública são preocupantes.

1498 Para o meropenem, apesar de não ter sido identificada resistência, mais de 80% das cepas
1499 apresentaram resistência intermediária, fato preocupante e que deve ser monitorado, já que sinaliza a
1500 tendência para a resistência futura. Considerada uma droga moderna e uma das últimas alternativas para o
1501 tratamento de cepas super resistentes, o meropenem é um beta-lactâmico pertencente a subclasse dos
1502 carbapenêmicos [48] com mecanismo de ação na inibição da síntese de peptideoglicanos [49]. No Brasil,
1503 a avaliação da eficácia de fármacos da mesma classe frente a diversos sorotipos de *Salmonella* não
1504 demonstrou resistência [48, 50], no entanto, nesses estudos, a resistência intermediária não foi discutida.

1505 Assim como o meropenem, a colistina (classe das polimixinas), também é considerada uma das
1506 últimas alternativas no tratamento de infecções por micro-organismos multirresistentes, e por isso
1507 considerada criticamente importante pela Organização Mundial da Saúde [19]. Encontramos altos níveis
1508 de resistência, 81,4% (35/43), para esta droga, o que também já foi observado por outros autores.
1509 Vinueza-Burgos et al. [51] avaliaram no Equador cepas de *S. Enteritidis* isoladas de frango de corte e
1510 encontraram 100% de resistência à colistina. No Hospital das Clínicas de São Paulo no Brasil, foram
1511 avaliados micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* isolados entre 2010 e 2014 de amostras
1512 clínicas humanas, verificaram tendência temporal para o aumento da resistência à colistina [52].

1513 Uma das hipóteses para a alta porcentagem de cepas resistentes a colistina é que este fenótipo
1514 pode ter emergido por pressão de seleção. Até o ano de 2016 esse antimicrobiano era utilizado no Brasil
1515 como promotor de crescimento na produção animal e seu uso para esse fim só cessou a partir da proibição
1516 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), se alinhando as preocupações
1517 internacionais e aos primeiros relatos de resistência à colistina no mundo [53]. Os altos índices de
1518 resistência relatados neste e em outros estudos supramencionados pode ser reflexo do uso da colistina por
1519 muito tempo na produção animal.

1520 Para ceftriaxona identificamos resistência em 23,2% (10/43) e resistência intermediária em
1521 44,2% (19/43) das cepas. Esta droga pertence à classe dos beta-lactâmicos e subclasse das cefalosporinas
1522 de 3^a geração, sendo utilizada principalmente para o tratamento de crianças, idosos e pessoas com o
1523 sistema imune comprometidos [54]. Também é considerada criticamente importante pela OMS [19] por
1524 seu uso em casos mais severos. Segundo Carattoli et al. [49] e Carson et al. [55], a ceftriaxona é uma das
1525 cefalosporinas a qual *Salmonella* apresenta maiores índices de resistência, e consideram que essa seja
1526 uma consequência do uso em larga escala do ceftiofur, uma droga de uso exclusivo veterinário, que
1527 acabou culminando em resistência cruzada para as ceftriaxonas, visto que as duas são drogas que
1528 pertencem a mesma subclasse.

1529

1530 **Genes de resistência antimicrobiana**

1531 Dos quatro genes de resistência avaliados, *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* relacionados a resistência aos beta-
1532 lactâmicos, e *qnrS* e *qnrA* às fluoroquinolonas, somente *bla_{TEM}* foi identificado em 37% (16/43) dos
1533 isolados, sendo oito cepas isoladas de alimentos e oito de humanos, sem diferença pelo teste exato de
1534 Fisher ($p<0,05$) ao comparar a prevalência nos dois grupos.

1535 Duas das 16 (12,5%) cepas positivas para o gene *bla_{TEM}* foram susceptíveis aos dois beta-
1536 lactâmicos ceftriaxona e meropenem, demonstrando que apesar de possuírem o gene associado a
1537 produção de beta-lactamases, não transcreveram esta característica. As demais cepas, 87,5% (14/16)
1538 foram fenotipicamente classificadas como intermediárias ou resistentes à pelo menos um dos dois
1539 betalactâmicos testados.

1540 A ausência dos genes *qnrA*, *qnrS* e *bla_{SHV}* em *S. Typhimurium* concorda com Mendonça [48],
1541 que avaliou a resistência aos antimicrobianos e genes de resistência nesse sorovar e em *S. Typhimurium*
1542 variante monofásica I4,[5],12:i:- isoladas de amostras avícolas em diversos estados do país. Somente o
1543 gene *bla_{TEM}* foi identificado em 35% das cepas de *S. Typhimurium* classificadas como fenotipicamente
1544 resistentes e em 46,7% das variantes monofásicas, valores próximos ao encontrado neste estudo.

1545

1546 **Similaridade genética**

1547 Dos 43 isolados, 27 (62,8%), apresentaram similaridade superior a 80% e foram inseridos na
1548 classificação de *clusters*/pulsotipos.

1549 Houve formação de dez *clusters* identificados com as letras de A a J e 24 pulsotipos, os quais
1550 foram identificados pela letra do *cluster* ao qual faz parte, acompanhados pela ordem numérica em que
1551 aparecem. Três pulsotipos clonais (100% de similaridade) foram identificados e 16 (37,2%) cepas
1552 apresentaram perfis distintos e não relacionadas (S2 Figura).

1553 Os *clusters* A, C, F e G tiveram duas cepas relacionadas em cada, sendo todas isoladas de
1554 humanos no Rio Grande do Sul. A maior amplitude de tempo entre isolamentos foi de três anos para os
1555 *clusters* A e G, e nos demais, foi de um ano. Os perfis de virulência e resistência (Tabelas 2 e 4) foram
1556 idênticos nos dois pulsotipos dos *clusters* C (P1 e PV) e G (P3 e PIV), no *cluster* A houve coincidência
1557 no perfil de resistência (PVIII) e em F no perfil de virulência (P1). O agrupamento de cepas clínicas no
1558 mesmo estado (RS) era esperado uma vez que os genótipos regionais tendem a ter maior similaridade.

1559 O *cluster* B, formado por cinco pulsotipos distintos, englobou duas cepas provenientes de
1560 humanos e três de alimentos isoladas entre 2011 e 2014. A similaridade entre os pulsotipos sugere a
1561 possibilidade de infecção de humanos pelo consumo de alimentos. A cepa 28T (pulsotipo B4), foi a única
1562 isolada em Minas Gerais, em amostra de farinha de resíduos, as demais são da região Sul do Brasil, sendo
1563 duas do estado de Santa Catarina e duas do Rio Grande do Sul. A origem deste genótipo possivelmente se
1564 deu na região Sul e a comercialização de produtos destinados à alimentação animal desta região para
1565 Minas Gerais provavelmente foi a causa da disseminação. O perfil de virulência do pulsotipo B3 (cepa
1566 7T) foi o P2, se diferenciando das demais apenas por ser positiva para o gene *sopE*, que foram
1567 classificadas no perfil P3. A aquisição do gene *sopE*, que é associado a cepas com potencial para causar
1568 surtos epidêmicos, pode ser a causa da sua presença em fezes de paciente com quadro clínico [26].
1569 Quanto à resistência fenotípica aos antimicrobianos, os resultados foram cepa-dependentes.

1570 Dois pulsotipos formaram o *cluster* D, sendo D1 isolado de fezes humanas em Santa Catarina
1571 (2013) e D2 isolado de aves no Rio Grande do Sul (2011), novamente sinalizando a infecção humana
1572 veiculada por alimentos, de genótipos comuns na região Sul. Os genes de virulência encontrados nas duas
1573 cepas foram os mesmos (Perfil P3) e a susceptibilidade antimicrobiana foi variável apenas para
1574 ceftriaxona, sendo a cepa de humanos sensível e a de alimento resistente.

1575 Quatro cepas de alimentos e uma isolada de sangue humano formaram o *cluster* E, dentre elas o
1576 pulsotipo clonal E3 (3T e 4T) isolados de alimentos na Bahia e Rio Grande do Sul respectivamente,
1577 ambas em 2012. A cepa 3T foi isolada de salada crua e a 4T de carne bovina resfriada. Sobre a cepa 4T,
1578 inferimos que por estar associada a bovinos é eliminada nas fezes desses animais, que normalmente são

1579 utilizadas para adubação de verduras e legumes. O comércio de gado ou mesmo de adubo para a Bahia
1580 seria suficiente para disseminação deste genótipo neste estado. Outro fato que reforça a ligação entre as
1581 cepas isoladas na Bahia e no Sul do país foi que o pulsotipo mais similar ao perfil clonal E3, foi o E4
1582 (cepa 9T), que também foi isolada de salada crua na Bahia no mesmo ano, além disso neste *cluster*, houve
1583 apenas isolados originados destes dois estados, reforçando a associação. A amostra 9T teve perfil de
1584 virulência P3, enquanto as demais foram todas P1 e a susceptibilidade aos antimicrobianos permaneceu
1585 sendo cepa-dependente.

1586 Outro perfil clonal, H1 (cepas 18T e 19T) e H2 (2T) compuseram o *cluster* H. As cepas
1587 presentes em H1 foram isoladas em 2017 em Minas Gerais, de carne mecanicamente separada (CMS) e
1588 orelha suína e são filogeneticamente semelhantes ao pulsotipo H2, isolado de fezes humanas no Rio
1589 Grande do Sul em 2015. Não se pode estabelecer adequadamente o sentido da disseminação, mas
1590 considerando que o isolado do Sul é mais antigo, e que no geral, a maioria das cepas deste estudo foram
1591 isoladas no Sul, inferimos que os estados dessa região são determinantes para a disseminação dos
1592 genótipos pelo país. As cepas clonais apresentaram os mesmos perfis para virulência e resistência.

1593 No *cluster* I houve associação entre cepas isoladas em Minas Gerais (23T) e Rio Grande do Sul
1594 (38T) e também sinalizou o agrupamento de cepas humanas com alimentos de origem suína. A cepa 38T
1595 foi isolada em 2012 em fezes humanas no Rio Grande do Sul e a 23T em 2014 em linguiça suína em
1596 Minas Gerais. Além da relação entre os estados, a associação entre carne suína e doença humana indica
1597 que há necessidade de estudos no Brasil que verifiquem a importância da cadeia de produção suína na
1598 disseminação de genótipos e como fonte de infecção de humanos.

1599 Finalmente, o *cluster* J foi formado por duas cepas clonais. A cepa 22T foi isolada em 2011 no
1600 Paraná e a 21T em 2016 em Santa Catarina, ambas de origem avícola. A identificação de clones em cepas
1601 isoladas com tantos anos de diferença não era esperada, mas *Salmonella* spp possui mecanismos de
1602 adaptação ambiental, como os ligados a formação de biofilmes, que contribuem para a persistência e
1603 disseminação de genótipos que passam a ser isolados repetidamente na cadeia de produção de alimentos
1604 [56].

1605 **Conclusão**

1606 As cepas de *S. Typhimurium* demonstraram possuir aparato gênico de virulência que
1607 potencialmente as capacitam a causar salmonelose em humanos, inclusive com quadros clínicos mais
1608 graves. Os resultados também sinalizam para dificuldades no tratamento devido aos altos índices de

1609 multirresistência. Particularmente, os percentuais de resistência à colistina e a resistência intermediária ao
1610 meropenem são preocupantes, uma vez que comprometem as últimas alternativas de tratamento em
1611 infecções causadas por agentes multirresistentes. A similaridade genética entre cepas isoladas de
1612 alimentos e humanos sugere a infecção pela via alimentar e demonstram o perigo que representam para a
1613 saúde pública.

1614

1615 **Agradecimentos**

1616 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - código de
1617 Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) –
1618 Processo 442778/2016-3 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e
1619 também à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo fornecimento das cepas.

1620

1621

1622

1623

1624

1625

1626

1627

1628 **Referências**

1629 1. World Health Organization (WHO). Typhoid vaccines: WHO position paper. WHO WER. 2018;
1630 13: 153–72.

1631 2. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and
1632 sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016; EFSA, 2017. (Acesso
1633 26 Novembro, 2019, em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5500>.)

1634 3. Ministério da Saúde (MS, Brasil). Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: MS,
1635 2018. (Acesso 21 Agosto, 2019, em:
1636 <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>.)

1638 4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Multidrug-
1639 Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Contact with Dairy Calves: CDC, 2018.
1640 (Acesso 11 Agosto, 2019, em: <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>.)

1641 5. Ministério da Saúde (MS, Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de
1642 Vigilância de Doenças Transmissíveis. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil:
1643 MS, 2016.

1644 6. Reis RO dos, Souza MN, Cecconi MCP, Timm L, Ikuta N, Simon D. et al. Increasing prevalence
1645 and dissemination of invasive nontyphoidal *Salmonella* serotype Typhimurium with multidrug
1646 resistance in hospitalized patients from southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2018; 22: 424-432

1647 7. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and
1648 sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 2015; 13: 162.

1649 8. Lupolova N, Dallman TJ, Holden NJ, Gally DL. Patchy promiscuity: machine learning applied
1650 to predict the host specificity of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Microb.*
1651 *Genom.* 2017; 3: e000135.

1652 9. Tack DM, Marder EP, Griffin PM, Cieslak PR, Dunn J, Hurd S. et al. Preliminary Incidence and
1653 Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne
1654 Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015–2018. *MMWR.* 2019; 68: 369-373.

1655 10. Collinson SK, Dig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW. Thin, aggregative fimbriae
1656 mediate binding of *Salmonella Enteritidis* to fibronectin. *J Bacteriol.* 1993; 175: 12–18.

1657 11. Guo X, Chen J, Beuchat LR, Brackett RE. PCR Detection of *Salmonella enterica* serotype
1658 Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hilA*. *Appl Environ Microbiol.*
1659 2000; 66: 5248-5252.

1660 12. Heuzenroeder MW, Murray CJ, Dalcin RM. Molecular basis of benign colonization of
1661 *Salmonella* Sofia in chickens. *RIRDC,* 2001; 106.

1662 13. Oliveira SD, Santos LR, Schuch DM, Silva AB, Salle CT, Canal CW. Detection and
1663 identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet Microbiol.* 2002; 87:25-
1664 35.

1665 14. Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, De Zoete MH, Winter S, Papaconstantinopoulou A
1666 et al. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype
1667 Typhimurium: Identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect*
1668 *Immun.* 2003; 71: 629–640.

1669 15. Prager R, Rabsch W, Streckel W, Voigt W, Tietze E, Tschape H. Molecular properties of
1670 *Salmonella* enteric Serotype Paratyphi B Distinguish between Its Systemic and Its Enteric
1671 Pathovars. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4270-4278.

1672 16. Chen S, Zhao S, White DG, Schroeder CM, Lu R, Yang H. et al. Characterization of multiple-
1673 antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol.*
1674 2004; 70: 1-7.

1675 17. Cattoir V, Weill FX, Poirel L, Fabre L, Soussy C, Nordmann P. Prevalence of *qnr* genes
1676 in *Salmonella* in France. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:751-754.

1677 18. Castilla KS, Ferreira CSA, Moreno AM, Nunes IA, Ferreira AJP. Distribution of virulence genes
1678 *sefC*, *pefA* e *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. *Braz J*
1679 *Microbiol.* 2006; 37: 135-139.

1680 19. World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine.
1681 Geneva: WHO; 2011.

1682 20. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Reading
1683 guide for broth microdilution. Version 1.0. EUCAST, 2019. (Acesso 22 Novembro, 2019, em:
1684 http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_m
1685 anuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf.)

1686 21. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for
1687 interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. EUCAST, 2019. (Acesso 22 Novembro,
1688 2019, em:
1689 http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Brea
1690 kpoint_Tables.pdf.)

1691 22. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multidrug-
1692 resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert
1693 proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;
1694 18: 268-281.

1695 23. Center Disease and Control (CDC). Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping
1696 of *Campylobacter jejuni* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). PulseNet USA. The
1697 National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance. CDC, 2013.

1698 24. Melo RT, Mendonça EP, Monteiro GP, Siqueira MC, Pereira CB, Peres PABM. et al. Intrinsic
1699 and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Front Microbiol.* 2017; 8:15.

1700 25. Barth S, Bauerfeind R. Virulence plasmids of *Salmonella enterica*: incidence and properties.
1701 *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2005; 118: 8-23.

1702 26. Borges KA, Furian TQ, Borsoi A, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP. Detection of
1703 virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil.
1704 *Pesq Vet Bras.* 2013; 33: 1416-1422.

1705 27. Mirmomeni MH, Kiani S, Sisakhtnezhad S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR
1706 amplification of the *sopE* gene and its cloning. *Pak J Biol Sci.* 2008; 11: 1497-1501.

1707 28. ElSheikh M, Abdeen EE, Ammar AM, Hussian A. Molecular Detection of Some Virulence
1708 Genes of *Salmonella* Serotypes Isolated From Poultry in Egypt. *Journal of Current Veterinary*
1709 *Research.*.. 2019; 1.

1710 29. Petrovska L, Mather AE, AbuOun M, Branchu P, Harris SR, Connor T. et al. Microevolution of
1711 monophasic *Salmonella* Typhimurium during epidemic, United Kingdom, 2005-2010. *Emerg*
1712 *Infect Dis.* 2016; 22: 617– 624.

1713 30. Ahmed HA, El-Hofy FI, Shafik SM, Abdelrahman MA, Elsaied GA. Characterization of
1714 Virulence-Associated Genes, Antimicrobial Resistance Genes, and Class 1 Integrons in
1715 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Isolates from Chicken Meat and Humans in Egypt.
1716 *Foodborne Pathog Dis.* 2016; 13: 281–288.

1717 31. Aravena C, Valencia B, Villegas A, Ortega M, Fernández AR, Araya PR, et al. Caracterización
1718 de cepas clínicas y ambientales de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg
1719 aisladas en Chile. *Rev Med Chile.* 2019; 147: 24-33.

1720 32. Borges K, Furian T, Souza S, Salle C, Moraes H, Nascimento V. Antimicrobial Resistance and
1721 Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotypes Isolated from Poultry Sources in
1722 Brazil. *Braz J Poultry Sci.* 2019; 21.

1723 33. Von Hertwig AM, Neto DPA, de Almeida EA, Casas MRT, da Silva do Nascimento M. Genetic
1724 diversity, antimicrobial resistance and virulence profile of *Salmonella* isolated from the peanut
1725 supply chain. *Int J Food Microbiol.* 2019; 294: 50-54.

1726 34. Webber B, Borges KA, Furian TQ, Rizzo NN, Tondo EC, Santos RS et al. Detection of
1727 virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. *Rev Inst Med Trop*
1728 *São Paulo.* 2019; 61:e36.

1729 35. Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal
1730 mucosa. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12: 405-28.

1731 36. Yoo AY, Yu JE, Yoo H, Lee TH, Lee WH, Oh Ji, et al. Role of sigma factor E in regulation of
1732 *Salmonella* Agf expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 430: 131-136.

1733 37. Campioni F, Bergamini AMM, Falcão JP. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial
1734 resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in
1735 Brazil. *Food Microbiol.* 2012; 32: 254-264.

1736 38. Labriola JM, Zhou Y, Nagar B. Structural Analysis of the Bacterial Effector AvrA Identifies a
1737 Critical Helix Involved in Substrate Recognition. *Biochemistry.* 2018; 57: 4985-4996.

1738 39. Ochoa IMF, Rodriguez AV. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp.
1739 Review Article. *Rev Latinoam Microbiol.* 2005; 47: 25-42.

1740 40. Lin D, Chen K, Wai-Chin Chan E, Chen S. Increasing prevalence of ciprofloxacin-resistant
1741 food-borne *Salmonella* strains harboring multiple PMQR elements but not target gene
1742 mutations. *Sci. Rep.* 2015; 5: 14754.

1743 41. Nisar M, Kassem II, Rajashekara G, Goyal SM, Lauer d, Voss S et al. Genotypic relatedness and
1744 antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the
1745 midwestern United States. *J Vet Diagn Invest.* 2017; 29:370–375.

1746 42. Chiou CS, Hong Y, Liao Y, Wang Y, Tu Y, Chen B, et al. New Multidrug-Resistant *Salmonella*
1747 *enterica* Serovar Anatum Clone, Taiwan, 2015–2017. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25:144-147.

1748 43. Gupta R, Chauhan SL, Kumar S, Jindal N, Mahajan NK, Joshi VG. Carriage of Class 1 integrons
1749 and molecular characterization of *intI1* gene in multidrug-resistant *Salmonella* spp. isolates from
1750 broilers. *Vet World*. 2019; 12: 609–613.

1751 44. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa N°
1752 26, de 09 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de
1753 qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário
1754 Oficial da União, Brasília, Distrito Federal: Brasil, 2009.

1755 45. Mendonça EP, Melo RT, Nalevaiko PC, Monteiro GP, Fonseca BB, Galvão NN. et al. Spread of
1756 the serotypes and antimicrobial resistance in strains of *Salmonella* spp. isolated from
1757 broiler. *Braz J Microbiol*. 2019; 50: 515–522.

1758 46. Pribul BR, Festivo ML, de Souza MMS dos Prazeres Rodrigues D. Characterization of
1759 quinolone resistance in *Salmonella* spp. isolates from food products and human samples in
1760 Brazil. *Braz J Microbiol*. 2016; 47: 196–201.

1761 47. Ministério da Saúde (MS, Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).
1762 Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília,
1763 DF, MS Brasil, 2012. (Acesso 21 Novembro, 2019 em:
1764 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%83rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>).

1766 48. Mendonça EP. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de
1767 *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. Tese
1768 Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia. 2016. (Acesso 01 Dezembro, 2019 em:
1769 <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17625/1/CaracteristicasVirulenciaResistencia.pdf>).

1770 49. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum B-lactamase producers. *Clin Microbiol*
1771 *Infec*. 2008; 14: 117-123.

1772 50. Pandini JA, Pinto FGS, Muller JM, Weber LD, Moura AC. Ocorrência e perfil de resistência
1773 antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* sp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arq Inst*
1774 *Biol*. 2014; XX: 1-6.

1775 51. Vinueza-Burgos C, Cevallos M, Ron-Garrido L, Bertrand S, De Zutter L. Prevalence and
1776 Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter Age. *PLoS One*. 2016;
1777 11:e0159567.

1778 52. Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TSR, Almeida JN de, Duarte AJ da S. Emergence of
1779 colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years.
1780 *Braz J Infect Dis*, 2017; 21: 98–101.

1781 53. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) Instrução Normativa N°45,
1782 de 22 de novembro de 2016. Proibi, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da
1783 substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico
1784 melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito
1785 Federal: Brasil, 2016.

1786 54. Stefani LM, das Neves GB, Brisola MC, Crecencio RB, Pick EC, Araújo DN. *Salmonella*
1787 Heidelberg resistant to ceftiofur and disinfectants routinely used in poultry. Semina: Ciênc
1788 Agrár. 2018; 39: 1029-1036.

1789 55. Carson C, Li XZ, Agunos A, Loest D, Chapman B, Finley R. et al. Ceftiofur-
1790 resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg of poultry origin - a risk profile using the
1791 Codex framework. Epidemiol Infect. 2019; 147: e296.

1792 56. Parra-Suescún J, Agudelo-Trujillo JH, López-Herrera A. *Escherichia coli* lipopolysaccharides
1793 decrease molecular expression and activity of disaccharidases and aminopeptidases in weaned
1794 pigs. Rev Colomb Cienc Pecu. 2015; 28: 64-73.

1795

1796

1797

1798

1799

1800

1801

1802

1803

1804

1805

1806

1807

1808 **Informação Suplementar**

1809 **S1 Tabela. Identificação e dados do isolamento das cepas de *Salmonella* Typhimurium isoladas de**

1810 **alimentos e indivíduos infectados no Brasil, no período de 2011 a 2017.**

1811 ¹CBR = carne bovina resfriada; ²SBM = salada de batata com maionese; ³CMS = carne mecanicamente separada; ⁴FR = farinha de resíduos; ⁵CSC = carne suína congelada; ⁶Sec. = secreção; ⁷Cong. = congelado.

1813 **S2 Figura.** Dendrograma com padrões de DNA produtos do PFGE de isolados provenientes de amostras

1814 humanas e de alimentos de *S. Typhimurium*. A análise pelo método de Dice/UPGMA (tolerância de

1815 0,5%, otimização de 0,5%, similaridade > 80%.

1816

Informação Suplementar

1817 **S1 Tabela. Identificação e dados do isolamento das cepas de *Salmonella* Typhimurium provenientes**
 1818 **de alimentos e indivíduos infectados no Brasil, no período de 2011 a 2017.**

| Cepas | Isolamento | | | |
|-------|------------|----------|-------|------------------|
| | Ano | Fonte | Local | Amostra |
| 1T | 2015 | Humano | RS | Fezes |
| 2T | 2015 | Humano | RS | Fezes |
| 3T | 2012 | Alimento | BA | Salada Crua |
| 4T | 2012 | Alimento | RS | CBR ¹ |
| 5T | 2017 | Humano | RS | Sangue |
| 6T | 2013 | Alimento | SP | Carne Suína |
| 7T | 2014 | Humano | SC | Fezes |
| 8T | 2014 | Humano | SC | Fezes |
| 9T | 2012 | Alimento | BA | Salada Crua |
| 10T | 2014 | Humano | RS | Fezes |
| 11T | 2014 | Alimento | RS | SBM ² |
| 12T | 2016 | Alimento | RS | Peru |
| 13T | 2015 | Humano | RS | Fezes |
| 14T | 2012 | Humano | RS | Fezes |
| 15T | 2012 | Humano | RS | Sangue |
| 16T | 2011 | Alimento | GO | Aves |
| 17T | 2017 | Alimento | MG | Filé de Peito |
| 18T | 2017 | Alimento | MG | CMS ³ |
| 19T | 2017 | Alimento | MG | Orelha suína |
| 20T | 2015 | Humano | RS | Fezes |
| 21T | 2016 | Alimento | SC | CMS ³ |
| 22T | 2011 | Alimento | PR | Aves |
| 23T | 2014 | Alimento | MG | Linguiça Suína |
| 24T | 2016 | Humano | RS | Fezes |
| 25T | 2014 | Humano | RS | Fezes |
| 26T | 2015 | Alimento | MG | Aves |
| 27T | 2011 | Alimento | RS | Aves |

| 28T | 2014 | Alimento | MG | FR ⁴ | |
|-----|------|----------|----|---------------------------|--|
| 29T | 2011 | Humano | RS | Fezes | |
| 30T | 2015 | Humano | RS | Fezes | |
| 31T | 2012 | Alimento | MT | CSC ⁵ | |
| 32T | 2013 | Alimento | SC | CF | |
| 33T | 2016 | Humano | GO | Sec. ⁶ Abcesso | |
| 34T | 2016 | Humano | RS | Fezes | |
| 35T | 2014 | Humano | RS | Fezes | |
| 36T | 2015 | Humano | RS | Fezes | |
| 37T | 2017 | Humano | RS | Fezes | |
| 38T | 2012 | Humano | RS | Fezes | |
| 39T | 2013 | Alimento | SC | Aves | |
| 40T | 2011 | Alimento | MT | Peixe Cong. ⁷ | |
| 41T | 2013 | Humano | MG | Humano | |
| 42T | 2013 | Humano | RS | Sangue | |
| 43T | 2011 | Humano | RS | Fezes | |

1819 ¹CBR = carne bovina resfriada; ²SBM = salada de batata com maionese; ³CMS = carne mecanicamente separada; ⁴FR = farinha de resíduos; ⁵CSC = carne suína congelada; ⁶Sec. = secreção; ⁷Cong. = congelado.

1822

1823

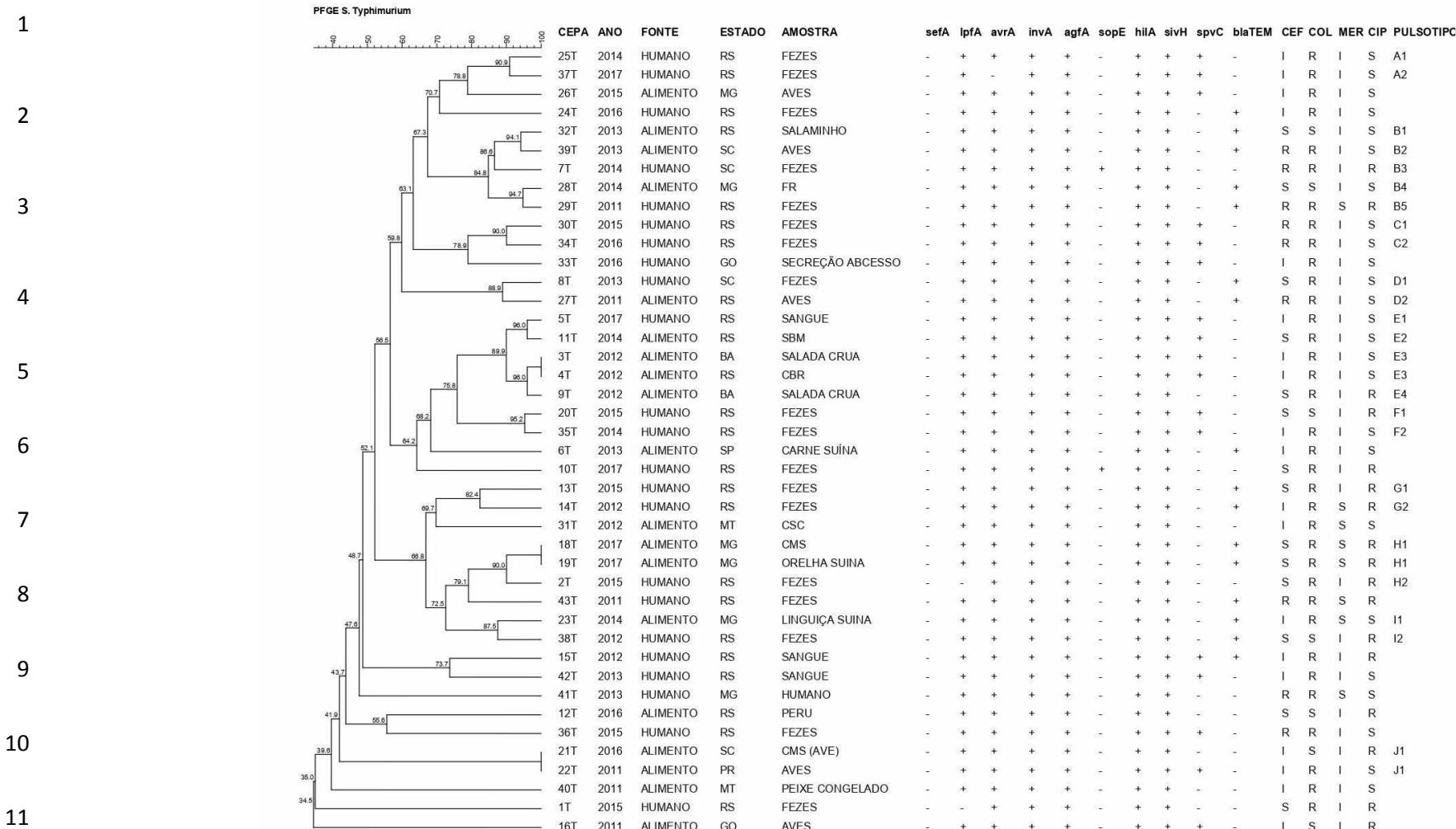
1824

1825

1826

1827

1828



12 **S2 Figura.** Dendrograma com padrões de DNA, produtos do PFGE de isolados provenientes de amostras humanas e de alimentos de *S. Typhimurium*. Análise pelo método de Dice/UPGMA (tolerância de 0,5%, otimização de 0,5%, clusterização > 80%).

13

***Salmonella* Heidelberg isoladas de alimentos e pacientes humanos no Brasil: perigo potencial a saúde pública?**

Guilherme Paz Monteiro¹, Eliane Pereira Mendonça^{1,2}, Edson Campos Valadares Júnior¹, Fernanda Aparecida Longato dos Santos¹, Roberta Torres de Melo¹, Phelipe Augusto Borba Martins Peres¹, Dália dos Prazeres Rodrigues³, Belchiolina Beatriz Fonseca¹, Rodrigo Profeta Silveira Santos⁴, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo⁴, Ana Laura Grazziotin¹, Daise Aparecida Rossi¹

⁴. Laboratório de Epidemiologia Molecular, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

⁵ Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil.

⁶. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Laboratório de Enterobactérias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

7. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

* Autor correspondente

Guilherme Paz Monteiro

Laboratório de Epidemiologia Molecular – Faculdade de Medicina Veterinária

Universidade Federal de Uberlândia

Rua Ceará, s/nº, Bloco 2D – sala 43, Uberlândia-MG, Brasil

Fone: +55 34 991472187

E-mail: guil.paz@hotmail.com

76 **Resumo**

77 Salmonelose é uma das doenças transmitidas pelos alimentos de maior impacto na saúde pública
78 mundial e *S. Heidelberg* tem despontado como sorotipo emergente, invasivo e capaz de causar
79 infecções severas, com frequente resistência aos antimicrobianos. Nossa abordagem envolveu
80 conhecer o potencial gênico virulento e de resistência aos antimicrobianos e a disseminação de
81 36 *S. Heidelberg* isoladas de alimentos e humanos no Brasil. Além de elucidar os mecanismos
82 associados à resistência por meio da análise do genoma completo de duas dessas cepas. As
83 cepas utilizadas foram isoladas de alimentos e amostras clínicas em distintos estados entre 2011
84 e 2017. A virulência foi analisada por meio da identificação de um painel de 9 genes pela PCR.
85 Quanto à resistência antimicrobiana realizamos a análise comparativa genotípica, por meio da
86 identificação de genes de resistência, e fenotípica por meio da determinação da CIM para
87 antimicrobianos de importância veterinária e humana. A similaridade genética dos isolados foi
88 realizada pela técnica *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e o sequenciamento genômico
89 total foi realizado no Illumina HiSeq 2500. As 36 cepas (100%) foram positivas para os genes
90 *invA*, *avrA*, *agfA* e *sivH*. A positividade de *hilA* foi de 94,4%, *lpfA* 91,7%, *sopE* 86,1%, *spvC*
91 2,8% e *sefA* não foi identificado. Seis diferentes perfis gênicos foram traçados, o mais
92 prevalente englobou 75% dos isolados com positividade para 7/9 genes avaliados. Quanto a a
93 susceptibilidade aos antimicrobianos, as cepas apresentaram 61,1% de resistência intermediária
94 ao meropenem, 69,4% de resistência à ciprofloxacina, 83,3% à colistina, e para ceftriaxona a
95 resistência foi de 77,8% e a resistência intermediária de 16,7%. Do total de cepas, 83,3% foram
96 classificadas como multiresistentes. O PFGE foi capaz de detectar quatro *clusters*, 19
97 pulsotipos, sendo um clonal e 16 perfis distintos, demonstrando em sua maioria similaridade nos
98 *clusters* associada a região dos isolados e a matriz alimentar, com alguns casos pontuais de
99 possível disseminação para humanos e outras regiões mais distantes. O sequenciamento
100 genômico detectou mais de cem genes associados à virulência e 43 genes de resistência em
101 ambas as cepas. *S. Heidelberg* possui fatores de virulência importantes para infectar o
102 hospedeiro e são em grande maioria multiresistentes aos antimicrobianos, representando um
103 risco potencial a saúde pública, já que sinalizam para quadros clínicos mais graves e de difícil
104 tratamento.

105

106 **Palavras-chave:** salmonelose, virulência, CIM, PFGE, sequenciamento genômico completo.

107

108 **Abstract**

109

110 Salmonellosis is one of the foodborne diseases with the greatest impact on public health
111 worldwide and *S. Heidelberg* highlights as an emerging invasive serotype capable of causing

112 severe infections, with frequent resistance to antimicrobials. Our approach involved knowing
113 the virulent gene potential and resistance to antimicrobials and the spread of *S. Heidelberg*
114 isolated from food and humans in Brazil. In addition to elucidating the mechanisms associated
115 with resistance through the analysis of the complete genome of two of these strains. The strains
116 used were isolated from food and clinical samples in different states between 2011 and 2017.
117 Virulence was analyzed through the identification of a panel of nine genes by PCR. Regarding
118 antimicrobial resistance, we carried out the comparative genotypic analysis, through the
119 identification of resistance genes, and phenotypic analysis, through the determination of MIC
120 for veterinary and human important antimicrobials. The genetic similarity of the isolates was
121 performed using the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique and the total genomic
122 sequencing was performed on the Illumina HiSeq 2500. The 36 strains (100%) were positive for
123 the *invA*, *avrA*, *agfA* and *sivH* genes. The positivity of *hilA* was 94.4%, *lpfA* 91.7%, *sopE*
124 86.1%, *spvC* 2.8% and *sefA* was not identified. Six different gene profiles were drawn, the most
125 prevalent encompassing 75% of the isolates with positivity for 7/9 of the evaluated genes. As
126 for susceptibility to antimicrobials, the strains showed 61.1% intermediate resistance to
127 meropenem, 69.4% resistance to ciprofloxacin, 83.3% to colistin, and for ceftriaxone the
128 resistance was 77.8% and the intermediate resistance was 16.7%. Of the total strains, 83.3%
129 were classified as multiresistant. The PFGE was able to detect four clusters with 19 pulsotypes
130 being one clonal and other 16 distinct profiles, mostly demonstrating similarities in the clusters
131 associated with the region of the isolates and the food matrix, with some occasional cases of
132 possible dissemination to humans from other distant regions. Genomic sequencing detected
133 more than 100 genes associated with virulence and 43 resistance genes in both strains. *S.*
134 *Heidelberg* have important virulence factors to infect the host and are largely multidrug-resistant
135 to antimicrobials, representing a potential risk to public health, as they signal for more severe
136 clinical conditions and are difficult to treat.

137

138 **Keywords:** salmonellosis, virulence, MIC, PFGE, whole genomic sequencing.

139

140 **1. Introdução**

141 A salmonelose é uma das doenças zoonóticas transmitidas pelos alimentos mais
142 prevalentes no mundo, com impacto na saúde pública em países como o Brasil, EUA e os que
143 compõem a União Europeia (UE) (EFSA, 2017; Brasil, 2018; CDC, 2018). O sintoma mais
144 comum é a gastroenterite, que pode ser acompanhada por náuseas, vômitos, febre e cólicas
145 abdominais, que geralmente são autolimitantes e desaparecem em até sete dias sem a
146 necessidade de antibioticoterapia, mas em casos mais graves, pode chegar a corrente sanguínea
147 e causar infecção extra intestinal e septicemia, podendo levar a óbito (WHO, 2018).

148 *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são os sorovares mais importantes e incidentes como
149 agentes etiológicos da salmonelose humana (CDC, 2018). Porém, *S. Heidelberg* tem despontado
150 como um sorotipo emergente, tanto pelo aumento de isolamentos em alimentos, como a carne
151 de frango e seus derivados (Souza, 2015), quanto pelo seu envolvimento em surtos humanos
152 (Nakao et al., 2018). Este sorovar é considerado invasivo e capaz de causar infecções humanas
153 com quadros mais severos e altas taxas de hospitalizações, além de apresentar frequente
154 resistência aos antimicrobianos (EFSA, 2019a; Etter et al., 2019).

155 Casos de infecção humana grave por *S. Heidelberg* resistentes aos antimicrobianos
156 comprometem a eficácia da terapia com antibióticos, e consequentemente, podem resultar em
157 falhas no tratamento. Além disso, cepas mais virulentas e resistentes podem ser a causa de
158 complicações clínicas graves, com necessidade ou aumento do tempo de hospitalização e alguns
159 casos de óbitos (Jajere, 2019).

160 A importância de *S. Heidelberg* na economia também tem sido observada. Durante os
161 meses de julho de 2018 a agosto de 2019, foram emitidas pelo *Rapid Alert System for Food and*
162 *Feed* (RASFF), 106 notificações rápidas devido a sua presença na carne de frango e seus
163 derivados produzidos no Brasil e exportados para a Europa. Estas notificações foram emitidas
164 por diferentes países europeus e classificadas em quase sua totalidade como séria quanto ao
165 risco pela autoridade europeia (RASFF, 2019).

166 Assim, observa-se a necessidade de um melhor conhecimento das características de
167 virulência e resistência deste sorovar utilizando técnicas microbiológicas e moleculares
168 modernas e padronizadas (Sedeik et al., 2019). O monitorando de *S. Heidelberg* alerta para a
169 eminência de resistência a drogas específicas (Jajere, 2019) e indicam a possível transmissão
170 vertical de genes, permitindo assim, inferir que há perigos associados a disseminação e à
171 possível infecção humana por sorovares específicos (Hiley, Graham & Jannison, 2019).

172 Apesar de todos os sorotipos de *Salmonella* spp. serem considerados como
173 potencialmente patogênicos, existem diferenças no seu potencial em causar doença e sua
174 gravidade (Karasova et al., 2009). Isso porque a bactéria pode perder ou adquirir genes por
175 recombinação e tornar-se mais adaptada ou invasiva, no ambiente e no hospedeiro,
176 respectivamente (Suez et al., 2013).

177 O Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo e o segundo maior
178 produtor, destinando cerca de um terço da produção para mercados da UE, Japão, China e
179 outros países. Este fato aliado ao alto consumo da carne de frango no Brasil e no mundo, e a
180 forte associação deste alimento com a veiculação de *Salmonella*, cria a necessidade de que o
181 Brasil esteja constantemente monitorando este patógeno e desenvolvendo métodos de prevenção
182 e controle objetivando garantir a inocuidade dos alimentos e a segurança do consumidor, bem
183 como a soberania da avicultura brasileira no exterior (ABPA, 2018).

184 Nossa abordagem objetiva demonstrar dados relacionados ao potencial gênico virulento,
185 resistência aos antimicrobianos e disseminação de genótipos e fenótipos de *S. Heidelberg*
186 isoladas de alimentos e pacientes humanos no Brasil, discutindo o perigo para a saúde humana.
187 Os achados podem auxiliar a subsidiar estratégias para o tratamento exitoso de *S. Heidelberg* em
188 humanos, além de contribuir na vigilância da resistência aos antimicrobianos e potencial
189 virulento desse sorovar.

190

191 2. Material e métodos

192

193 2.1 Amostras e amostragem

194 Foram utilizadas 36 cepas de *Salmonella* Heidelberg isoladas de alimentos (29) e de
195 indivíduos com salmonelose (7), durante o período de 2011 a 2017. As cepas foram
196 provenientes da coleção de culturas de Enteropatógenos Bacterianos, que integra a Coleção
197 Biológica de Bactérias de Interesse em Saúde do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ-RJ),
198 que também forneceu as informações sobre a sua origem (Tabela A.1).

199

200 2.2 Genes de virulência e resistência aos antimicrobianos

201

202 Foram pesquisados, individualmente, pela técnica de PCR, nove genes de virulência:
203 *invA*, *hilA*, *avrA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*, *sopE*, *spvC* e *sivH* e quatro genes associados a resistência aos
204 antimicrobianos: *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* (classe dos β-lactânicos) e *qnrS* e *qnrA* (classe das
205 fluoroquinolonas).

206 O DNA genômico foi extraído utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit
207 (Promega, EUA) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. As reações de amplificação
208 para o PCR foram realizadas com a utilização do kit GoTaq® Green Master Mix (Promega,
209 EUA), adicionando o par de *primers* específicos para cada gene alvo e completadas com água
210 ultra-pura até um volume final de 25µL. Ao mix foi adicionado o DNA *template* e a reação de
211 amplificação foi realizada em termociclador (*Eppendorf*®, Alemanha). Em todos os protocolos
212 para amplificação dos fragmentos, a desnaturação inicial foi de 94 °C/5min e a extensão final
213 ocorreu a 72 °C/10min, sendo as condições e os números de ciclos para cada gene adaptados a
214 partir de estudos anteriores descritos nas Tabelas 1 e 2. Como controle positivo das reações foi
215 utilizada a cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e como controle negativo foi utilizada água ultra-
216 pura em substituição ao DNA *template*.

217 Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%,
218 utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®, EUA) e como padrão de peso

219 molecular, o marcador de 100pb (Invitrogen®, EUA). O gel foi corado com Syber Safe
220 (Invitrogen®, EUA) e visualizado em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia®).

221 **Tabela 1.** Peso molecular (pb), fator de virulência, sequência dos *primers*, protocolo de amplificação e referências utilizadas para identificação de genes de
222 virulência em 36 SH provenientes de diferentes estados do Brasil e isoladas entre os anos de 2011 e 2017.

| Gene | Peso Molecular (PB) | Fator de Virulência | Primer (5'→ 3') | Amplificação | Nº de ciclos | Referência |
|-------------|---------------------|-----------------------|---|--|--------------|--|
| <i>sefA</i> | 488 | Fímbria | GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC | 94°C, 45seg 50°C, 30seg, 72°C, 90seg | 35 | (Oliveira et al., 2002) |
| <i>agfA</i> | 350 | Fímbria | TCCACAATGGGGCGGCGCG CCTGACGCACCATTACGCTG | 94°C, 45seg 66°C, 30seg, 72°C, 90seg | 35 | (Collinson et al., 1993) |
| <i>lpfA</i> | 250 | Fímbria | CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTAAACAGAAACCAGT | 94°C, 45seg 50°C, 30seg, 72°C, 90seg | 35 | (Heuzenroeder, Murray & Dalcin, 2001) |
| <i>sopE</i> | 398 | Proteína efetora | ACACACTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTCTGATGTTGACTGG | 94°C, 45seg 62°C, 30seg, 72°C, 90seg | 35 | (Prager et al., 2003) |
| <i>avrA</i> | 385 | Proteína efetora | GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCCGCCGCC | 94°C, 45seg 62°C, 30seg, 72°C, 90seg | 35 | (Prager et al., 2003) |
| <i>invA</i> | 284 | Invasão | GTGAAATTATGCCACGTTGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC | 94°C, 45seg 58°C, 30seg, 72°C, 90seg | 35 | (Oliveira et al., 2002) |
| <i>hilA</i> | 497 | Invasão | CTGCCCGAGTGTAAAGGATA CTGTCGCCCTTAATCGCATGT | 94°C, 45seg 50°C, 30seg, 72°C, 90seg | 35 | (Guo et al., 2000) |
| <i>sivH</i> | 763 | Invasão | CAGAATGCGAACCTTCGCAC GTATGCGAACAGCGTAACAC | 94°C, 30seg 56°C, 45seg, 72°C, 45seg | 35 | (Kingsley et al., 2003) |
| <i>spvC</i> | 669 | Virulência plasmidial | CGGAAATACCATCTACAAATA CCCAAACCCATACTTACTCTG | 93°C, 60seg 42°C, 60seg, 72°C, 120seg | 30 | (Castilla et al., 2006) |

224
225**Tabela 2.** Peso molecular (pb), classe de antimicrobianos, sequência dos *primers*, protocolo de amplificação e referências utilizadas para identificação de Genes de resistência em SH.

| Gene | Peso Molecular (PB) | Classe de Antimicrobianos | Primer (5'→ 3') | Amplificação | Nº de ciclos | Referência |
|--------------------------|---------------------|---------------------------|--|---|--------------|----------------------|
| <i>bla_{TEM}</i> | 643 | β-lactâmicos | CAGCGGTAAGATCCTTGAGA ACTCCCCGTCGTAGATAA | 94°C, 45seg 50°C, 45seg, 72°C, 90seg | 30 | Chen et al., 2004 |
| <i>bla_{SHV}</i> | 714 | β-lactâmicos | GGCCCGTAGGCATGATAGA CCCGGCGATTGCTGATTTC | 94°C, 45seg 56°C, 45seg, 72°C, 90seg | 30 | Chen et al., 2004 |
| <i>qnrA</i> | 580 | Fluoroquinolonas | AGAGGATTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTGAC | 95°C, 60seg 54°C, 60seg, 72°C, 90seg | 35 | Cattoir et al., 2007 |
| <i>qnrS</i> | 428 | Fluoroquinolonas | GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTCGGCG | 95°C, 60seg 54°C, 60seg, 72°C, 90seg | 35 | Cattoir et al., 2007 |

226

227 2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

228
229 A determinação da CIM para os antimicrobianos ceftriaxona, ciprofloxacina,
230 meropenem e colistina foi realizada pela técnica da microdiluição em caldo descrita no
231 *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2020).232 Resumidamente, preparou-se a suspensão bacteriana com colônias puras em NaCl
233 0,85% até atingirem a concentração correspondente a escala 0,5 de MacFarland e preparadas
234 diluições para obter oito concentrações dos antimicrobianos, a partir dos valores máximos,
235 sendo eles: ceftriaxona (16,0 μ g/mL), ciprofloxacina (1,0 μ g/mL), meropenem e colistina (32,0
236 μ g/mL). As diferentes concentrações dos antibióticos e suspensão bacteriana foram adicionadas
237 às placas de micro diluição e incubadas a 36°C por 16 a 20 horas. A leitura foi realizada
238 visualmente, sendo considerada a CIM, a menor concentração de antibiótico em que não houve
239 turvação do caldo.240 Para classificação da susceptibilidade foram utilizados os pontos de corte para à
241 família Enterobacteriales, (EUCAST, 2019b): ceftriaxona (Triaxon – TEUTO, Brasil) e colistina
242 (Colis-tek - Opem Pharmaceuticals, Brasil) $> 2 \text{ mg.L}^{-1}$, ciprofloxacina (Ciprodez – Biovet,
243 Brasil) $> 0,0625 \text{ mg.L}^{-1}$ e meropenem (Meropenem – TEUTO, Brasil) $> 8 \text{ mg.L}^{-1}$.244 A classificação das cepas como multirresistentes foi realizada conforme proposto por
245 Magiorakos et al. (2012), que utiliza os pontos de corte propostos pelo *Clinical & Laboratory*
246 *Standards Institute* (CLSI), EUCAST e *Food and Drug Administration* (FDA) para definir
247 multirresistência como sendo a não suscetibilidade (resistência ou resistência intermediária) a
248 pelo menos um agente em três ou mais categorias (classes e/ou subclasses) de antimicrobianos.249 A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo. Para a colistina foi
250 incorporado um segundo controle positivo, a cepa *E. coli* NCTC 13846, positiva para o gene
251 *mcr-1*, conforme recomendado no EUCAST (EUCAST, 2019b).252
253 2.4 Similaridade genética (PFGE)254
255 A técnica de PFGE foi realizada conforme protocolo descrito pelo CDC (2013), com a
256 digestão do DNA genômico realizada com 30U da enzima *Xba*I (Invitrogen) por 2 horas a 25°C.
257 Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1% (SeaKem Gold) em tampão
258 TBE 0,5X no aparelho CHEF DRIII (Bio-Rad) por 19 horas, com os seguintes parâmetros,
259 200v, ângulo de 120°, gradiente de 6v / cm e temperatura do tampão de 14°C. Os géis foram
260 corados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV.261 A construção do dendrograma foi realizada utilizando o *software* GelCompare II,
262 utilizando a análise UPGMA e o coeficiente de similaridade de Dice, considerando como perfis

263 distintos, a similaridade inferior a 80%, *clusters* a similaridade \geq 80% e clones quando havia
264 100% de similaridade (Melo et al., 2017).

265

266 2.5 Sequenciamento genômico e montagem dos genomas

267

268 Para o sequenciamento foram selecionadas duas cepas de origem e anos distintos, com
269 similaridade $<80\%$ no PFGE.

270 O DNA foi extraído por lise mecânica (Souza et al., 2019), seguido de purificação com
271 fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1) e precipitação com etanol a 70% e acetato de
272 sódio 3M. A qualidade do DNA genômico foi avaliada por análise de eletroforese em gel de
273 agarose. Uma biblioteca de 450 pb foi preparada com o kit de preparação de bibliotecas e
274 fragmentação rápida de DNA NEBNext (New England Biolabs, Ipswich, NE, EUA) e sua
275 qualidade avaliada com o Agilent 2100 Bioanalyzer. O sequenciamento completo do genoma
276 foi realizado usando o Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, EUA).

277 Para a montagem dos genomas, as leituras de DNA genômico tiveram sua qualidade
278 avaliada usando o FastQC. A montagem de novo (ab initio) foi realizada usando os montadores
279 SPAdes (v3.9.1) e Edena. A qualidade de cada montagem foi observada no QUAST, e a melhor
280 montagem foi selecionada. A presença de plasmídeos foi avaliada usando o PlasmidFinder
281 (v1.3) (Souza et al., 2019) e a triagem *in silico* dos genes de virulência e resistência a drogas foi
282 realizada usando os bancos de dados de referência VFDB e CARD, respectivamente.

283

284 2.6 Análise dos resultados

285

286 Foi utilizada estatística descritiva para apresentar os resultados. Para avaliar as
287 diferenças entre os perfis de virulência, resistência aos antimicrobianos e os perfis de resistência
288 foi aplicado o teste exato de Fisher, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 8.0
289 (GraphPad Software, EUA) com intervalo de confiança de 95%.

290

291 3. Resultados e discussão

292

293 3.1 Genes de virulência

294 Das 36 cepas, 100% foram positivas para os genes *invA*, *avrA*, *agfA* e *sivH*, 94,4%
295 (34/36) para o gene *hilA*, 91,7% (33/36) para *lpfA*, 86,1% (31/36) para *sopE* e 2,8% (1/36) para
296 *spvC*. O gene *sefA* não foi identificado em nenhum dos isolados.

297 Todos os isolados, independente se provenientes de alimentos ou humanos,
298 apresentaram pelo menos cinco genes associados, sendo observados seis perfis de virulência

299 distintos. Os perfis de foram distribuídos de forma similar entre cepas isoladas de alimentos e de
 300 humanos ($p>0,05$) (tabela 3).

301

302

303 **Tabela 3.** Perfil gênico de virulência de *S. Heidelberg* isoladas de alimentos e humanos no
 304 Brasil de 2011 a 2017.

| Perfis de virulência | Alimentos | Humanos | N (%) N=36 |
|---|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | (%) N=29 | (%) N=7 | |
| P1: <i>lpfA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>sopE</i> , <i>hilA</i> , | 0 (0,0) ^a | 1 (14,3) ^a | 1 (2,8) ^a |
| P2: <i>lpfA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>sopE</i> , <i>hilA</i> , <i>sivH</i> | 23 (79,3) ^b | 4 (57,1) ^b | 27 (75,0) ^b |
| P3: <i>lpfA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>hilA</i> , <i>sivH</i> | 2 (6,9) ^a | 1 (14,3) ^a | 3 (8,2) ^a |
| P4: <i>lpfA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>sopE</i> , <i>sivH</i> | 2 (6,9) ^a | 0 (0,0) ^a | 2 (5,6) ^a |
| P5: <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>sopE</i> , <i>hilA</i> , <i>sivH</i> | 0 (0,0) ^a | 1 (14,3) ^a | 1 (2,8) ^a |
| P6: <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>agfA</i> , <i>hilA</i> , <i>sivH</i> | 2 (6,0) ^a | 0 (0,0) ^a | 2 (5,6) ^a |
| Total | 29 (100,0) | 7 (100,0) | 36 (100,0) |

305 Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo Teste Exato de Fisher ($p<0,05$).

306

307 O perfil mais prevalente foi o P2 ($p<0,05$) com 75% (27/36) dos isolados. Já o perfil
 308 mais virulento (P1), onde foram identificados todos os genes, com exceção do *sefA*, foi
 309 identificado em apenas uma cepa, a de número 23 (Tabela A.1), isolada de fezes humanas no
 310 estado de Goiás em 2015. Este genótipo específico serve como alerta para saúde pública, uma
 311 vez que foi o único em que foi encontrado o gene de origem plasmidial *spvC*, associado à
 312 proliferação bacteriana e escape do sistema imune (Borges et al., 2013), que é associado a
 313 quadros mais graves de salmonelose.

314 A presença do gene *invA* em todas as cepas era esperada, uma vez que é utilizado para
 315 identificação do gênero *Salmonella*, sendo responsável pelo reconhecimento do hospedeiro e a
 316 capacidade de internalização da bactéria durante a invasão das células epiteliais (Borges et al.,
 317 2013). Vários estudos corroboram a alta prevalência deste gene, incluindo Webber et al. (2019)
 318 em 126 cepas de *S. Heidelberg* isoladas de carcaça de frango no Brasil e Aravena et al. (2019),
 319 no Chile, em isolados clínicos e ambientais.

320 Os genes *agfA* e *lpfA*, encontrados respectivamente em 100% e 91,7% dos isolados, e
 321 ambos, em 100% dos isolados nos estudos de Weber et al. (2019) e Borges et al. (2013), estão
 322 associados a formação inicial de biofilmes e a adaptação ambiental. Essas características podem
 323 ser a causa da alta frequência nas cepas, já que aumentam as chances de persistirem no
 324 ambiente, e consequentemente, facilita sua disseminação. Estes genes também favorecem a
 325 invasão celular por codificarem a produção de fímbrias essenciais para a síntese de substâncias

326 polimérica extracelular, responsáveis pela formação da matriz em biofilmes (Darwin & Miller,
327 1999). Yoo e colaboradores (2013) também demonstraram que as fímbrias colaboram na
328 colonização do intestino e na expressão de virulência no hospedeiro.

329 Dentre os genes associados ao sistema de secreção do tipo III (TTSS), *avrA* e *sivH*
330 foram detectados em todos os isolados e *sopE* em 86,1% deles. Apesar de serem apontados na
331 maior parte dos estudos como altamente conservados, é importante manter seu monitoramento
332 nos diversos sorotipos de *Salmonella* a fim de identificar possíveis modulações, deleções e
333 aquisições gênicas, que podem possibilitar a adaptação de um sorotipo a novos hospedeiros e
334 emergir em surtos de salmonelose (Oliveira et al., 2002; Webber et al., 2019). A alta incidência
335 destes genes TTSS coincide com outros estudos (Kingsley et al., 2003; Borges et al., 2013;
336 Aravena et al., 2019; Webbet et al., 2019).

337 A importância da expressão do complexo TTSS na patogenia da salmonelose está
338 baseado em a proteína efetora AvrA limitar as respostas inflamatórias do hospedeiro induzindo
339 a apoptose celular, principalmente dos macrófagos (Bem-Barak et al., 2006), que é essencial
340 para a infecção e proliferação bacteriana (Labriola, Zhou & Nagar, 2018). Já o gene *sivH* está
341 relacionado as fases de invasão e colonização intestinal do hospedeiro, especialmente nas placas
342 de Peyer e o gene *sopE* é um dos genes codificadores de proteínas do operon *SopABCDE*, mais
343 especificamente a proteína SopE, um dos componentes da membrana externa que induz
344 deformações na membrana e rearranjos do citoesqueleto contribuindo para a invasão celular
345 (Mimomeni, Kiani & Sisakhtnezhad, 2008). A presença do gene *sivH* também está associada a
346 cepas com maior potencial para surtos epidêmicos (Borges et al., 2013).

347 O gene *hilA* também é componente do complexo TTSS e é um regulador central
348 requerido para reconhecimento e invasão celular e indução de apoptose de macrófagos
349 (Craciunas et al., 2012). Vários estudos apontam o gene *hilA* como um dos genes alvo para
350 identificação do gênero *Salmonella* (Campioni, Bergamini & Falcão, 2012; Craciunas et al.,
351 2012; Borges et al.; 2013). Porém, este gene foi identificado em 94,4% das cepas, coincidindo
352 com estudo de Webber et al. (2019) que detectaram positividade de 66% de 126 isolados de *S.*
353 Heidelberg, sugerindo que outros genes são mais indicados para a identificação do gênero.

354 O gene plasmidial *spvC* é um dos cinco genes presentes no operon *spvRABCD*,
355 associado especialmente aos sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S.*
356 *Gallinarum*. Este gene é reconhecido pelo seu envolvimento na proliferação bacteriana e escape
357 do sistema imune, mas também já foi relatado o seu envolvimento na replicação extra intestinal
358 (Barth & Bauerfeind, 2005; Borges et al., 2013). Assim como Webber et al. (2019), que
359 encontrou 4,1% de positividade em cepas isoladas de carcaças de frango, observamos baixa
360 incidência para este gene (1/36-2,8%). A presença desse gene em *S. Heidelberg* sinaliza a
361 possível aquisição horizontal via conjugação por *S. Heidelberg*, o que pode significar quadros
362 de salmonelose humana mais graves e dificuldades no tratamento.

363 Codificador da fímbria SEF14 e associado a colonização intestinal do hospedeiro, o
364 gene *sefA* está localizada no *operon sefABCDE*, e segundo a literatura está restrito ao grupo D
365 das salmonelas, com transcrição limitada aos sorovares Enteritidis, Moscow, Dublin e Blegdon
366 (Ochoa & Rodriguez, 2005). *S. Heidelberg* pertence ao grupo B e estudos recentes, assim como
367 o nosso, tem confirmado a ausência de *sefA* neste sorovar (Borges et al., 2018; Webber et al.,
368 2019).

369 Variações nas frequências dos genes de virulência em *S. Heidelberg* também foram
370 observadas por Webber et al. (2019), que demonstraram que cepas isoladas no Brasil entre os
371 anos de 2016 e 2017 têm apresentado maior variabilidade genética quando comparadas a cepas
372 isoladas em 2006. Os autores ainda acreditam que estas variações podem influenciar na
373 sobrevivência e capacidade de multiplicação das cepas, que teriam culminado na classificação
374 de *S. Heidelberg* como um sorotipo emergente nos últimos anos.

375

376 3.2 Concentração inibitória mínima

377

378 Não houve resistência para meropenem, mas 22 cepas (61,1%) apresentaram resistência
379 intermediária, indicando uma possível tendência de aquisição dessa característica, e ainda, uso
380 prudente e atenção na dose e tempo indicados na terapêutica. Para ciprofloxacina a resistência
381 foi de 69,4% (25/36), para colistina 83,3% (30/36), já para ceftriaxona foram determinadas
382 77,8% (28/36) cepas resistentes e 16,7% (6/36) com resistência intermediária (tabela 4).

383 As cepas foram agrupadas em oito perfis de resistência distintos (tabela 5). O perfil PI,
384 em que as cepas foram resistentes ao maior número de antimicrobianos, foi o mais frequente e
385 incluiu 41,7% (15/36) das cepas. Este perfil demonstra resistência simultânea para colistina
386 (polimixina), ceftriaxona (betalactâmico, subclasse das cefalosporinas de 3^a geração),
387 ciprofloxacina (fluoroquinolona), além de resistência intermediária ao meropenem
388 (betalactâmicos, subclasse dos carbapenêmicos). Esse resultado é preocupante, já que
389 caracteriza multirresistência segundo os critérios propostos por Magiorakos et al. (2012).

390 Além de PI, os perfis PII, PIII, PIV e PV também se enquadram nos critérios de
391 classificação como multirresistentes (Magiarakos et al., 2012) e juntos correspondem a 83,3%
392 (30/36) das cepas, sendo 25 cepas provenientes de alimentos e cinco de amostras clínicas. Não
393 houve diferença pelo teste de Fisher ($p=0,5732$) quando se comparou a multirresistência em
394 isolados de alimentos (25/29-86,2%) e humanos (5/7-71,4%) e no total, somente os perfis PI e
395 PII foram diferentes dos demais ($p<0,05$). Estes dois perfis, com cepas de maior resistência
396 incluiu 61,2% (22/36) das cepas. Nossos resultados concordam com o alerta que *S. Heidelberg*
397 vem apresentando crescente resistência aos antimicrobianos e, consequentemente, os índices de
398 multirresistência também vêm aumentando de forma preocupante (CIDRAP, 2017).

399

400 **Tabela 4.** Distribuição da CIM e da resistência aos antimicrobianos em *S. Heidelberg* isoladas
 401 de alimentos e humanos isoladas no Brasil, 2011 a 2017.

| Concentração do antibiótico (mg/L) | MER | COL | CFT | CIP |
|--|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 0,0078 | NA | NA | NA | 7 |
| 0,0156 | NA | NA | NA | 1 |
| 0,0312 | NA | NA | NA | 2 |
| 0,0625 | NA | NA | NA | 1 |
| 0,125 | NA | NA | - | 15 |
| 0,25 | 3 | - | - | 9 |
| 0,5 | - | - | - | 1 |
| 1 | 4 | - | 2 | - |
| 2 | 7 | 6 | 6 | NA |
| 4 | 10 | 9 | 7 | NA |
| 8 | 12 | 17 | 6 | NA |
| 16 | - | 4 | 15 | NA |
| 32 | - | - | NA | NA |
| Total de resistência - R (%) | 0 (0,0) ^a | 30 (83,3) ^b | 28 (77,8) ^b | 25 (69,4) ^b |
| Total de resistência intermediária - I (%) | 22 (61,1) ^a | -- | 6 (16,7) ^b | -- |
| Total de R e I (%) | 22 (61,1) ^a | 30 (83,3) ^{ab} | 34 (94,4) ^b | 25 (69,4) ^{ab} |

402 Legenda: MER – meropenem; COL - colistina; CFT - ceftriaxona; CIP - ciprofloxacina;
 403 (linha) – ponto de corte de acordo com EUCAST(2019b); destaque cinza escuro: resistência;
 404 cinza claro: resistência intermediária e R (%) - percentual de resistência; NA: concentração não
 405 avaliada. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa (Teste de Fisher $p<0,05$).

406

407 O perfil PIII foi o único que foi significativamente mais prevalente nas amostras
 408 clínicas ($p= 0,0076$) em comparação com as amostras de alimentos. Os isolados deste perfil
 409 apresentaram resistência para ceftriaxona e colistina e resistência intermediária ao meropenem e
 410 foram classificadas como multirresistentes. Apesar de a resistência a essas drogas ser motivo de
 411 alerta, detectamos sensibilidade a ciprofloxacina, que é a droga de primeira escolha no
 412 tratamento da salmonelose (Brasil, 2018), sugerindo que o tratamento de humanos infectados
 413 por este grupo de cepas pode acontecer conforme o usual, assim como no perfil PV.

414

415 **Tabela 5.** Perfis de resistência aos antimicrobianos de *S. Heidelberg* isoladas de alimentos e
 416 humanos no Brasil entre 2011 a 2017.

| Perfis de resistência | Alimentos (%) | Humanos (%) | N (%) N=36 |
|------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| | N=29 | N=7 | |
| PI: CFT/COL/CIP [MER] | 14 (48,3) | 1 (14,3) | 15 (41,7) ^A |
| PII: CFT/COL/CIP | 7 (24,1) | 0 (0,0) | 7 (19,5) ^{A,B} |
| PIII: CFT/COL [MER] | 2 (7,0) ^a | 4 (57,1) ^b | 6 (16,7) ^B |
| PIV: COL/CIP [CFT] | 1 (3,4) | 0 (0,0) | 1 (2,8) ^B |
| PV: COL [CFT] [MER] | 1 (3,4) | 0 (0,0) | 1 (2,8) ^B |
| PVI: CIP [CFT] | 2 (7,0) | 0 (0,0) | 2 (5,5) ^B |
| PVII: [CFT] | 1 (3,4) | 1 (14,3) | 2 (5,5) ^B |
| PVIII: Multi-sensíveis | 1 (3,4) | 1 (14,3) | 2 (5,5) ^B |
| Total | 29 (100,0) | 7 (100,0) | 36 (100,0) |

417 Legenda: N (%) - número e porcentagem de cepas resistentes; []: resistência intermediária. COL
 418 - colistina; CFT - ceftriaxona; MER – meropenem; CIP – ciprofloxacina; destaque em cinza
 419 para multirresistência (≥ 3 classes). Letras minúscula diferentes nas linhas e maiúsculas
 420 diferentes na coluna indicam diferença significativa (Teste de Fisher $p<0,05$).

421
 422 O perfil PVIII classificado como multi-sensível a todas as drogas avaliadas, agrupou
 423 5,5% (2/36) dos isolados, sendo uma cepa de alimento e uma de humano.

424 O meropenem é um betalactâmico pertencente a subclasse dos carbapenêmicos,
 425 considerado uma droga de última geração e utilizado apenas em quadros graves de salmonelose,
 426 especialmente em casos de estirpes multirresistentes (Mendonça, 2016). São drogas que atuam
 427 na parede bacteriana, capazes de interromper a síntese de peptideoglicanos (Carattoli, 2008).
 428 Dentre os antibióticos testados, foi o único para qual não foi identificada resistência de fato, no
 429 entanto, foi identificada resistência intermediária em 61,1% das cepas. Outros estudos
 430 realizados no Brasil, incluindo diversos sorotipos de *Salmonella*, dentre eles *S. Heidelberg*,
 431 determinaram 100% de sensibilidade aos carbapenêmicos, porém utilizando o imipenem
 432 (Pandini et al., 2014; Mendonça, 2016). Esta alta porcentagem de resistência intermediária
 433 sinaliza para a necessidade de monitoramento e vigilância constante, considerando que
 434 evolutivamente as bactérias tendem a sofrer pressões de seleção ou alterações gênicas que
 435 podem resultar em resistência.

436 O mecanismo de ação das fluorquinolonas está associado a interrupção da síntese de
 437 DNA por meio da inibição da DNA girase (Alterthum, 2008), sendo consideradas drogas de
 438 primeira escolha para o tratamento de pacientes com salmonelose (EFSA, 2017). A Organização
 439 Mundial de Saúde reconhece esta classe de medicamentos como de importância crítica na
 440 medicina humana, sugerindo a redução de seu uso na produção animal e o monitoramento
 441 constante, a fim de evitar a pressão de seleção para populações bacterianas resistentes (WHO,
 442 2011). No Brasil, desde 2009, o uso desses antimicrobianos como agente profilático ou como

443 promotor de crescimento foi proibido na produção animal, com uso permitido apenas na
 444 terapêuticos (Brasil, 2009).

445 Dentre as fluorquinolonas mais utilizadas, está a ciprofloxacina. Em estudo realizado
 446 nos EUA, nenhuma das cepas de *S. Heidelberg* apresentou resistência a este fármaco (Nisar et
 447 al., 2017). No Brasil, Mendonça (2016) analisou 111 isolados de *S. Enteritidis* provenientes de
 448 carcaças de frango e determinou 7,2% de resistência à ciprofloxacina, enquanto nesse estudo,
 449 encontramos valores bem superiores, 69,4%. Lin et al. (2015) na China, analisaram 82 isolados
 450 de diferentes sorovares de *Salmonella* provenientes de amostras de alimentos e determinaram
 451 39% de cepas resistentes a ciprofloxacina, afirmando que a resistência a classe das
 452 fluorquinolonas têm aumentado ao longo dos anos.

453 Acreditamos que a combinação de fatores como a emergência de *S. Heidelberg*, os
 454 estudos que sugerem que esse sorovar têm apresentado maior variabilidade genética nos últimos
 455 anos (Webber et al., 2019) e o uso constante de fluorquinolonas no tratamento de humanos e
 456 animais podem estar contribuindo para seleção de cepas resistentes, e consequentemente, para a
 457 disseminação deste fenótipo.

458 A ceftriaxona é um β -lactâmico, classificado como cefalosporina de 3^a geração, possui
 459 espectro de ação mais amplo em Gram negativas que os de 1^a e 2^a geração e é utilizada
 460 principalmente no tratamento de crianças, idosos e imunodeprimidos (Stefani et al., 2018). Este
 461 antimicrobiano é classificado pela OMS, como fármaco de importância crítica por ser uma das
 462 poucas alternativas em infecções de maior severidade (FAO/WHO, 2009).

463 *S. Heidelberg* isoladas de amostras avícolas no Brasil em 2005 apresentavam 38,4% de
 464 resistência para ceftriaxona, e este índice subiu para 100% em 2009 (Mion et al., 2014).
 465 Verificamos que nossas cepas apresentavam 77,8% de resistência e 16,7% de resistência
 466 intermediária, o que permite inferir, que há uma possibilidade deste antimicrobiano não poder
 467 mais ser considerado uma alternativa para tratamento de salmonelose humana.

468 Colistina é um fármaco pertencente a classe das polimixinas, um antimicrobiano
 469 peptídeo catiônico que possui atividade bactericida para Gram-negativas, considerado
 470 criticamente importante pela OMS, por ser uma das últimas opções no tratamento de infecções
 471 graves e com agentes multirresistentes (WHO, 2011). Os dados disponíveis na literatura
 472 parecem convergir para um aumento da resistência a esta droga nos últimos anos. Trabalhos
 473 mais antigos com *Salmonella*, como o de Rezende et al. (2005) relataram 100% de
 474 sensibilidade, já em 2013, Figueiredo e colaboradores (2013), encontraram 22% de resistência,
 475 em estudo realizado com 94 cepas de *Salmonella enterica*.

476 O alto índice de resistência a colistina determinado em *S. Heidelberg* neste estudo, de
 477 85%, é alarmante, considerando sua importância crítica e impacto negativo nas possibilidades
 478 de tratamento de casos graves. Ao mesmo tempo não é surpreendente, já que até o ano de 2016
 479 era utilizado amplamente na produção animal brasileira como promotor de crescimento.

480 Alinhando-se as preocupações internacionais com a resistência a esta droga, seu uso foi banido
481 pelo MAPA (Brasil, 2016). Somente seu monitoramento poderá estabelecer se esta medida irá
482 refletir na diminuição da pressão de seleção e na reversão da resistência.

483

484 3.3 Genes de resistência

485 Nenhum dos quatro genes associados à resistência avaliados foram detectados. Portanto
486 acreditamos que há envolvimento de outros genes e/ou outros mecanismos de resistência
487 envolvidos.

488 Há relato na região sul do Brasil sobre a positividade dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* em
489 56,6% e 39,4%, respectivamente, em 31 cepas multirresistentes de *S. Heidelberg* isoladas de
490 frango de corte e trabalhadores das granjas (ELHARIR et al., 2019). Outro estudo na região sul,
491 que avaliou o perfil gênico relacionado à beta-lactamases de espectro extendido em 18 isolados
492 de *S. Heidelberg* encontrou positividade de 83,3% e 11,1% para *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}*,
493 respectivamente (Giuratti et al., 2017).

494 Uma pesquisa investigou a prevalência da resistência à quinolona mediada por
495 plasmídeos em 129 cepas de *Salmonella* de diversos sorovares, incluindo Heidelberg. As cepas
496 foram provenientes de amostras de alimentos de origem animal, amostras ambientais e de seres
497 humanos, no Brasil. Os autores encontraram resistência fenotípica de 42,6% para
498 ciprofloxacina, no teste de disco difusão e 56,6% na CIM, no entanto os genes do grupo *qnr*
499 foram encontrados em apenas 11,6% (15/129) das amostras, sendo oito *qnrS*, seis *qnrB*, um
500 *qnrD* e nenhum *qnrA* (Pribul et al., 2017).

501 Semelhante à esta pesquisa, um estudo brasileiro realizado com cepas de *Salmonella*
502 isoladas de carne de frango encontrou resistência fenotípica para classe dos beta-lactâmicos, no
503 entanto não houve identificação dos genes associados às ESBL. Ao correlacionar os resultados,
504 os autores evidenciaram sua natureza extra cromossômica, pois quando os genes estão
505 localizados em elementos móveis, podem ser facilmente perdidos (Brasil, 2012). Os genes *qnr*
506 frequentemente estão localizados nos mesmos plasmídeos que carregam múltiplos
507 determinantes de resistência, abrigando inclusive genes que codificam beta-lactamases de
508 espectro estendido - ESBL (Robicsek, Jacoby & Hooper, 2006), o que parcialmente explica a
509 não detecção destes genes neste estudo e a resistência fenotípica encontrada para beta-
510 lactâmicos e fluoroquinolonas. Outra hipótese para explicar a divergência com os resultados
511 fenotípicos é a de que outros genes associados à resistência aos antimicrobianos, mas que não
512 foram pesquisados neste estudo estejam envolvidos.

513

514 3.4 Similaridade genética

515

516 O PFGE conseguiu discriminar as cepas em 4 *clusters* (A, B, C, D), os quais
517 englobaram dezenove genótipos ou pulsotipos (A1-A3; B1 e B2; C1-C6 e D1-D8). Somados,
518 esses pulsotipos representaram 55% (20/36) do total de cepas. As demais foram classificadas
519 como pertencentes a perfis distintos por terem similaridade genética inferior a 80% (Fig. A.1).

520 No *cluster* A foi identificado um pulsotipo clonal (A1), formado por uma cepa isolada
521 de carne de frango em Santa Catarina no ano de 2013 (cepa 32H), e outra proveniente de fezes
522 humanas no Maranhão em 2012 (cepa 33H). A identificação dessas cepas como clones é
523 surpreendente devido à distância entre as regiões de isolamento. Porém, como a região Sul do
524 Brasil é responsável pela maior produção de carne de frango do país (ABPA, 2018),
525 acreditamos que a cepa 32H tenha sido disseminada para a região nordeste pela comercialização
526 da carne de frango. A disseminação pode ter ocorrido, inclusive, antes de seu isolamento e
527 depósito no banco de cepas. Assim, mesmo a cepa proveniente de alimentos tendo sido isolada
528 posteriormente à infecção humana no Maranhão, os casos podem ser relacionados e a infecção
529 pode ter ocorrido por via alimentar. O Maranhão é uma das regiões mais carentes do Brasil e
530 ocupa hoje a penúltima colocação dentre os 27 estados quanto ao índice de desenvolvimento
531 humano (Bernat et al., 2019). Assim, as condições de saúde regionais e a susceptibilidade do
532 hospedeiro somadas aos perfis de virulência e resistência da cepa, P2 e PII (Tabelas 3 e 5),
533 respectivamente, provavelmente contribuíram para a relação do *status* hospedeiro-parasita e
534 podem ter sido determinantes para o desenvolvimento da salmonelose no paciente.

535 A similaridade genética determinada pelo PFGE em linhagens de diferentes origens foi
536 relatada para *Campylobacter* por Frazão et al. (2017) no Brasil e por Oh et al. (2017) na Coréia.
537 Entretanto, só foi detectada em cepas isoladas no mesmo ano ou com até um ano de diferença,
538 coincidindo com o que ocorreu nesta pesquisa.

539 No *cluster* A foram encontrados três pulsotipos (A1-A3) que agruparam quatro
540 isolados. Com exceção da cepa 33H, as demais são provenientes de carne ou cortes de frango
541 isoladas entre 2011 e 2017, nos estados Santa Catarina, Paraná e São Paulo. A proximidade
542 geográfica entre os estados, provavelmente contribuiu para que houvesse trocas genéticas entre
543 cepas, isso pode ter levado a uma co-evolução para um genótipo mais hegemonic ao longo dos
544 anos. O padrão geográfico de *clusters* também foi identificado pelo PFGE em *S. Typhimurium*
545 isoladas de fezes humanas na Dinamarca (Torpdahl et al., 2007). As cepas desse *cluster*
546 apresentavam o mesmo perfil de virulência, com exceção da cepa 33H que foi negativa para o
547 gene *sopE*. Também foram semelhantes quanto a resistência aos antibacterianos, excetuando a
548 cepa 33H que foi suscetível a todos os antimicrobianos testados. É possível que mesmo
549 possuindo origens comuns, que a cepa isolada de humano (33H) tenha sofrido pressões de
550 seleção distintas resultando nas diferenças.

551 As cepas 26H e 35H compuseram o *cluster* B, ambas isoladas de carcaça de frango em
552 São Paulo (2011) e Santa Catarina (2013), respectivamente. Os genótipos de virulência e a
553 resistência fenotípica de ambas foram idênticos.

554 Os seis pulsotipos (C1-C6) no *cluster* C foram isolados de alimentos nos três estados da
555 região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) entre 2011 e 2017 e apresentaram
556 genótipos de virulência semelhantes, exceto a cepa 8H na qual não foi detectada o gene *hilA*, já
557 os resultados da CIM foram heterogêneos sugerindo que seja uma característica cepa-
558 dependente.

559 O *cluster* D foi formado por oito pulsotipos (D1-D8), sendo sete isolados de carcaças de
560 frango (2011-2017) todas oriundas da região Sul e uma amostra clínica humana (2013) isolada
561 no estado do Maranhão. A presença de uma cepa isolada de sangue humano (16H) em um
562 *cluster* majoritariamente formado por isolados de alimentos, novamente sinaliza para a infecção
563 humana por via alimentar, mesmo com a distância geográfica, reforçando que a comercialização
564 de frango e derivados entre os estados pode ser a causa da disseminação do genótipo. O
565 isolamento de *S. Heidelberg* no sangue do paciente reforça a importância da relação hospedeiro-
566 parasita no desenvolvimento da doença. Essa condição sugere um quadro clínico grave com
567 potencial de sepse. Todas as cepas apresentaram o mesmo perfil de virulência P2 (Tabela 3),
568 mas novamente a susceptibilidade aos antimicrobianos foi cepa-dependente, provavelmente,
569 devido a facilidade de aquisição e perda de plasmídeos (Konaté et al., 2019). O isolado de
570 humano foi fenotípicamente suscetível à ciprofloxacina, evidenciando um prognóstico
571 favorável mediante tratamento.

572 De maneira geral, observamos maior heterogeneidade nos tipos de amostras e locais de
573 isolamento das 12 cepas classificadas como de perfis distintos (quatro isoladas de humanos e
574 oito de alimentos).

575

576 3.5 Sequenciamento genômico

577

578 As cepas selecionadas para o sequenciamento genômico completo foram a 5H (isolada
579 de carne de frango resfriada em 2012) e a 13H (isoladas de carcaça de frango em 2017) (Tabela
580 A.1). Essas cepas foram classificadas como distintas na análise PFGE por possuírem
581 similaridade menor que 80%.

582 Após a montagem dos genomas, um total de 20 *contigs* para a cepa 5H e 29 para a cepa
583 13H foram obtidos. Dentre esses *contigs*, foram encontrados três plasmídeos com tamanhos
584 variando de aproximadamente 2 kb a 160 kb em cada cepa.

585 Na triagem *in silico* dos genes de virulência, tanto em DNA plasmidial quanto no
586 cromossomial, para 5H e 13H, foram encontrados 109 e 126 genes, respectivamente, além de 43
587 genes em ambas as cepas associados a resistência à tetraciclina, sulfonamida, fluoroquinolonas,

588 fosfomicina, aminoglicosídeo, beta-lactâmicos (carbapenêmicos e cefalosporinas) e outros
589 antimicrobianos.

590 Dentre os genes de resistência identificados no DNA cromossômico considerando
591 grupos de antimicrobianos mais amplamente utilizados na terapêutica humana e/ou animal,
592 destacamos o gene *fosA7* para fosfomicina, *aac(6')* para aminoglicosídeos, *bla_{CMY-2}* para beta-
593 lactâmicos/cefalosporinas, *marA* para beta-lactâmicos/carbapenêmicos, e os genes *emrA* e *emrB*
594 para fluroquinolonas. Os genes identificados no DNA plasmidial foram: *sul2* para sulfonamidas
595 e *tetA* para tetraciclinas. Caso esses genes sejam expressos, podemos destacar um perfil de
596 multirresistência alarmante em ambas as cepas.

597 Utilizando o sequenciamento de genoma completo, genes de resistência semelhantes
598 foram relatados em *Salmonella* spp. isoladas de amostras clínicas, ambientais e de animais
599 (Pornsukarum, van Vliet e Thakur, 2018; Keefer et al., 2019). Provavelmente, a presença desses
600 genes em *Salmonella* pode ser explicada pela transferência mediada pelas trocas gênicas entre
601 micro-organismos pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, comuns na microbiota intestinal,
602 tanto de animais de produção quanto de humanos (Lim et al., 2013).

603 Quanto aos genes associados a produção de β -lactamases de espetro estendido (ESBLs),
604 *bla_{CMY-2}*, relacionado à resistência a ceftriaxona, é um dos mais frequentes em isolados de
605 *Salmonella* em alimentos de origem animal (Jeon et al., 2018; Castro-Vargas et al., 2019), e
606 também foram detectados nas cepas 5H e 13H neste estudo. A detecção deste e de outros genes
607 *bla* são motivo de alerta, já que em 2014 o CDC americano relatou mais de 26.000 infecções e
608 1.700 mortes decorrentes infecções por cepas produtoras de ESBL (CDC, 2014).

609 Rehman et al. (2019) pesquisaram a correlação dos genes *bla_{CMY-2}* (resistência as
610 cefalosporinas) e *fosA7* (resistência à fosfomicina) em um banco de dados de deposição de
611 genomas de patógenos (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*). Selecionaram
612 mais de 200 mil genomas de *Salmonella enterica* e verificaram a presença do gene *bla_{CMY-2}* em
613 4.954 (2,4%) e *fosA7* em 8.143 (4,0%), e ambos os genes em 919 (0,4%) cepas. Considerando
614 somente as cepas de *S. Heidelberg*, a presença concomitante destes genes (*fosA7* e *bla_{CMY-2}*) foi
615 de 64%, demonstrando que a resistência aos antimicrobianos é uma característica comum e fator
616 de virulência importante nesse sorovar, quando comparado a vários outros da mesma espécie.

617 Também identificamos concomitantemente os genes *bla_{CMY-2}* e *fosA7* em 5H e 13H,
618 comprovando a tendência deste sorovar à apresentar genótipo de resistência às cefalosporinas e
619 fosfomicinas, sugerindo dificuldades no tratamento da salmonelose humana, já que as
620 cefalosporinas de terceira geração são drogas de escolha para o tratamento da salmonelose
621 (WHO, 2003) e as fosfomicinas são alternativas de tratamento da infecção por *Salmonella*
622 multirresistente (Lin e Chen, 2015).

623 A presença do gene *fosA7* em *Salmonella* foi relatada pela primeira vez em 2017, e
624 segundo NCBI, está presente em apenas 36 dos mais de 40 mil genomas depositados neste

625 banco de dados, com alta associação ao sorovar Heidelberg, aproximadamente 75% (Rehman et
626 al., 2017). No mesmo ano, Nascimento (2017) avaliou 14 genomas de *Salmonella* spp
627 disponíveis na plataforma NCBI, sendo oito *S. Heidelberg* e seis *S. Typhimurium*, provindos do
628 Brasil e dos EUA e detectou o gene *fosA7* em 7/14 (50% delas), todas do sorovar Heidelberg,
629 sendo três isoladas no Brasil e quatro nos EUA. Esse dado alarmante aponta o surgimento e
630 expansão da resistência a essa nova classe de antimicrobianos em *S. Heidelberg*. Esse gene
631 estava presente em 5H e 13H comprovando que sua ocorrência em *S. Heidelberg* é comum e
632 disseminada.

633 Os carbapenêmicos são antimicrobianos beta-lactâmicos de última geração indicados
634 para o tratamento das infecções pela maioria das bactérias produtoras de ESBL e por bactérias
635 multirresistentes (BRASIL, 2007). Porém, bactérias que possuem o gene *marA*, como as
636 identificadas em nosso estudo, sob pressão da presença de antibióticos, codificam a proteína
637 MarA que induz a multirresistência por bomba de efluxo a antimicrobianos como
638 carbapenêmicos, cefalosporinas e fluoroquinolonas (Ferrari et al., 2013).

639 Os genes *emrA* e *emrB*, detectados em 5H e 13H, também são associados a resistência
640 às fluoroquinolonas por bomba de efluxo EmrAB. Estes genes foram descritos a primeira vez
641 por Lomovskaya e Lewis (1992) que detectaram multirresistência em *E. coli*, e desde então,
642 pouco se conhece sobre sua ação, mas já foi relatado que em *Salmonella* a expressão substancial
643 do gene *emrB* leva a resistência às fluoroquinolonas (Chen et al., 2007).

644 Os aminoglicosídeos são utilizados no tratamento contra bactérias Gram-negativas
645 aeróbias, como *Salmonella* spp. e alguns estafilococos. Em *Salmonella* spp., a aquisição da
646 resistência a essa droga está associada a transcrição dos genes *aac(3)* e *aac(6')*, que impedem a
647 ação da droga codificando proteínas que geram modificações enzimáticas na molécula do
648 antimicrobiano (Noh et al., 2019). Estes genes foram encontrados em diferentes sorovares
649 incluindo Heidelberg (Michael et al., 2006). Nas cepas 5H e 13H foi detectado apenas o gene
650 *aac(6')*, que se expressos, conferem resistência aos aminoglicosídeos.

651 A identificação do gene *tetA*, bem como de outros pertencentes ao grupo de genes *tet*,
652 que estão relacionados a resistência às tetraciclínas são comuns em *Salmonella* spp. e parecem
653 convergir para resistência do gênero às tetraciclínas (Michael et al., 2006; Keefer et al., 2019).
654 A presença desse gene em 5H e 13H confirma essa tendência.

655 As sulfonamidas agem na inibição da síntese de ácido fólico, essencial para a síntese do
656 RNA e DNA bacteriano, no entanto o gene *sul2* codifica a proteína necessária para sintetizar o
657 ácido fólico, neutralizando a ação da droga (LYNNE et al., 2008). Assim como em nosso
658 estudo, foram detectados genes associados a resistência às fluoroquinolonas, cefalosporinas, β-
659 lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclínas em 15 cepas de *S. Heidelberg* de origem avícola
660 isoladas na Colômbia. Em relação à resistência genotípica às sulfonamidas, o gene *sul2* foi
661 detectado em 86% das amostras (Castro-Vargas et al., 2019).

662 Nas análises fenotípicas da CIM a cepa 5H apresentou resistência para cefalosporinas de
663 terceira geração, fluoroquinolonas e polimixinas, além de resistência intermediária aos
664 carbapenêmicos, já a cepa 13H foi resistente a polimixina e fluoroquinolona, e apresentou
665 resistência intermediária para cefalosporinas de terceira geração e sensibilidade aos
666 carbapenêmicos. Os resultados do sequenciamento não foram capazes de elucidar a resistência
667 fenotípica para polimixinas nas cepas 5H e 13H, no entanto, detectou genes que justificam a
668 resistência aos demais antimicrobianos. Para a estirpe 13H, os resultados foram paradoxais,
669 visto que houve a detecção de genes de resistência aos carbapenêmicos, entretanto a cepa foi
670 fenotipicamente sensível no teste da CIM, sugerindo que esta característica não foi transcrita.

671 Os mecanismos de resistência à classe das polimixinas ainda não foram completamente
672 elucidados. Até o momento é conhecido o complexo de genes *mcr* que conferem resistência à
673 colistina mediada por plasmídeos (Lima, Domingues e Silva, 2019), no entanto este gene não
674 foi detectado em nenhuma das cepas sequenciadas. Acreditamos que a resistência fenotípica
675 encontrada para as duas cepas, seja resultante do mecanismo adaptativo, também atribuído a
676 resistência às polimixinas. Neste caso a bactéria sensível, adquire resistência quando
677 apresentada a subdoses sucessivas da droga, podendo apresentar resistência a concentrações
678 superiores a 128 μ g/mL na CIM. Vantajosamente, este é um fenótipo reversível, desde que a
679 pressão seletiva causada pela droga seja interrompida (Skiada et al., 2011). No Brasil, esta droga
680 foi amplamente utilizada como promotora de crescimento na produção de animal, o que pode ter
681 contribuído na seleção de cepas resistentes. Apesar do Ministério da Agricultura ter banido seu
682 uso para estes fins no ano de 2016 (Brasil, 2016), as cepas foram isoladas nos anos 2012 (5H) e
683 2017 (13H), a primeira no período de uso permitido da droga e a segunda logo depois de seu
684 banimento, período provavelmente insuficiente para reversão deste fenótipo.

685 O sequenciamento detectou mais de 100 genes de virulência em 5H e 13H, sendo a
686 grande maioria associada ao sistema de secreção do tipo III (SSTT). Este sistema age através da
687 introdução de proteínas na célula do hospedeiro por um mecanismo semelhante a uma “seringa
688 molecular”. Dentro das células, essas proteínas efetoras interagem com as do hospedeiro
689 resultando em reações que promovem rearranjos no citoesqueleto, escape do sistema imune e
690 morte celular (Mota, Sorg e Cornelis, 2005). A detecção destes genes por si só não garante
691 expressão e atuação no fenótipo das linhagens. No entanto, a gama de genes detectados pelo
692 sequenciamento, permite afirmar que as duas cepas de *S. Heidelberg* possuem diversos
693 mecanismos de virulência, que quando transcritos, contribuem para a infecção do hospedeiro e o
694 desenvolvimento da salmonelose. Cruzando estes resultados com a similaridade genética obtida
695 pelo PFGE, é possível inferir que pelo menos 81,6% destas características (percentual de
696 similaridade do *cluster*) estejam disseminadas entre as demais sete cepas pertencentes ao cluster
697 D.

698

699 **4. Conclusão**
700701 *S. Heidelberg* isoladas de alimentos e pacientes humanos apresentaram a maioria dos
702 genes de virulência pesquisados e caráter de multirresistência aos antimicrobianos, alertando
703 para a ocorrência de quadros de salmonelose potencialmente graves e de difícil tratamento em
704 humanos. Consideramos importante o desenvolvimento de modelos de administração de
705 medicamentos *target*-específicos como alternativa para o tratamento de cepas multirresistentes.
706 O PFGE indicou correlações pontuais entre cepas de alimentos e humanos, evidenciando a
707 infecção de humanos pela via alimentar, mesmo para regiões distantes. O sequenciamento
708 confirmou os dados de resistência fenotípicas obtidos pela CIM e ainda indicou os potenciais
709 mecanismos e genes envolvidos na multirresistência, inclusive para outras classes de
710 antimicrobianos não avaliadas fenotipicamente. Os dados podem servir de alerta aos órgãos de
711 saúde pública para a necessidade do reconhecimento do sorovar Heidelberg como
712 potencialmente perigoso à saúde pública, sugerimos ainda que seja listado dentre os sorovares
713 que devem ser monitorados e controlados pelo Programa Nacional de Redução de Patógenos.714
715 **Agradecimentos**716 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES),
717 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de
718 Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento da pesquisa. À
719 Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo fornecimento das cepas.720 **Conflitos de interesses**

721 Os autores declaram que não há conflitos de interesse

722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735

736 **5. Referências**

737 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Relatório de Pesquisa em Vigilância
738 Sanitária de Alimentos. (2012).
739 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%A3oPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES/> Acesso 12
740 Janeiro 2020.

741 Alterthum, F. (2008). Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência.
742 In L. R. Trabulsi (Ed.), *Microbiologia* (pp. 79-85). São Paulo: Atheneu.

743 Aravena, C., Valencia, B., Villegas, A., Ortega, M., Fernández, A. R., Araya, P. R., et al.
744 (2019). Caracterización de cepas clínicas y ambientales de *Salmonella enterica* subsp.
745 *enterica* serovar Heidelberg aisladas en Chile. *Revista Médica de Chile*, 147: 24-33.

746 Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Relatório anual 2016. (2018)
747 http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf/ Acesso 12 Janeiro 2019.

748 Barth, S. & Bauerfeind, R. (2005). Virulence plasmids of *Salmonella enterica*: incidence
749 and properties. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 118: 8-23.

750 Ben-Barak, Z., Streckel, W., Yarona, S., Cohenc, S., Prager, R., Tschape, H. (2006). The
751 expression of the virulence-associated effector protein gene *avrA* is dependent on a
752 *Salmonella enterica*-specific regulatory function. *International Journal of Medical
753 Microbiology*, 296: 25-38.

754 Bernat, I. G., Lima, J. B., Guedes, L. P. & Pereira, S. S. (2019). *Jornada de Alfabetização
755 do Maranhão: Mobilização Popular. Cultura e Emancipação*. São Luís: Eduema.

756 Borges, K. A., Furian, T. Q., Borsoi, A., Moraes, H. L.S., Salle, C. T. P. & Nascimento, V.
757 P. (2013). Detection of virulence-associated genes in *Salmonella Enteritidis* isolates
758 from chicken in South of Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33: 1416-1422.

759 Borges, K. A., Furian, T. Q., Souza, S. N., Salle, C. T. P., Moraes, H. L. S., Nascimento, V.
760 P. (2018). Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Salmonella
761 enterica* Serotypes Isolated from Poultry Sources in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry
762 Science*, 21: 1-8.

763 Campioni, F., Bergamini, A. M. M., Falcão, J. P. (2012). Genetic diversity, virulence genes
764 and antimicrobial resistance of *Salmonella Enteritidis* isolated from food and humans
765 over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiology*, 32: 254-264.

766 Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum B-lactamase producers.
767 *Clinical and Microbiology Infection*, 14: 117-123.

768 Castilla, K. S., Ferreira, C. S. A., Moreno, A. M., Nunes, I. A., Ferreira, A. J. P. (2006)
769 Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* e *spvC* in *Salmonella Enteritidis* phage type 4
770 strains isolated in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 135-139.

771

772

773 Castro-Vargas, R., Fadino de Rubio, L. C., Veja, A. & Rondon-Barragan, I. (2019).
774 Phenotypic and Genotypic Resistance of *Salmonella* Heidelberg Isolated from One of
775 the Largest Poultry Production Region from Colombia. *International Journal of Poultry*
776 *Science*, 18: 610-617

777 Cattoir, V., Weill, F. X., Poirel, L., Fabre, L., Soussy, C. J., Nordmann, P. et al. (2007)
778 Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *Journal of Antimicrobial*
779 *Chemotherapy*, 59: 751-754.

780 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). Standardized Laboratory
781 Protocol for Molecular Subtyping of *Campylobacter jejuni* by Pulsed Field Gel
782 Electrophoresis (PFGE). PulseNet USA. The National Molecular Subtyping Network
783 for Foodborne Disease Surveillance.

784 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Multidrug-
785 Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Contact with Dairy Calves.
786 (2018). <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>. Acesso 19
787 Agosto 2019.

788 Center for Infectious Disease Research and Policy (CIDRAP). New resistance gene found in
789 *Salmonella* isolated from chickens.(2017). Minneapolis: CIDRAP; 2017.
790 <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/05/new-resistance-gene->
791 [foundsalmonella-isolated-chickens./](http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/05/new-resistance-gene-) Acesso 21 Janeiro 2020.

792 Chen, S., Cui, S., McDermott, P. F., Zhao, S., White, D. G., Paulsen, I. & Meng, J. (2007).
793 Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of
794 *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to fluoroquinolones and other
795 antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 535–542.

796 Chen, S., Zhao, S., White, D. G. Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H. et al. (2004).
797 Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from
798 retail meats. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 1-7.

799 Collinson, S. K., Dig, P. C., Doran, J. L., Clouthier, S., Trust, T. J., Kay, W. W. (1993).
800 Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella Entiritidis* to
801 fibronectin. *Journal of Bacteriology*, 175: 12–18.

802 Craciună, C., Keul, A. L., Flonta, M., Cristea, M. (2012). DNA-based diagnostic tests for
803 *Salmonella* strains targeting *hilA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. *Journal of Environmental*
804 *and Economic Management*, 95: S15-8.

805 Darwin, K. H., Miller, V. L. (1999). Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with
806 the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 405-28.

807 Etter, A. J., West, A. M., Burnett, J. L., Wu, S. T., Veenhuizen, D. R., Ogas, R. A. et al.
808 (2019). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg food isolates associated

809 with a salmonellosis outbreak have enhanced stress tolerance capabilities. *Applied and*
810 *Environmental Microbiology*, 85:e01065-19.

811 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables
812 for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. (2019b).
813 http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9
814 .0_Breakpoint_Tables.pdf./ Acesso 19 Dezembro 2019

815 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST
816 Reading guide for broth microdilution. Version 1.0. (2019a).
817 http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf./ Acesso 19 Dezembro 2019.

819 European Food Safety Authority (EFSA). EU summary report on antimicrobial resistance in
820 zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. (2017).
821 <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5182>./ Acesso 26 Janeiro 2019.

822 European Food Safety Authority (EFSA). *Salmonella* control in poultry flocks and its
823 public health impact. (2019)
824 <https://efsajournal.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5596>./ Acesso 02
825 Agosto 2019.

826 European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends
827 and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. (2017).
828 <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5500>./ Acesso 26 Novembro 2019.

829 Ferrari, R. G., Galiana, A., Cremades, R., Rodríguez, J. C., Magnani, M., Tognim, M. et al.
830 (2013). Expression of the *marA*, *soxS*, *acrB* and *ramA* genes related to the AcrAB/TolC
831 efflux pump in *Salmonella enterica* strains with and without quinolone resistance-
832 determining regions *gyrA* gene mutations. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*,
833 17(2), 125–130.

834 Figueiredo, R., Henriques, A., Sereno, R., Mendonça, N., Silva, G. J. (2013). Resistência a
835 antibióticos em isolados de *Salmonella enterica* em alimentos de origem animal.
836 *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 108: 39-43.

837 Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization
838 (FAO/WHO). *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: meeting report.
839 Microbiological Risk Assessment Series. (2009). FAO/WHO.

840 Giuriatti, J., Stefani, L. M., Brisola, M. C., Crecencio, R. B., Bitner, D. S. & Faria, G. A.
841 (2017). *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to
842 extended spectrum β-lactamases (ESBLs). *Microbial Pathogenesis*, 109, 195–199.

843 Guo, X., Chen, J., Beuchat, L.R., Brackett, R. E. (2000) PCR Detection of *Salmonella*
844 *enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hilA*.
845 *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5248-5252.

846 Heuzenroeder, M. W., Murray, C. J., Dalcin, R. M. (2001). Molecular basis of benign
847 colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. *Rural Industries Research and*
848 *Development Corporation*, (1), 106.

849 Hiley, L., Graham, R. M. A. & Jennison, A. V. (2019). Genetic characterisation of variants
850 of the virulence plasmid, pSLT, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium provides
851 evidence of a variety of evolutionary directions consistent with vertical rather than
852 horizontal transmission. *PLoS ONE*, 14: e0215207.

853 Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the
854 pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance
855 including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12, 504-521.

856 Karasova, D., Havlickova, H., Sisak, F. & Rychlik, I. (2009). Deletion of *sodCI* and *spvBC*
857 in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reduced its virulence to the natural virulence
858 of serovars Agona, Hadar and Infantis for mice but not for chickens early after
859 infection. *Veterinary Microbiology*, 139, 304-309.

860 Keefer, A. B., Xiaoli, L., M'ikanatha, N. M., Yao, K., Hoffmann, M., Dudley, E. G. (2019).
861 Retrospective whole-genome sequencing analysis distinguished PFGE and drug-
862 resistance-matched retail meat and clinical *Salmonella* isolates. *Microbiology*, 165(3),
863 270-286.

864 Kingsley, R. A., Humphries, A. D., Weening, E.H., De Zoete, M. H., Winter, S.,
865 Papaconstantinopoulou, A. et al. (2003). Molecular and phenotypic analysis of the CS54
866 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: Identification of intestinal
867 colonization and persistence determinants. *Infection Immunology*, 71: 629–640.

868 Konaté, A., Guessennd, N. K., Kouadio, F. K., Dembélé, R., Kagambèga, A., Kouadio, I. K.
869 et al. Epidemiology and Resistance Phenotypes of *Salmonella* spp. Strains Responsible
870 for gastroenteritis in Children Less Than Five Years of Age in Ouagadougou, Burkina
871 Faso. *Archives of Clinical Microbiology*, 10(2), 90.

872 Labriola, J. M., Zhou, Y. & Nagar, B. (2018). Structural Analysis of the Bacterial Effector
873 AvrA Identifies a Critical Helix Involved in Substrate Recognition. *Biochemistry*, 57:
874 4985-4996.

875 Lima, T., Domingues, S.; Da Silva, G. J. (2019). Plasmid-mediated colistin resistance in
876 *Salmonella enterica*: a review. *Microorganisms*, 7, e55.

877 Lin, D., Chen, K., Wai-Chin Chan, E., Chen, S. (2015). Increasing prevalence of
878 ciprofloxacin-resistant food-borne *Salmonella* strains harboring multiple PMQR
879 elements but not target gene mutations. *Science Reports*, 5: 14754.

880 Lomovskaya, O. & Lewis, K. (1992). Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug
881 resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 8938-8942.

882 Majorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. et
883 al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant
884 bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired
885 resistance. *Clinical Microbiology Infection*, 18: 268-281.

886 Melo, R. T., Mendonça, E. P., Monteiro, G. P., Siqueira, M. C., Pereira, C. B., Peres, P. A.
887 B. M. (2017) Intrinsic and Extrinsic Aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms.
888 *Frontiers in Microbiology*, 8: 1332.

889 Mendonça, E. P. (2016). Características de virulência, resistência e diversidade genética de
890 sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no
891 Brasil. Tese de Doutorado ,Universidade Federal de Uberlândia. 2016.
892 [https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17625/1/CaracteristicasVirulenciaResiste](https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17625/1/CaracteristicasVirulenciaResistencia.pdf)
893 ncia.pdf/ Acesso 12 Janeiro 2020.

894 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 26,
895 de 09 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de
896 qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso
897 veterinário. (2009). Brasília, Distrito Federal: Brasil.

898 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) Instrução Normativa Nº45,
899 de 22 de novembro de 2016. Proibi, em todo o território nacional, a importação e a
900 fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo
901 zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. (2016). Brasília, Distrito
902 Federal: Brasil.

903 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Proibi, em todo o território
904 nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina,
905 com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação
906 animal. Instrução Normativa Nº45, de 22 de novembro de 2016. (2016). Brasília, DF,
907 Brasil.

908 Ministério da Saúde . Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. (2018).
909 <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos->
910 DTA-2018.pdf ./ Acesso 25 Novembro 2019.

911 Mion, L., Colla, F. L., Cisco, I. C., Webber, B., Diedrich, L. N., Pilotto, F. et al. (2014).
912 Perfil de resistência a antimicrobianos por *Salmonella* Heidelberg isoladas de
913 abatedouro avícola em 2005 e 2009. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42: 1197.

914 Mirmomeni, M. H., Kiani, S. & Sisakhtnezhad, S. (2008). Rapid detection of *Salmonella*
915 Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. *Pakistan Journal of*
916 *Biological Sciences*, 11: 1497-1501.

917 Mota, L. J., Sorg, I., Cornelis, G. R. (2005). Type III secretion: The bacteria-eukaryotic
918 express. *FEMS Microbiology Letters*, 252: 1-10.

919 Nakao, J.H., Talkington, D., Boop, C. A., Besse, J., Sanchez, M. L., Guarisco, J. et al.
920 (2018). Unusually high illness severity and short incubation periods in two foodborne
921 outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections with potential coincident *Staphylococcus*
922 *aureus* intoxication. *Epidemiology & Infection*, 146(19), 27.

923 *Nascimento, S. R. L. (2017). Análise genômica comparativa de Salmonella enterica*
924 *sorovares Heidelberg e Typhimurium de origem avícola. 49p. Dissertação (Mestrado)*
925 *Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-*
926 *Graduação em Ciência Animal, Areia.*

927 Nisar, M., Kassem, I. I., Rajashekara, G., Goyal, S. M., Lauer, d, Voss S. et al. (2017)
928 Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated
929 from chickens and turkeys in the midwestern United States. *Journal of Veterinary*
930 *Diagnostic Investigation*, 29:370–375.

931 Noh, E. B., Kim, Y. B.. Jeon, H. Y., Seo, K. W., Son, S. H., Lee, Young, J. (2019).
932 Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Salmonella* Serotypes Recovered
933 from Edible Pork Offal from Korea. *Microbial Drug Resistance*, 25(10): 1514-1520.

934 Ochoa, I. M. F. & Rodriguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de
935 *Salmonella* sp. Review Article. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 47: 25-42.

936 Oliveira, S. D., Santos, L. R., Schuch, D. M., Silva, A. B., Salle, C. T., Canal, C. W. (2002).
937 Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR.
938 *Veterinary Microbiology*, 87: 25-35.

939 Pandini, J. A., Pinto, F. G. S., Muller, J. M., Weber, L. D., Moura, A. C. (2014). Ocorrência
940 e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* sp. isolados de aviários
941 do Paraná, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, XX: 1-6.

942 Pornsukarom, S., van Vliet, A. H. M. & Thakur, S. (2018). Whole genome sequencing
943 analysis of multiple *Salmonella* serovars provides insights into phylogenetic
944 relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food
945 animals and agriculture environmental sources. *BMC Genomics*, 19, 801.

946 Prager, R., Rabsch, W., Streckel, W., Voigt, W., Tietze, E., Tschape, H. (2003). Molecular
947 properties of *Salmonella* enteric Serotype Paratyphi B Distinguish between Its Systemic
948 and Its Enteric Pathovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4270-4278.

949 Pribul, B. R., Festivo, M. L., Rodrigues, M. S., Costa, R. G., Rodrigues, E. C. dos P., de
950 Souza, M. M. S., & Rodrigues, D. dos P. (2017). Characteristics of Quinolone
951 Resistance in *Salmonella* spp. Isolates from the Food Chain in Brazil. *Frontiers in*
952 *Microbiology*, 8.

953 Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Notifications by product category and
954 notifying country. European Commission. (2018) [https://webgate.ec.europa.eu/rasff-](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList/)
955 [window/portal/?event=searchResultList/](#) Acesso 02 Novembro 2019.

956 Rehman, M. A., Yin, X., Persaud-Lachhman, M. G., Diarra, M. S. (2017). First detection of
957 a 731 fosfomycin resistance gene, *fosA7*, in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg
958 isolated from broiler chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61:e00410–
959 e00417.

960 Rezende, C. S. M., Mesquita, A. J., Andrade, M. A., Linhares, G. F. C., Mesquita, A. Q.,
961 Minafra, C. S. (2005). Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte
962 abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. *Revista
963 Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100: 199-203.

964 Robicsek, A., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-
965 mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(10), 629–640.

966 Sedeik, M. E., El-shall, N. A. & Awad, A. M. et al. (2019). Isolation, conventional and
967 molecular characterization of *Salmonella* spp. from newly hatched broiler
968 chicks. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, 9: 136.

969 Skiaida, A., Markogiannakis, A., Plachouras, D. & Daikos, G. L. (2011). Adaptive
970 resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of
971 Antimicrobial Agents*, 37:187–193.

972 Soussa, T. J., Parise, D., Profeta, R. Parise, M. T. D., PintoGomide, A. C., Kato, R. B.
973 (2019). Re-sequencing and optical mapping reveals misassemblies and real inversions
974 on *Corynebacterium pseudotuberculosis* genomes. *Scientific Reports*, 9: 16387.

975 Souza, I. D. P. (2015). Heidelberg é a salmonela da vez. *O presente rural - Avicultura, corte
976 e postura*, 1(1), 28.

977 Stefani, L. M., das Neves, G. B., Brisola, M. C., Crecencio, R. B., Pick, E.C., Araújo, D.N.
978 (2018). *Salmonella* Heidelberg resistant to ceftiofur and disinfectants routinely used in
979 poultry. *Semina: Ciências Agrárias*, 39: 1029-1036.

980 Suez, J., Porwollik, S., Dagan, A., Marzel, A., Schorr, Y. I., Desai, P. T. et al.(2013).
981 Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal
982 *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS ONE*, 8: e58449.

983 Torpdahl, M., Sørensen, G., Lindstedt, B. A., Nielsen, E. M. (2007). Tandem repeat
984 analysis for surveillance of human *Salmonella* Typhimurium infections. *Emerging
985 Infectious Diseases*, 13(3), 388-395.

986 Webber, B., Borges, K. A., Furian, T. Q., Rizzo, N. N., Tondo, E. C., Santos, R. S. et al.
987 (2019). Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken
988 carcasses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 61:e36.

989 World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human
990 medicine. (2011).

991 Yoo, A. Y., Yu, J. E., Yoo, H., Lee, T. H., Lee, W. H., Oh, J., et al. (2013). Role of sigma
992 factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression. *Biochemical and Biophysical*
993 *Research Communications*, 430: 131-136.
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017

1018

Apêndices

1019

1020

1021 **Tabela A.1. Identificação e dados do isolamento das cepas de *Salmonella* Heidelberg isoladas de alimentos e indivíduos infectados no Brasil, no período de 2011 a 2017.****Isolamento**

| Cepas | Ano | Fonte | Local | Amostra |
|--------------|------------|--------------|--------------|------------------|
| 1H | 2011 | Alimento | PR | CFR ¹ |
| 2H | 2016 | Alimento | MG | CF ² |
| 3H | 2017 | Humano | RO | Fezes |
| 4H | 2017 | Alimento | SC | CF |
| 5H | 2012 | Alimento | PR | CFR |
| 6H | 2014 | Alimento | SC | CF |
| 7H | 2016 | Alimento | SP | Carne |
| 8H | 2013 | Alimento | SC | CF |
| 9H | 2011 | Alimento | RS | CFR |
| 10H | 2013 | Alimento | PR | CMS ³ |
| 11H | 2012 | Alimento | PR | CMS |
| 12H | 2014 | Humano | PE | Fezes |
| 13H | 2017 | Alimento | SC | CF |
| 14H | 2013 | Alimento | SC | CF |
| 15H | 2011 | Alimento | PR | CFR |
| 16H | 2013 | Humano | MA | Sangue |
| 17H | 2011 | Alimento | PR | CFR |
| 18H | 2013 | Humano | MA | Sangue |
| 19H | 2017 | Alimento | MG | Barriga suína |
| 20H | 2012 | Alimento | PR | CMS |
| 21H | 2015 | Alimento | SC | CF |
| 22H | 2012 | Alimento | PR | CFR |
| 23H | 2015 | Humano | GO | Fezes |

| | | | | |
|-----|------|----------|----|-----------------|
| 24H | 2017 | Alimento | SP | Frango (cortes) |
| 25H | 2012 | Alimento | PR | Frango (CMS) |
| 26H | 2011 | Alimento | SP | CFR |
| 27H | 2014 | Alimento | SC | CF |
| 28H | 2015 | Alimento | SC | CF |
| 29H | 2011 | Alimento | PR | CF |
| 30H | 2012 | Alimento | PR | CF |
| 31H | 2017 | Alimento | MG | Sobrecoxa |
| 32H | 2013 | Alimento | SC | CF |
| 33H | 2012 | Humano | MA | Fezes |
| 34H | 2014 | Humano | RS | Fezes |
| 35H | 2013 | Alimento | SC | CF |
| 36H | 2013 | Alimento | SC | CF |

1022 ¹CFR = carcaça de frango resfriada; ²CF = carcaça de frango; ³CMS = carne mecanicamente
1023 separada.

1024

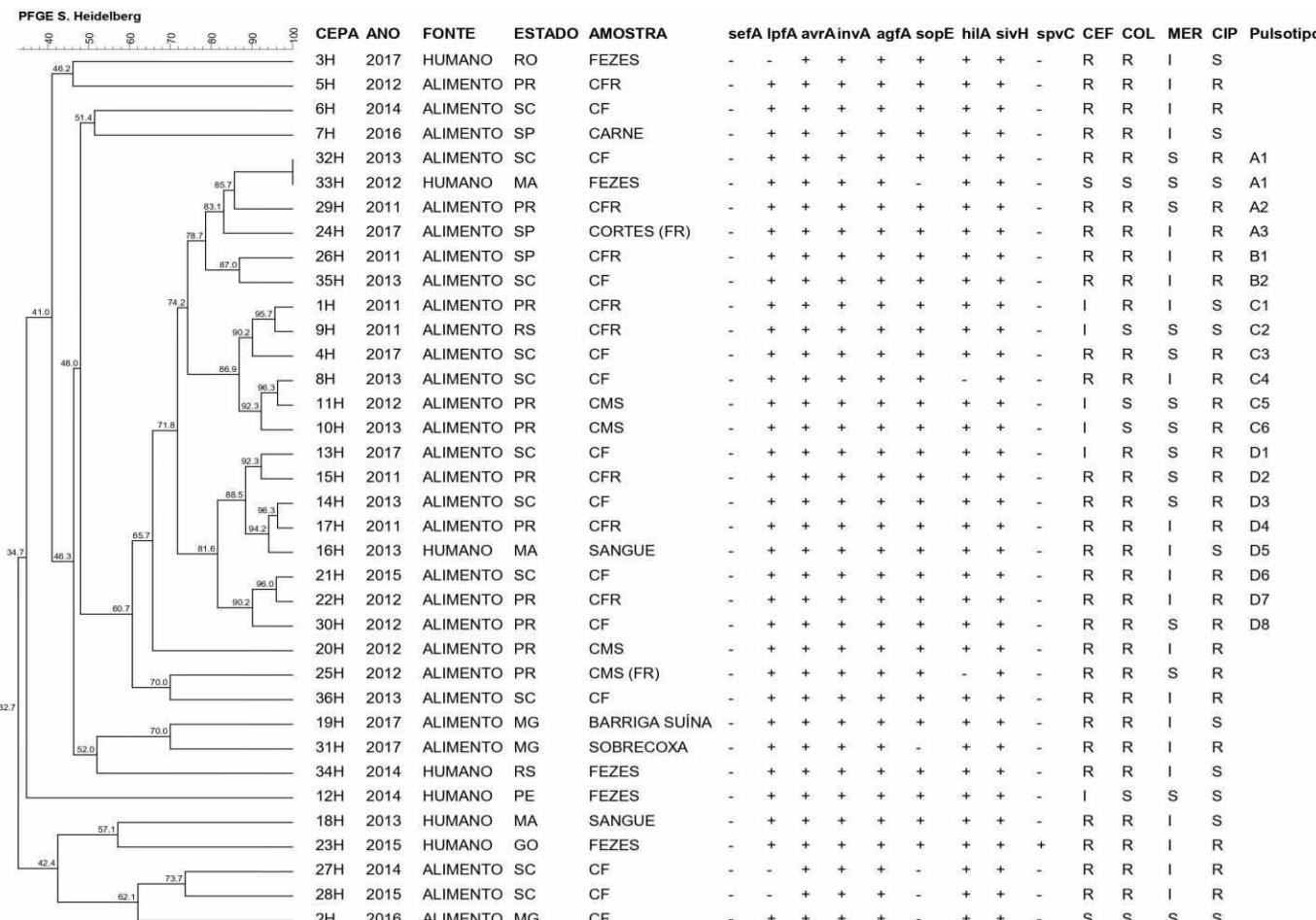
1025

1026

1027

1028

1029

1 **Fig. A.1**

17 Dendrograma
 18 método de Dice/UPGMA (tolerância de 0,5%, otimização de 0,5%, similaridade > 80%)

análise pelo

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2
3 De modo geral, tanto *S. Typhimurium* quanto *S. Heidelberg*
4 demonstraram potencial virulento para causar salmonelose em humanos.
5 Desta forma, a “interface entre segurança alimentar e saúde pública” citada no
6 título desta tese, realmente assumiram papel de “causa” e “efeito”,
7 respectivamente, demonstrando que os alimentos podem ser veiculadores
8 desses micro-organismos que representam perigo à saúde humana. Além do
9 potencial virulento gênico para causar quadros clínicos mais graves e
10 invasivos, foram constatados elevados índices de cepas multirresistentes,
11 especialmente considerando a resistência à colistina e a resistência
12 intermediária ao meropenem, que são drogas de uso restrito.

13 Nossos resultados sugerem desafios no tratamento da salmonelose e ao
14 mesmo tempo apontam para a necessidade de diminuir a pressão de seleção e
15 a disseminação de genes de resistência, de modo que alternativas de
16 administração de medicamentos *target*-específicos sejam desenvolvidas e
17 colocadas em prática para o tratamento de estirpes multirresistentes. Também
18 alerta para o uso racional de antimicrobianos na medicina veterinária e
19 humana, especialmente os de última geração, com identificação do agente,
20 avaliação prévia da sensibilidade e vigilância nas doses e tempo de
21 administração.

22 A transmissão de *S. Heidelberg* a humanos via alimento foi pontual, e
23 parece que o fator determinante para desenvolvimento de doença clínica é o
24 *status* hospedeiro-parasita, com a distância regional intensificando o
25 desequilíbrio deste *status*, possivelmente por falta de contato prévio. Porém,
26 um maior número de isolados precisam ser avaliados para conclusões.

27 Em *S. Typhimurium* a relação filogenética entre as cepas de alimentos e
28 humanos foi mais frequente, demonstrando uma rota de transmissão mais clara
29 para este sorovar.

30 O sequenciamento genômico completo das duas cepas de *S. Heidelberg*
31 foi importante para elucidar os mecanismos de resistência detectados
32 fenotipicamente, além de outros que não haviam sido pesquisados,
33 demonstrando o alto potencial multirresistente.

35 **REFERÊNCIAS**

36
37 AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals:
38 principles and limitations. **Journal of Veterinary Medicine. B-Infectious**
39 **Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, n. 8-9, p. 380-388, 2004.
40 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00775.x>

41
42 ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de
43 resistência. In: TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu; 2008. p.
44 79-85.

45
46 ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2016**.
47 Disponível em:
48 http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf. Acesso em: 16/11/2019.

49
50 ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Exportações de Carne de**
51 **Frango Alcançam 4,1 Milhões de Toneladas em 2018**. Disponível em:
52 <http://abpa-br.com.br/noticia/exportacoes-de-carne-de-frangoalcancam-41-milhoes-de-toneladas-em-2018-2656>. Acesso em: 16/11/2019.

53
54
55 ADLEY, C. C.; RYAN, M. P. "The nature and extent of foodborne disease," In:
56 BARROS-VEL'AZQUEZ, J. **Antimicrobial Food Packaging**. San Diego:
57 Academic Press; 2016, p. 1-10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00001-2>

58
59
60 .
61 AHRENFELDT, J. et al. Bacterial whole genome-based phylogeny: construction
62 of a new benchmarking dataset and assessment of some existing methods.
63 **BMC Genomics**, v. 18, n. 19, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3407-6>

64
65 ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; CAMPOS, J.; PEIXE, L. Salmonellosis: the role of
66 poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110–121,
67 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>

68
69 ARAVENA, C. et al. Caracterización de cepas clínicas y ambientales de
70 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg aisladas en Chile.
71 **Revista Médica de Chile**, v. 147, p. 24-33, 2019.
72 <https://doi.org/10.4067/S0034-98872019000100024>

73
74 ATIKUR, R. et al. Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity Pattern of
75 *Salmonella* spp from Locally Isolated Egg Samples. **American Journal of Pure**
76 **and Applied Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2019.
77 <https://doi.org/10.34104/ajpab.019.019111>

78
79 BAPTISTA, D. Q. et al. Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de
80 sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frangos vivos e carcaças no estado
81 do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1278-1285,
82 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5289>

83

84 BARTH, S., BAUERFEIND, R. Virulence plasmids of *Salmonella enterica*:
85 incidence and properties. **Berliner und Münchener tierärztliche**
86 **Wochenschrift**, v. 118, p. 8-23, 2005.

87
88 BEN-BARAK, Z. et al. The expression of the virulence-associated effector
89 protein gene *avrA* is dependent on a *Salmonella enterica*-specific regulatory
90 function. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 25-38,
91 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.08.004>

92
93 BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C Salmoneloses. In: BERCHIERI
94 JÚNIOR, A. et al. (Ed.). Doenças das aves. 2 ed. Campinas: Fundação
95 APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 435-454.

96
97 BONI, H. F. K.; CARRIJO, A. S.; FASCINA, V. B. Ocorrência de *Salmonella*
98 spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato
99 Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 1,
100 p. 84-95, 2011.

101
102 BORGES, K. A. et al. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella*
103 Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária**
104 **Brasileira**, v. 33, p. 1416-1422, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200004>

105
106 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Ficam
107 estabelecidos o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos
108 estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos
109 estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução.
110 **Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016**. Brasil, 2016^a.
111 Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-depatogenos/arquivos-controle-de-patogenos/SalmonellaIN202016Salmonella.pdf>. Acesso 21/01/2020.

112
113 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).
114 **Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a
comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso
veterinário**. Instrução Normativa Nº 26, de 09 de julho de 2009. Diário Oficial
115 da União, Brasília, DF, Brasil, 2009.

116
117 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).
118 **Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e
Controle de *Salmonella* sp. em carcaças de Frangos e Perus**. Instrução
119 Normativa Nº 70, de 06 de outubro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília,
120 DF, Brasil, 2003.

121
122 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Proibi,
em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância
antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico
melhorador de desempenho na alimentação animal**. Instrução Normativa

123
124
125
126
127
128
129
130
131

132 Nº45, de 22 de novembro de 2016. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil,
133 2016c.

134

135 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária
136 (ANVISA). **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Diário Oficial da
137 União, Brasília, DF, Brasil, 2012a. Disponível em:
138 http://www.anvisa.gov.br/servicosauda/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm. Acesso em: 18/12/2019.

139

140

141 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária
142 (ANVISA). **Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos**.
143 Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 2012b. Disponível em:
144 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 12/09/2019.

145

146

147

148 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde,
149 Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. **Surtos de Doenças
150 Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasil, 2016b. Brasília.

151

152 BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por
153 Alimentos no Brasil**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 2018.
154 Disponível em:
155 <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em: 09/01/2020.

156

157

158 CAMPIONI, F., BERGAMINI, A. M. M., FALCÃO, J. P. Genetic diversity, viru-
159 lence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from
160 food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v. 32,
161 p. 254-264, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.008>

162

163 CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase
164 producers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 117-123, 2008.
165 <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01851.x>

166

167 CARATTOLI, A. et al. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from
168 expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strain isolated in the
169 United States between 1996 and 1998. **Antimicrobial Agents and
170 Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1269-1272, 2002.
171 <https://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1269-1272.2002>

172

173 CARSON, C. et al. Ceftiofur-resistant *Salmonella* enterica serovar Heidelberg of
174 poultry origin – a risk profile using the Codex framework. **Epidemiology and
175 Infection**, v. 147, e296, p. 1–20, 2019. [https://doi.org/10.1016/S1624-5687\(19\)30097-6](https://doi.org/10.1016/S1624-5687(19)30097-6)

176

177

178 CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Foodborne
179 Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance
180 Report for 2012 (Final Report)**. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health
181 and Human Services, CDC. 2014.

182
183 CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Foodborne**
184 **Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet 2015**
185 **Surveillance Report (Final Data)**. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health
186 and Human Services, CDC. 2017.

187
188 CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National**
189 **Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* annual report, 2013**. Atlanta,
190 Georgia: U.S. CDC, 2013a. Disponível em:
191 <<https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/salmonella-annual-report-2013-508c.pdf>> Acesso em: 15/09/2019.

193
194 CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION..
195 **Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of**
196 ***Campylobacter jejuni* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**.
197 PulseNet USA. CDC, 2013b. The National Molecular Subtyping Network for
198 Foodborne Disease Surveillance.

199
200 CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Preliminary**
201 **Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted**
202 **Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance**
203 **Network (FoodNet): FoodNet 2017 Preliminary Data**. CDC, 2018. Disponível
204 em: <<https://www.cdc.gov/foodnet/reports/prelim-data-intro-2017.html>> Acesso:
205 20/01/2020

206
207 CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.
208 ***Salmonella*. Reports of selected *Salmonella* Outbreak Investigations**.
209 Atlanta, Georgia: U.S. CDC, 2015. Disponível em:
210 <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>> Acesso em: 15/09/2019.

211
212 CHAMPION, O. L., et al. Comparative phylogenomics of the foodborne
213 pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection
214 source.
215 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
216 **America**, v. 102, n. 44, p. 16043-16048, 2005.
217 <https://doi.org/10.1073/pnas.0503252102>

218
219 CHENG, R. A.; EADE, C. R.; WIEDMANN, M. Embracing Diversity: Differences
220 in Virulence Mechanisms, Disease Severity, and Host Adaptations Contribute to
221 the Success of Nontyphoidal *Salmonella* as a Foodborne Pathogen. **Frontiers**
222 **in Microbiology**, v. 10, p. 1368, 2019.
223 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01368>

224
225 CHIOU, C. S., et al. New multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar
226 Anatum clone, Taiwan, 2015-2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, p.
227 144–147, 2019. <https://doi.org/10.3201/eid2501.181103>

228
229 CHITTICK, P., et al. Summary of National Reports of foodborn outbreaks
230 of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease

231 prevention. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1150-1153,
232 2006. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.5.1150>

233

234 CIDRAP – CENTER FOR INFECTIOUS DISEASE RESEARCH AND POLICY.
235 **New resistance gene found in *Salmonella* isolated from**
236 **chickens**.Minneapolis: CIDRAP; 2017. Disponível em:
237 <<http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/05/new-resistance-gene-foundsalmonella-isolated-chickens>> Acesso em: 06/11/2019.

238

239

240 CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI, 2019.
241 In: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed.
242 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019. CLSI supplement
243 M100.

244

245 COSTA, A. L. P. Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do
246 Fenômeno Biológico, Suas Consequências e Estratégias De Contenção. 63 f.
247 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências
248 Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP,
249 Macapá, 2016.

250

251 CRABB, H. K. et al. *Salmonella* spp. transmission in a vertically integrated
252 poultry operation: Clustering and diversity analysis using phenotyping
253 (serotyping, phage typing) and genotyping (MLVA). **PLoS One**, v. 19, n. 13(7),
254 e0201031. doi: 10.1371/journal.pone.0201031.
255 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201031>

256

257 DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella*
258 with the Intestinal Mucosa. **Clinical Microbiology Reviews** [online], v. 12, n. 3,
259 p. 405-428, 1999. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.405>

260

261 DENG, X., et al. Comparative analysis of subtyping methods against a whole-
262 genome sequencing standard for *Salmonella* enterica serotype enteritidis.
263 **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 212–218, 2015.
264 <https://doi.org/10.1128/JCM.02332-14>

265

266 DICKE, E.L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação**
267 **em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no**
268 **monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle**
269 **higiênico sanitário do processo de abate**. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em
270 Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade
271 Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

272

273 DUTIL, L., et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella* enterica serotype Heidelberg
274 from chicken meat and humans. **Emerging Infectious Disease**, v. 16, p. 48-54,
275 2010. <https://doi.org/10.3201/eid1601.090729>

276

277 EFSA - European Food Safety Authority. **The European Union summary**
278 **report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-**
279 **borne outbreaks in 2013**. EFSA Journal, v. 13, n. 1, 162 p., 2015.
280 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>

281
282 EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The European Union**
283 **summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and**
284 **food-borne outbreaks in 2016.** EFSA, 2017. Disponível em:
285 <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5500>> Acesso em:
286 19/12/2019.

287
288 EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **European Food Safety**
289 **Authority (EFSA). *Salmonella* control in poultry flocks and its public**
290 **health impact.** EFSA, 2019. Disponível em:
291 <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5596>>
292 Acesso em: 07/11/2019.

293
294 ENG, S., et al. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and
295 antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284-293, 2015.
296 <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>

297
298 ETTER, A. J., et al. *Salmonella* enterica subsp. *enterica* serovar Heidelberg
299 food isolates associated with a salmonellosis outbreak have enhanced stress
300 tolerance capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85,
301 e01065-19, 2019. <https://doi.org/10.1128/AEM.01065-19>

302
303 EUCAST – EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY
304 **TESTING. EUCAST Reading guide for broth microdilution. Version 1.0.**
305 EUCAST, 2019. Disponível em:
306 <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf> Acesso em:
307 19/10/2019.

308
309 EU - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.
310 **EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in**
311 **human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates.** Stockholm: The Centre;
312 2014.

313
314 FARIA, A. M. **Principais sorotipos de *Salmonella enterica* isolados em**
315 **suínos.** 2013. 41 f. Seminário de Doutorado. Universidade Federal de Goiás.
316 2013.

317
318 FIGUEIREDO, R., et al. Resistência a antibióticos em isolados de *Salmonella*
319 *enterica* em alimentos de origem animal. **Revista Portuguesa de Ciências**
320 **Veterinárias.** v. 108, p. 39-43, 2013.

321
322 FITZGERALD, C. et al. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter*
323 *jejuni* during an outbreak involving a food handler. **Journal of Clinical**
324 **Microbiology.** v. 39, n. 7, p. 2386-2390, 2001.
325 <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2386-2390.2001>

326
327 FREDRIKSSON-AHOMAA, M. Wild boar: a reservoir of foodborne zoonoses.
328 **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 3, p. 153–165, 2019.
329 <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2512>

331
332 GAY, K. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of
333 *Salmonella enterica*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 297–304,
334 2006. <https://doi.org/10.1086/505397>

335
336 GIERALTOWSKI, L., et al. National Outbreak of Multidrug Resistant *Salmonella*
337 Heidelberg Infections Linked to a Single Poultry Company. **PLoS ONE**, v. 11, n.
338 9, e0162369, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162369>

339
340 GILCHRIST, C. A., et al. Whole-genome sequencing in outbreak analysis.
341 **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, p. 541–563, 2015.
342 <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-13>

343
344 GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and
345 interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection,**
346 **Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866-875, 2010.
347 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.023>

348
349 GOGOI, P., et al. Efficacy of pulsedfield gel electrophoresis and repetitive
350 element sequence-based pcr in typing of *Salmonella* isolates from Assam,
351 **Indian Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, e02043-e0204317, 2018.
352 <https://doi.org/10.1128/JCM.02043-17>

353
354 GOUVEIA, M. A. D. C.; LINS, M. T. C.; SILVA, G. A. P. Acute diarrhea with
355 blood: diagnosis and drug treatment. **Jornal de Pediatria** (Rio J), 2019.

356
357 GUPTA, R. et al. Carriage of Class 1 integrons and molecular characterization
358 of intI1 gene in multiridg-resistant *Salmonella* spp. isolates from broilers.
359 **Veterinary World**, v. 12, n. 4, p. 609-613, 2019.
360 <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.609-613>

361
362 GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella*
363 serovars World Health Organization Collaborating Center for Reference and
364 Research on *Salmonella* (9th ed.): Institut Pasteur, Paris. 2007.

365
366 HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS E.M.F. Prevalência de sorovares de
367 *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17,
368 n. 2, p. 55-62, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X1997000200003>

369
370 HU, L., KOPECKO, D. J. Typhoid *Salmonella*. In: MILLOTIS, M. D.; BIER, J.W.
371 (Ed.). **International handbook of foodborne pathogens**. New York: Marcel
372 Dekker, Inc; p. 151–165, 2003. <https://doi.org/10.1201/9780203912065.ch10>

373
374 IBRAHIM, G. M. and MORIN, P.M. *Salmonella* Serotyping Using Whole
375 Genome Sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2993, 2018.
376 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02993>

377
378 JAJERE, S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the
379 pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance

380 including multidrug resistance. **Veterinary World**, v. 12, p. 504-521, 2019.
381 <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

382

383 JONES, T. F., et al. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype.
384 **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p. 109-114, 2008.
385 <https://doi.org/10.1086/588823>

386

387 KICH, J. D.; CARDOSO, M. Salomelose In: SOBESTIANSKY, Y.;
388 BARCELLOS, D., **Doenças dos suínos**. Goiânia: Canône Editorial.
389 Bacterioses. p. 257-264, 2012.

390

391 KONATÉ, A., et al. Epidemiology and Resistance Phenotypes of *Salmonella*
392 spp. Strains Responsible for gastroenteritis in Children Less Than Five Years of
393 Age in Ouagadougou, Burkina Faso. **Archives of Clinical Microbiology**,
394 v.10, n. 2, p. 90, 2019. <https://doi.org/10.36648/1989-8436.10.2.90>

395

396 KOSER, C. U., et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in
397 diagnostic and public health microbiology. **PLoS Pathogens**, v. 8, e1002824,
398 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002824>

399

400 LABRIOLA, J. M.; ZHOU, Y.; NAGAR, B. Structural Analysis of the Bacterial
401 Effector AvrA Identifies a Critical Helix Involved in Substrate Recognition.
402 **Biochemistry**, v. 57, p. 4985-4996, 2018.
403 <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00512>

404

405 LAMAS, A. et al. A comprehensive review of non-enterica subspecies
406 of *Salmonella enterica*. **Microbiological Research**, v. 206, p. 60-73, 2018.
407 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>

408

409 LIMA, T.; DOMINGUES, S.; Da SILVA, G. J. Plasmid-mediated colistin
410 resistance in *Salmonella enterica*: a review. **Microorganisms**, v. 7, e55, 2019.
411 <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020055>

412

413 LIN, D.; CHEN, S. First detection of conjugative plasmid-borne fosfomycin
414 resistance gene *fosA3* in *Salmonella* isolates of food origin. **Antimicrobial**
415 **Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1381-1383, 2015.
416 <https://doi.org/10.1128/AAC.04750-14>

417

418 LIU, Y.Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism
419 MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular
420 biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, 16(2), 161-168,
421 2016. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)

422

423 LUPOLOVA, N., DALLMAN, T. J., HOLDEN, N. J., GALLY, D. L. Patchy
424 promiscuity: machine learning applied to predict the host specificity
425 of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. **Microbial genomics**, 3(10),
426 e000135, 2017. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000135>

427

428 MEDEIROS, M. A. N. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of
429 *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista**

430 Panamericana de Salud Pública, v. 30, n. 6, p. 555–560, 2011.
431 <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200010>

432

433 MELETIS, G. and SKOURA, L. Polymyxin resistance mechanisms: from
434 intrinsic resistance to *Mcr* genes. **Recent Patents on Anti-Infective Drug**
435 **Discovery**, v. 13, p. 198–206, 2018.
436 <https://doi.org/10.2174/1574891X14666181126142704>

437

438 MELO, R. T., et al. Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni*
439 biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 15, 2017.
440 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01332>

441

442 MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade**
443 **genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública,**
444 **isolados de frangos de corte no Brasil**. 2016. 146 f. Tese (Doutorado em
445 Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.
446

447 MENDONÇA, E. P. et al. Spread of the serotypes and antimicrobial resistance in
448 strains of *Salmonella* spp. isolated from broiler. **Brazilian Journal of**
449 **Microbiology**, v. 1, p. 1-8, 2019.

450

451 MICHAEL, G. B. et al. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance
452 in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1898-1914,
453 2006. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.019>

454

455 MICHAILIDIS, G.; THEODORIDIS, A.; AVDI, M. Effects of sexual maturation
456 and *Salmonella* infection on the expression of Toll-like receptors in the chicken
457 vagina. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 234-241, 2011.
458 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.01.010>

459

460 MIIRMOMENI, M. H., KIANI, S., SISAKHTNEZHAD S. Rapid detection of
461 *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning.
462 **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 11: 1497-1501, 2008.
463 <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1497.1501>

464

465 MOORE, M. M., et al. Evaluation of a Bead-Based *Salmonella* Molecular
466 Serotyping Method for *Salmonella* Isolated from Food and Environmental
467 Samples. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 11, p. 1973–1987, 2019.
468 <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-600>

469

470 NAKAO, J. H., et al. Unusually high illness severity and short incubation periods
471 in two foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections with potential
472 coincident *Staphylococcus aureus* intoxication. **Epidemiology and Infection**, v.
473 146, p. 19-27, 2018. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002655>

474

475 NASCIMENTO, S. R. L. Análise genômica comparativa de *Salmonella enterica*
476 sorovares Heidelberg e Typhimurium de origem avícola. 49p. Dissertação
477 (Mestrado) Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias,
478 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Areia, 2017.
479

480 NASCIMENTO, V.P., et al. Identificação de sorovares de *Salmonella* em cortes
481 e carcaças de frango. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**,
482 **19.**, 1997, Rio de Janeiro, RJ. Anais... Rio de Janeiro: 1997. p. 287-287.

483

484 NARMS – NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING
485 SYSTEM FOR ENTERIC BACTERIA: **Annual Retail Meat Report: CDC, 2013.**
486 Disponível em:
487 <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm334828.htm>> Acesso em:
488 18 out. 2019.

489

490 NISAR, M., et al. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of
491 *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the midwestern
492 United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, p. 370-
493 375, 2017. <https://doi.org/10.1177/1040638717690784>

494

495 OAKENSON, K. F., et al. Bioinformatic analyses of whole-genome sequence
496 data in a public health laboratory. **Emerging and Infectious Diseases**, v. 23, p.
497 1441-1445, 2017. <https://doi.org/10.3201/eid2309.170416>

498

499

500 OCHOA, I. M. F.; RODRIGUEZ, A. V. Mecanismos moleculares de
501 patogenicidad de *Salmonella* sp. **Review Article**, v. 47, n. 1-2, p. 25-42, 2005.

502

503 OLIVEIRA, A. P. de., et al. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de
504 patogenicidade. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n. 6, p. 1947-1972, 2013.

505

506 OLORUNSOLA, R. A. et al. *Salmonella* organism transmission in hatching
507 broiler eggs. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 2, n. 10, p.
508 13-16, 2012.

509

510 PARISI, A., et al. Health Outcomes from Multidrug
511 Resistant *Salmonella* Infections in High-Income Countries: A Systematic
512 Review and Meta-Analysis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 7, p.
513 428-436, 2018. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2403>

514

515 PARRA-SUESCUN, J.; AGUDELO-TRUJILLO, J. H.; LOPEZ-HERRERA, A.
516 *Escherichia coli* lipopolysaccharides decrease molecular expression and activity
517 of disaccharidases and aminopeptidases in weaned pigs. **Revista Colombiana**
518 **de Ciencias Pecuarias**, v. 28, n. 1, p. 64-73, 2015.

519

520 RASFF – RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED. **Notifications by**
521 **product category and notifying country**. European Commission. RASFF,
522 2019. Disponível em: <<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>> Acesso em: 12/11/2019.

523

524

525 REIS, R. O. dos, SOUZA, M. N. et al. Increasing prevalence and dissemination
526 of invasive nontyphoidal *Salmonella* serotype Typhimurium with multidrug
527 resistance in hospitalized patients from southern Brazil. **The Brazilian Journal**
528 **of Infectious Diseases**. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.08.002>

529

530 REZENDE, C. S. M., et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de
531 frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a
532 antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, p.
533 199-203, 2005.

534

535 ROBICSEK, A. et al.. qnr prevalence in ceftazidime-resistant
536 Enterobacteriaceae isolates from the United States. **Antimicrobial Agents and**
537 **Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2872-2874, 2006.
538 <https://doi.org/10.1128/AAC.01647-05>

539

540 RODRIGUES, C. F. Pesquisa de coliformes e *Salmonella* spp. em ovos
541 comercializados em feira livre, no município de Espigão do Oeste – Rondônia.
542 Dissertação (Mestrado). São Paulo, 2016.

543

544 RYAN, M. P., O'DWYER, J. ADLEY, C. C. Evaluation of the Complex
545 Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*
546 Hindawi. **BioMed Research International**, v. 1, p. 6, 2017.
547 <https://doi.org/10.1155/2017/3782182>

548

549 SEKYERE, J. O.; ASANTE, J. Emerging mechanisms of antimicrobial
550 resistance in bacteria and fungi: advances in the era of genomics. **Future**
551 **Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 241–262, 2018. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0172>

553

554 SILVA, P. L. A. P. A., et al. Biofilm Formation in Different *Salmonella* Serotypes
555 Isolated from Poultry. **Current Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 124-129, 2019.
556 <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1599-5>

557

558 SIVARAMALINGAM, T., et al. A temporal study of *Salmonella* serovars from
559 environmental samples from poultry breeder flocks in Ontario between 1998
560 and 2008. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, p. 1-11, 2013.

561

562 SOUZA, I. D. P. Heidelberg é a salmonela da vez. **O presente rural -**
563 **Avicultura, corte e postura**. p.28, 2015.

564

565 TACK, D. M., et al. Preliminary Incidence and Trends of Infections with
566 Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases
567 Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015–2018. **Morbidity and**
568 **Mortality Weekly Report**, v. 68, n. 16, p. 369-373, 2019.
569 <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6816a2>

570

571 TANNER, J. R.; KINGSLEY, R. A. Evolution of *Salmonella* within Hosts. **Trends**
572 **in Microbiology**, v. 26, n. 12, p. 986-998, 2018.
573 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.001>

574

575 TRABULSI, L. R.; MIMICA, I. M.; MIMICA, L. M. J. Características dos
576 principais grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações. In:
577 TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo:
578 Atheneu, 2008. p. 87-91.

579

580 VAN ASTEN, A. J. A. M.; KONINKX, J. F. J. G.; VAN DIJK, J. E. *Salmonella*
581 entry: M cells versus absorptive enterocytes. **Veterinary Microbiology**, v. 108,
582 p. 149-152, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.001>

583

584 VAN BAMBEKE, et al. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology**
585 and **Infection**, v. 11, n. 4, p. 256-80, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01131.x>

587

588 VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from
589 broiler farms in Brazil. **Journal of Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433-441,
590 2015. <https://doi.org/10.3382/ps/peu081>

591

592 WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Genotyping of *Campylobacter* spp.
593 **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2000.
594 <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.1-9.2000>

595

596 WEBBER, B., et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg
597 isolated from chicken carcasses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**
598 **de São Paulo**, v. 61, e36, 2019. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961036>

599

600 WHITE, D. G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T. C. The National
601 Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). **NMC Annual Meeting**
602 **Proceedings**, Florida, p. 56-60, 2006.

603

604 WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Critically Important**
605 **Antimicrobials for Human Medicine**. WHO, 2011. 3rd rev. Geneva,
606 Switzerland.

607

608 WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella**. WHO, 2015.
609 Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em:
610 21/10/2019.

611

612 WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella**. 2020. Disponível
613 em:<https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne_diseases/salmonella/en/>. Acesso em: 02/02/2020.

615

616 WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Typhoid vaccines: WHO position
617 paper. **WHO The Weekly Epidemiological Record**, v. 13, n. 93, p. 153–72,
618 2018.

619

620 WHO/FAO/OIE - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **1st Joint FAO/OIE/WHO**
621 **Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial**
622 **Resistance: Scientific Assessment**, Geneva, December 2003.

623

624 YOO, A. Y., et al. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf
625 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.
626 430, p. 131-136, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.025>

627

628 YORK, A. Lysozyme protects bacteria from β-lactams. **Nature Reviews**
629 **Microbiology**, v. 16, p. 183, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.26>

630
631 YUKI, K. E., et al. CYRI/FAM49B negatively regulates RAC1-driven cytoskeletal
632 remodelling and protects against bacterial infection. **Nature Microbiology**,
633 v. 4, p. 1516–1531, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0484-8>
634
635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698

ANEXOS

699 **1 Normas do periódico Current Microbiology - Capítulo 2**

700

701 **Current Microbiology**
702 Instructions for Authors

703

704 **Aims & Scope**

705

706 **Current Microbiology** is a well-established journal that publishes articles in all aspects of microbial
707 cells and viruses including the interactions between microorganisms, their hosts and environment.

708 **Current Microbiology** publishes original research articles, new taxa, (mini)-reviews, commentaries
709 and letters to the editor, spanning the following areas: physiology, biochemistry, genetics, genomics,
710 biotechnology, ecology, evolution, morphology, taxonomy, diagnostic methods, medical and clinical
711 microbiology and immunology as applied to microorganisms.

712

713 **Manuscript Submission – General**

714

715 Submission of a manuscript implies:

716 - that the work described has not been published before;
717 - that it is not under consideration for publication anywhere else;
718 - that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible
719 authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out.

720 The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

721 **Online Submission**

722 Please follow the hyperlink “Submit online” and upload all of your manuscript files following the
723 instructions provided. Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit
724 these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

725

726 **Compliance with Ethical Standards**

727 To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical
728 and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources
729 of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research
730 involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

731 Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled
732 “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

733 • Disclosure of potential conflicts of interest
734 • Research involving Human Participants and/or Animals
735 • Informed consent

736

737 Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies
738 (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting
739 your article, check the instructions following this section carefully.

740 The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical
741 standards and send if requested during peer review or after publication.

742 The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned
743 guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-
744 mentioned guidelines.

745

746 **Manuscript Submission – Guidelines**

747

748 • **Title Page**

749 The title page should include:

750 • A concise and informative title
751 • The name(s) of the author(s) must be formatted as 'full first name, middle initial, full last
752 name'.
753 • The affiliation(s) and full institutional address(es) and where possible the ORCID of the
754 author(s)

755 We strongly recommend the use of standard individual identifiers, especially ORCID
756 <https://orcid.org/>

757 Please visit the ORCID site where you can create an ORCID profile, or link your existing
758 profile to this account. For more information about this journal's ORCID policy, please visit
759 the ORCID FAQ: www.springernature.com/orcid

760 • The institutional e-mail address and telephone number of the corresponding author
761 • Abstract

762 Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any
763 undefined abbreviations or unspecified references.

764 • Keywords

765 Please provide a list of (X) keywords

766

767

768 • **Types of papers**

769 **Current Microbiology** welcomes the following article categories:

770 research articles, new taxa, (mini)-reviews, commentaries & letters to the editor.

771 **Research Articles:** The text should be clear and concise and should not exceed 6,000 words
772 (excluding only references). The maximum number of figures is 5 (up to 4 panels each). The
773 maximum number of references is 50.

774 **Structure:** Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements,
775 Compliance with Ethical Standards, Authors' Contributions and References

776

777 **New Taxa:**

778 It is expected that descriptions of novel Archaeal and Bacterial taxa will include data from
779 genome sequence analyses (see specific guidance on Descriptions and Style Guide of Novel
780 Microbial Taxa link for further details).

781 The text should be clear and concise and should not exceed 6,000 words (excluding only
782 references). The maximum number of figures is 5 (up to 4 panels each). The maximum
783 number of references is 50.

784 **Structure:** Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements,
785 Authors' Contributions, Compliance with Ethical Standards, and References

786

787 **(mini)-Reviews:**
788 The length of a Review Article will depend on the topic covered but should not exceed 8,000
789 words (excluding references) or 5,000 words in case of a mini-Review. The maximum
790 number of references is 100.
791 **Structure:** Abstract, Introduction, The body of the review should be organized into sub-
792 sections headed by informative sub-titles, Conclusion, Acknowledgements, Authors'
793 Contributions and References.
794
795 **Letters to the Editor:** Letters to the Editor are brief communications focusing on an article
796 that has been published in the journal within the previous six months. They should focus on
797 some aspect(s) of the paper that is, in the author's opinion, incorrectly stated or interpreted,
798 controversial, misleading or in some other way worthy of comment. All Letters to the Editor
799 must address a scientific issue in an objective fashion, should have fewer than 1,000 words
800 (main body text), and will be externally refereed.
801
802
803 • **Materials and Methods**
804 The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in
805 two publicly accessible culture collects located in two different countries. The collections
806 much be listed in the WDCM (see the below Link for a complete list of the WDCM culture
807 collections which are all suitable).
808 The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the
809 strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented
810 (this includes also optimized sequences of known genes), a **GenBank/EMBL accession
811 number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a
812 separate paragraph at the end of the Materials and methods section.**
813 Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via
814 the Link below).
815 For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment
816 (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the Link below) and publication
817 guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the
818 American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below Link) must be
819 followed up. One biological replicate will not be acceptable.
820
821 For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to
822 one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the
823 manuscript just like as nucleotide accession numbers.
824 For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be
825 indicated.
826 • WDCM culture collections <http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/>
827 • NCBI Bio Project <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>
828 • HUPO proteomics standard initiative <http://www.psidev.info/?q=node/91>
829
830 **Genome Sequencing Data**
831 Authors are requested to provide full genome sequencing data along with their description of a new
832 taxon. If it's not possible to obtain sequence data please give a short explanation on the reasons in
833 your cover letter. Submissions without genome sequencing data will be evaluated on a case-by-case
834 basis.
835

836 • **Text Formatting**

837 Manuscripts should be submitted in Word.

- 838 • Use a normal, plain font (e.g., 12-point Times Roman) for text.
- 839 • Use italics for emphasis.
- 840 • Use the automatic page numbering function to number the pages.
- 841 • Do not use field functions.
- 842 • Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- 843 • Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- 844 • Use the equation editor or MathType for equations.
- 845 • Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

847 Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- 848 • [LaTeX macro package \(zip, 183 kB\)](#)

849

850 **Headings**

851 Please do not use more than three levels of displayed headings.

852 **Abbreviations**

853 Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

854

855 **Scientific style**

- 856 • Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- 857 • Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- 859 • Genus and species names should be in italics.
- 860 • Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- 862 • Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:
863 Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown
864 quantities
865 Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions
866 or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)
867 Bold for vectors, tensors, and matrices.

868

869 **References**870 Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets and in the order
871 by which they are cited in the original manuscript. Some examples:

- 872 1. Negotiation research spans many disciplines [3].
- 873 2. This effect has been widely studied [1-3, 7].

874 The list of references should only include manuscripts that are cited in the text and that have been
875 published or accepted for publication. Whenever possible, please cite the original source.

876 References format:

877 • Journal article

878 Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009)
879 Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent
880 children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

881 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long
882 author lists will also be accepted:

883 Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med*
884 965:325-329

885 • Article by DOI

886 Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J*
887 *Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

888 • Book

889 South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

890 • Book chapter

891 Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern
892 genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

893 • Online document

894 Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.
895 <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

896 • Dissertation

897 Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

898

899 Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word
900 Abbreviations, see

901 • [ISSN.org LTWA](http://issn.org/LTWA)

902 If you are unsure, please use the full journal title.

903 For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-
904 text citations and reference list.

905 • [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

906 Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic bst which is included in
907 Springer’s LaTeX macro package.

908 • *Tables*

909 • All tables are to be numbered using Arabic numerals.

910 • Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

911 • For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of
912 the table.

913 • Identify any previously published material by giving the original source in the form
914 of a reference at the end of the table caption.

915 • Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or
 916 asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the
 917 table body.

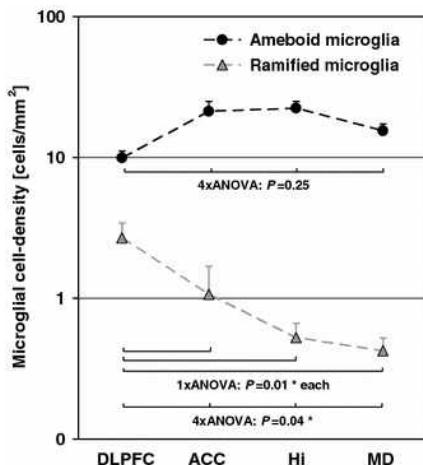
918

919 • *Artwork and Illustrations Guidelines*

920 Electronic Figure Submission

921 • **Supply all figures electronically separately from the main manuscript file.**
 922 • Indicate what graphics program was used to create the artwork.
 923 • For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF
 924 format. MSOffice files are also acceptable.
 925 • Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
 926 • Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

927 Line Art



928

929 • Definition: Black and white graphic with no shading.
 930 • **Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within
 931 the figures are legible at final size.**
 932 • All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
 933 • Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum
 934 resolution of 1200 dpi.
 935 • Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

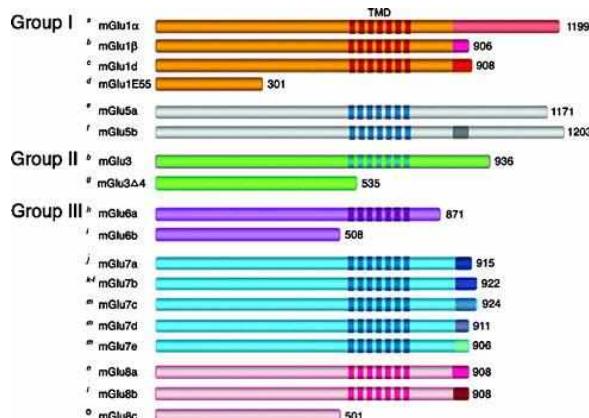
936 Halftone Art



937

938 • Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
 939 • If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars
 940 within the figures themselves.
 941 • Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
 942

943 Combination Art



944

945 • Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line
 946 drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
 947 • Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

948 Color Art

949 • Color art is free of charge.
 950 • Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

951 Figure Lettering

952 • To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
 953 • Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about
 954 2–3 mm (8–12 pt).
 955 • Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt
 956 type on an axis and 20-pt type for the axis label.
 957 • Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
 958 • Do not include titles or captions within your illustrations.

959 Figure Numbering

960 • All figures are to be numbered using Arabic numerals.

961 • Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
962 • Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
963 • If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue
964 the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,
965 "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material)
966 should, however, be numbered separately.

967 Figure Captions

968 • Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure
969 depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
970 • Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number,
971 also in bold type.
972 • No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be
973 placed at the end of the caption.
974 • Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles,
975 etc., as coordinate points in graphs.
976 • Identify previously published material by giving the original source in the form of a
977 reference citation at the end of the figure caption.

978 Figure Placement and Size

979 • Figures should be submitted separately from the text, if possible.
980 • When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
981 • For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174
982 mm
983 (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

984 Permissions

985 If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission
986 from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some
987 publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any
988 costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other
989 sources should be used.

990 Accessibility

991 In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please
992 make sure that:
993 • All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech
994 software or a text-to-Braille hardware)
995 • Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information
996 (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
997 • Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1
998

999 • **Acknowledgments and Funding Information**

1000 Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title
1001 page. The names of funding organizations should be written in full. In addition, please provide the
1002 funding information in a separate step of the submission process in the peer review system. Funder
1003 names should preferably be selected from the standardized list you will see during submission. If the
1004 funding institution you need is not listed, it can be entered as free text.

1005 Funding information will be published as searchable metadata for the accepted article, whereas
1006 acknowledgements are published within the paper.

1007

1008 • **Author contribution statements**

1009 Authors are required to include a statement of responsibility in the manuscript, including
1010 review-type articles that specify the contribution of every author. Author contribution
1011 statements are included in the published paper.

1012

1013 • **Electronic Supplementary Material (ESM)**

1014 Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other
1015 supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can
1016 add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more
1017 convenient in electronic form.

1018 Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read
1019 the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories
1020 wherever possible.

1021 ESM - Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

1029 • **Research Data Policy**

1030 A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant
1031 raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for non-commercial
1032 purposes, without breaching participant confidentiality.

1033 The journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should
1034 be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in
1035 publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript
1036 or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on
1037 recommended repositories.

1038 [List of Repositories](#)

1039 [Research Data Policy](#)

1040 General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may be used where
1041 appropriate.

1042 Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the
1043 reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite:
1044 authors, title, publisher (repository name), and identifier.

1045 [DataCite](#)

1046 Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories
 1047 exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. Persistent identifiers
 1048 (such as DOIs and accession numbers) for relevant datasets must be provided in the paper
 1049 For the following types of data set, submission to a community-endorsed, public repository is
 1050 mandatory:

| Mandatory deposition | Suitable repositories |
|---|---|
| Protein sequences | Uniprot |
| DNA and RNA sequences | Genbank DNA DataBank of Japan (DDBJ) EMBL Nucleotide Sequence Database (ENA) |
| DNA and RNA sequencing data | NCBI Trace Archive NCBI Sequence Read Archive (SRA) |
| Genetic polymorphisms | dbSNP dbVar European Variation Archive (EVA) |
| Linked genotype and phenotype data | dbGAP The European Genome-phenome Archive (EGA) |
| Macromolecular structure | Worldwide Protein Data Bank (wwPDB) Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) Electron Microscopy Data Bank (EMDB) |
| Microarray data (must be MIAME compliant) | Gene Expression Omnibus (GEO) ArrayExpress |
| Crystallographic data for small molecules | Cambridge Structural Database |

1051
 1052 For more information:
 1053 [Research Data Policy Frequently Asked Questions](#)

1054 **Data availability**

1055 The journal encourages authors to provide a statement of Data availability in their article. Data
 1056 availability statements should include information on where data supporting the results reported in
 1057 the article can be found, including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets
 1058 analysed or generated during the study. Data availability statements can also indicate whether data
 1059 are available on request from the authors and where no data are available, if appropriate.

1060 Data Availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one
 1061 if required for multiple datasets):

- 1062 • 1. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in
 1063 the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- 1064 • 2. The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly
 1065 available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the
 1066 corresponding author on reasonable request.
- 1067 • 3. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available
 1068 from the corresponding author on reasonable request.
- 1069 • 4. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed
 1070 during the current study.
- 1071 • 5. All data generated or analysed during this study are included in this published article [and
 1072 its supplementary information files].

1073 More examples of template data availability statements, which include examples of openly available
 1074 and restricted access datasets, are available:

1075 **Data availability statements**

1076 This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data
 1077 repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and
 1078 does not advise on specific manuscripts.

1079

1080 ***Ethical Responsibilities of Authors***

1081 **Current Microbiology** is committed to upholding the integrity of the scientific record.

1082 As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE
 1083 guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

1084 Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the
 1085 journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour.
 1086 Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good
 1087 scientific practice, which include*:

- 1088 - The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous
 1089 consideration.
- 1090 - The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any
 1091 form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of
 1092 previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns
 1093 about text-recycling ('self-plagiarism').
- 1094 - A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of
 1095 submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-
 1096 slicing/publishing').
- 1097 - Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions
 1098 are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different
 1099 group of readers.

1100 - Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or
 1101 inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should
 1102 adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
 1103 - No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own
 1104 ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes
 1105 material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation
 1106 marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of
 1107 material, and permissions secured for material that is copyrighted.

1108 **Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.**

1109

1110 Authors should make sure they have permissions for the use of software,
 1111 questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

- 1112 • Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be
 1113 an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that
 1114 could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- 1115 • Research that may be misapplied to pose a threat to public health or
 1116 national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of
 1117 research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or
 1118 toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals,
 1119 weaponization of research/technology (amongst others).
- 1120 • Authors are strongly advised to ensure that the author group, the
 1121 Corresponding Author and the order of authors is all correct at the point of submission.
 1122 Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but
 1123 in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained
 1124 in detail.
 1125 Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a
 1126 manuscript.

1127

1128 *All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as
 1129 copyright and/or moral rights.

1130 Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify
 1131 the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.
 1132 Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

1133 If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an
 1134 investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the
 1135 author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to
 1136 address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's
 1137 implementation of the following measures, including, but not limited to:

- 1138 • If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the
 1139 author.
- 1140 • If the article has already been published online, depending on the nature and
 1141 severity of the infraction:
 1142 - an erratum/correction may be placed with the article
 1143 - an expression of concern may be placed with the article
 1144 - or, in severe cases, retraction of the article may occur.

1145 The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction
1146 note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked
1147 “retracted” and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked
1148 article.

1149 • The author’s institution may be informed
1150 • A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may
1151 be included as part of the author’s and article’s bibliographic record.

1152 Fundamental errors

1153 Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in
1154 their published article.

1155 The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting
1156 the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This
1157 may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of
1158 the article are impacted by the error.

1159 Permissions

1160 Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published
1161 elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and
1162 online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their
1163 papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

1164

1165 After acceptance

1166 Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at
1167 Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate
1168 whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

1169 Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will
1170 receive the proofs.

1171 Copyright transfer

1172 Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher
1173 exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and
1174 dissemination of information under copyright laws.

1175 Offprints

1176 Offprints can be ordered by the corresponding author.

1177 Color illustrations

1178 Online publication of color illustrations is free of charge.

1179 Proof reading

1180 The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and
1181 accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected
1182 values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

1183 After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be
1184 hyperlinked to the article.

1185 **Online First**

1186 The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first
1187 publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by
1188 issue and page numbers.

1189

1190 **English Language Editing**

1191 For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to
1192 ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in
1193 English you should consider:

1194 • Asking a colleague who is proficient in English to review your manuscript for clarity.
1195 • Visiting the English language tutorial, which covers the common mistakes when writing in
1196 English.
1197 • Using a professional language editing service where editors will improve the English to
1198 ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.

1199 Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American
1200 Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of
1201 these services, simply follow the links below.

1202 [English language tutorial](#)

1203 [Nature Research Editing Service](#)

1204 [American Journal Experts](#)

1205 Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this
1206 journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

1207 If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style
1208 before publication.

1209

1210

1211

1212

1213

1214

1215

1216

1217

1218

1219

1220

1221

1222

1223

1224 **2 Normas do periódico Food Control - Capítulo 3**

1225

1226

1227 **Ensure that the following items are present:**

1228 One author has been designated as the corresponding author with contact

1229 details:

1230 • E-mail address

1231 • Full postal address

1232 All necessary files have been uploaded:

1233 *Manuscript:*

1234 • Include keywords

1235 • All figures (include relevant captions)

1236 • All tables (including titles, description, footnotes)

1237 • Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

1238 • Indicate clearly if color should be used for any figures in print

1239 *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)1240 *Supplemental files* (where applicable)

1241 Further considerations

1242 • Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

1243 • All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

1244 • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

1245 • A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare

1246 • Journal policies detailed in this guide have been reviewed

1247 • Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

1252 For further information, visit our [Support Center](#).**Before You Begin**

1253

1254 **Ethics in publishing**

1255

1256 Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).1258 **Declaration of interest**

1259

1260 All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work.

1261 Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent

1262 applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose

1263

1265 any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in
 1266 the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there
 1267 are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest:
 1268 none'. This summary statement will be ultimately published if the article is
 1269 accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest
 1270 form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential
 1271 interests to be declared in both places and that the information matches. [More](#)
 1272 [information](#).

1273 **Submission declaration and verification**

1274

1275 Submission of an article implies that the work described has not been published
 1276 previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic
 1277 thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information),
 1278 that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is
 1279 approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities
 1280 where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published
 1281 elsewhere in the same form, in English or in any other language, including
 1282 electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify
 1283 originality, your article may be checked by the originality detection
 1284 service [Crossref Similarity Check](#).

1285 **Preprints**

1286 Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with
 1287 Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not
 1288 count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for
 1289 more information).

1290 **Use of inclusive language**

1291

1292 Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is
 1293 sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make
 1294 no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain
 1295 nothing which might imply that one individual is superior to another on the
 1296 grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use
 1297 inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from
 1298 bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by
 1299 making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead
 1300 of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

1301 **Author contributions**

1302

1303 For transparency, we encourage authors to submit an author statement file
 1304 outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT
 1305 roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition;
 1306 Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software;
 1307 Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing -
 1308 review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of
 1309 authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

1310 **Changes to authorship**

1311
1312 Authors are expected to consider carefully the list and order of
1313 authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of
1314 authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or
1315 rearrangement of author names in the authorship list should be made
1316 only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the
1317 journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following
1318 from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and
1319 (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the
1320 addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of
1321 authors, this includes confirmation from the author being added or removed.
1322 Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion
1323 or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the
1324 Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If
1325 the manuscript has already been published in an online issue, any requests
1326 approved by the Editor will result in a corrigendum.

1327 **Copyright**

1328
1329 Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal
1330 Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to
1331 the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a
1332 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this
1333 agreement.

1334 Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles
1335 including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of
1336 the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for
1337 all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts
1338 from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written
1339 permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article.
1340 Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

1341 For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be
1342 asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)).
1343 Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the
1344 author's choice of user license.

1345 **Author rights**

1346 As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse
1347 your work. [More information](#).

1348 **Elsevier supports responsible sharing**

1349 Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

1350 **Role of the funding source**

1351
1352 You are requested to identify who provided financial support for the conduct of
1353 the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of

1354 the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and
1355 interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit
1356 the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then
1357 this should be stated.

1358 **Open access**

1359

1360 Please visit our [Open Access page](#) for more information.

1361 **Elsevier Researcher Academy**

1362 [Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early
1363 and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn"
1364 environment at Researcher Academy offers several interactive modules,
1365 webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process
1366 of writing for research and going through peer review. Feel free to use these
1367 free resources to improve your submission and navigate the publication process
1368 with ease.

1369 **Language (usage and editing services)**

1370 Please write your text in good English (American or British usage is accepted,
1371 but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript
1372 may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to
1373 conform to correct scientific English may wish to use the [English Language](#)
1374 [Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

1375 **Submission**

1376

1377 Our online submission system guides you stepwise through the process of
1378 entering your article details and uploading your files. The system converts your
1379 article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files
1380 (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All
1381 correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for
1382 revision, is sent by e-mail.

1383

1384 Authors must provide and use an email address unique to themselves and not
1385 shared with another author registered in EES, or a department.

1386 **Referees**

1387 Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential
1388 referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the
1389 sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



1390 **Preparation**

1391 **Peer review**

1392

1393 This journal operates a single blind review process. All contributions will be
1394 initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed
1395 suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert

1396 reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible
1397 for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's
1398 decision is final. [More information on types of peer review](#).

1399 ***Use of word processing software***

1400 It is important that the file be saved in the native format of the word processor
1401 used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as
1402 simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on
1403 processing the article. In particular, do not use the word processor's options to
1404 justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts,
1405 superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only
1406 one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used,
1407 use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared
1408 in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to](#)
1409 [Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text
1410 graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See
1411 also the section on Electronic artwork.

1412 To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check'
1413 and 'grammar-check' functions of your word processor.

1414
1415 **Request you to kindly submit your manuscript with continuous line
1416 numbers.**

1417 **Article structure**

1418 ***Subdivision - numbered sections***

1419 Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections
1420 should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not
1421 included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-
1422 referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief
1423 heading. Each heading should appear on its own separate line.

1424 ***Introduction***

1425 State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding
1426 a detailed literature survey or a summary of the results.

1427 ***Materials and Methods***

1428 Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent
1429 researcher. Methods that are already published should be summarized, and
1430 indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method,
1431 use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing
1432 methods should also be described.

1433 ***Key Resources Table***

1434 To enable reproducibility of the research, we encourage authors to submit a
1435 Key Resources Table, which helps make the resources clear to readers. The
1436 Key Resources Table highlights the genetically modified organisms and strains,
1437 cell lines, reagents and other resources essential to reproduce the results

1438 presented in a paper. More information is available
1439 here <https://www.elsevier.com/authors/author-resources/key-resources-table>

1440 ***Theory/calculation***

1441 A Theory section should extend, not repeat, the background to the article
1442 already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In
1443 contrast, a Calculation section represents a practical development from a
1444 theoretical basis.

1445 ***Results***

1446 Results should be clear and concise.

1447 ***Discussion***

1448 This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.
1449 A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid
1450 extensive citations and discussion of published literature.

1451 ***Conclusions***

1452 The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions
1453 section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results
1454 and Discussion section.

1455 ***Appendices***

1456 If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc.
1457 Formulae and equations in appendices should be given separate numbering:
1458 Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.
1459 Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

1460 **Essential title page information**

- 1461 • ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval
1462 systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- 1463 • ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and
1464 family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled.
1465 You can add your name between parentheses in your own script behind the
1466 English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the
1467 actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-
1468 case superscript letter immediately after the author's name and in front of the
1469 appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including
1470 the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- 1471 • ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at
1472 all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility
1473 includes answering any future queries about Methodology and
1474 Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details
1475 are kept up to date by the corresponding author.**
- 1476 • ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work
1477 described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address'
1478 (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name.
1479 The address at which the author actually did the work must be retained as the
1480

1481 main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such
1482 footnotes.

1483 **Highlights**

1484

1485 Highlights are mandatory for this journal as they help increase the
1486 discoverability of your article via search engines. They consist of a short
1487 collection of bullet points that capture the novel results of your research as well
1488 as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at
1489 the examples here: [example Highlights](#).

1490 Highlights should be submitted in a separate editable file in the online
1491 submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5
1492 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

1493 **Abstract**

1494

1495 A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the
1496 purpose of the research, the principal results and major conclusions. An
1497 abstract is often presented separately from the article, so it must be able to
1498 stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential,
1499 then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon
1500 abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their
1501 first mention in the abstract itself.

1502 **Keywords**

1503

1504 Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using
1505 American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts
1506 (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only
1507 abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will
1508 be used for indexing purposes.

1509 **Abbreviations**

1510 Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed
1511 on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the
1512 abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote.
1513 Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

1514 **Acknowledgements**

1515 Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before
1516 the references and do not, therefore, include them on the title page, as a
1517 footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help
1518 during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof
1519 reading the article, etc.).

1520 **Formatting of funding sources**

1521 List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's
1522 requirements:

1523 Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant
1524 numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant
1525 number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

1526 It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of
1527 grants and awards. When funding is from a block grant or other resources
1528 available to a university, college, or other research institution, submit the name
1529 of the institute or organization that provided the funding.

1530 If no funding has been provided for the research, please include the following
1531 sentence:

1532 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the
1533 public, commercial, or not-for-profit sectors.

1534 **Units**

1535 Follow internationally accepted rules and conventions: use the international
1536 system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in
1537 SI.

1538 **Math formulae**

1539 Please submit math equations as editable text and not as images. Present
1540 simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/)
1541 instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle,
1542 variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently
1543 denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed
1544 separately from the text (if referred to explicitly in the text).

1545 **Mathematical and technical settings**

1546 Use the appropriate number of significant figures to express your data - they
1547 should be justifiable and reflect the necessary level of accuracy of the method.
1548 A normal maximum should be 3 - e.g. 37.1, 2.53). Detailed mathematical
1549 discussion should be placed in an appendix. Equations and formulae should be
1550 typewritten. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals
1551 in parentheses on the right hand side of the page. Special symbols should be
1552 identified in the margin, and the meaning of all symbols should be explained in
1553 the text where they first occur. If you use several symbols, a list of definitions
1554 (not necessarily for publication) will help the editor. Type mathematical
1555 equations exactly as they should appear in print. Journal style for letter symbols
1556 is as follows: italic (indicated by underlining); constants, roman type; matrices
1557 and vectors, bold type (indicated by wavy underlining).

1558 **Footnotes**

1559 Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the
1560 article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature
1561 may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text
1562 and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not
1563 include footnotes in the Reference list.

1564 **Artwork**

1565 **Electronic artwork**1566 *General points*

- 1567 • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- 1568 • Embed the used fonts if the application provides that option.
- 1569 • Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New
- 1570 Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- 1571 • Number the illustrations according to their sequence in the text.
- 1572 • Use a logical naming convention for your artwork files.
- 1573 • Provide captions to illustrations separately.
- 1574 • Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- 1575 • Submit each illustration as a separate file.
- 1576 • Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired
- 1577 color vision.

1578 A detailed guide on electronic artwork is available.

1579 **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed**
1580 **information are given here.**

1581 *Formats*

1582 If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word,
1583 PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.
1584 Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your
1585 electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of
1586 the following formats (note the resolution requirements for line drawings,
1587 halftones, and line/halftone combinations given below):

1588 EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

1589 TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum
1590 of 300 dpi.

1591 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a
1592 minimum of 1000 dpi.

1593 TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale),
1594 keep to a minimum of 500 dpi.

1595 **Please do not:**

- 1596 • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG);
1597 these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- 1598 • Supply files that are too low in resolution;
- 1599 • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

1600 **Color artwork**

1601 Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or
1602 JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If,
1603 together with your accepted article, you submit usable color figures then
1604 Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in
1605 color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not
1606 these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color**
1607 **reproduction in print, you will receive information regarding the costs**
1608 **from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your
1609 preference for color: in print or online only. Further information on the
1610 preparation of electronic artwork.

1611 *Figure captions*

1612 Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not
1613 attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure
1614 itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations
1615 themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

1616 *Tables*

1617
1618 Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed
1619 either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end.
1620 Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text
1621 and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables
1622 and ensure that the data presented in them do not duplicate results described
1623 elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table
1624 cells.

1625 *References***1626 *Citation in text***

1627 Please ensure that every reference cited in the text is also present in the
1628 reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be
1629 given in full. Unpublished results and personal communications are not
1630 recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these
1631 references are included in the reference list they should follow the standard
1632 reference style of the journal and should include a substitution of the publication
1633 date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a
1634 reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

1635 *Web references*

1636 As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference
1637 was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates,
1638 reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references
1639 can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading
1640 if desired, or can be included in the reference list.

1641 *Data references*

1642 This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your
1643 manuscript by citing them in your text and including a data reference in your
1644 Reference List. Data references should include the following elements: author
1645 name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and
1646 global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so
1647 we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not
1648 appear in your published article.

1649 *References in a special issue*

1650 Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list
1651 (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

1652 *Reference management software*

1653 Most Elsevier journals have their reference template available in many of the

most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:
<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-control>
When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.
<https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Helicon*, 19, e00205.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003).
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>
Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality*

1703 *data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions.*
1704 Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.
1705 Reference to a conference paper or poster presentation:
1706 Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image
1707 Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image
1708 Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session
1709 presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive
1710 Therapies, New York, NY.

1711 ***Journal abbreviations source***

1712 Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word](#)
1713 [Abbreviations](#).

1714 **Video**

1715
1716 Elsevier accepts video material and animation sequences to support and
1717 enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that
1718 they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to
1719 these within the body of the article. This can be done in the same way as a
1720 figure or table by referring to the video or animation content and noting in the
1721 body text where it should be placed. All submitted files should be properly
1722 labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure
1723 that your video or animation material is directly usable, please provide the file in
1724 one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB
1725 per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online
1726 in the electronic version of your article in Elsevier Web products,
1727 including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose
1728 any frame from the video or animation or make a separate image. These will be
1729 used instead of standard icons and will personalize the link to your video data.
1730 For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note:
1731 since video and animation cannot be embedded in the print version of the
1732 journal, please provide text for both the electronic and the print version for the
1733 portions of the article that refer to this content.

1734 **Data visualization**

1735
1736 Include interactive data visualizations in your publication and let your readers
1737 interact and engage more closely with your research. Follow the
1738 instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how
1739 to include them with your article.

1740 **Supplementary material**

1741
1742 Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be
1743 published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are
1744 published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as
1745 such online). Please submit your material together with the article and supply a
1746 concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make
1747 changes to supplementary material during any stage of the process, please
1748 make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a

1749 previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft
1750 Office files as these will appear in the published version.

1751 **Research data**

1752
1753 This journal encourages and enables you to share data that supports your
1754 research publication where appropriate, and enables you to interlink the data
1755 with your published articles. Research data refers to the results of observations
1756 or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility
1757 and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code,
1758 models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the
1759 project.

1760 Below are a number of ways in which you can associate data with your article or
1761 make a statement about the availability of your data when submitting your
1762 manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to
1763 cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the
1764 "References" section for more information about data citation. For more
1765 information on depositing, sharing and using research data and other relevant
1766 research materials, visit the [research data page](#).

1767 ***Data linking***

1768 If you have made your research data available in a data repository, you can link
1769 your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of
1770 repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving
1771 readers access to underlying data that gives them a better understanding of the
1772 research described.

1773 There are different ways to link your datasets to your article. When available,
1774 you can directly link your dataset to your article by providing the relevant
1775 information in the submission system. For more information, visit the [database](#)
1776 [linking page](#).

1777 For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear
1778 next to your published article on ScienceDirect.

1779 In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the
1780 text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR:
1781 AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

1782 ***Mendeley Data***

1783 This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data
1784 (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols,
1785 and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access
1786 repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you
1787 will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley*
1788 *Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your
1789 published article online.

1790 For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

1791 **Data statement**

1792 To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data
 1793 in your submission. This may be a requirement of your funding body or
 1794 institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will
 1795 have the opportunity to indicate why during the submission process, for
 1796 example by stating that the research data is confidential. The statement will
 1797 appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit
 1798 the [Data Statement page](#).


After Acceptance

1799

1800 **Online proof correction**

1801

1802 To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to
 1803 provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors
 1804 will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing
 1805 annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS
 1806 Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and
 1807 answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster
 1808 and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections,
 1809 eliminating the potential introduction of errors.
 1810 If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF
 1811 version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to
 1812 authors, including alternative methods to the online version and PDF.
 1813 We will do everything possible to get your article published quickly and
 1814 accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing,
 1815 completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant
 1816 changes to the article as accepted for publication will only be considered at this
 1817 stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all
 1818 corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully
 1819 before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be
 1820 guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

1821 **Offprints**

1822

1823 The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share](#)
 1824 [Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article
 1825 on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any
 1826 communication channel, including email and social media. For an extra charge,
 1827 paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the
 1828 article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may
 1829 order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding
 1830 authors who have published their article gold open access do not receive a
 1831 Share Link as their final published version of the article is available open access
 1832 on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.


Author Inquiries

1833

1834

1835 Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will
1836 find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.
1837 You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your](#)
1838 [accepted article will be published](#)

1839