

**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<sup>a</sup>. 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 2020	<p>Monteiro, Guilherme Paz, 1988- Relação filogenética, virulência e resistência aos antimicrobianos de <i>Salmonella</i> spp isoladas de alimentos e pacientes clínicos [recurso eletrônico] : Interface entre segurança alimentar e saúde pública / Guilherme Paz Monteiro. - 2020.</p> <p>Orientadora: Daise Aparecida Rossi. Coorientadora: Ana Laura Grazziotin. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós- graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.385">http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.385</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Rossi, Daise Aparecida, 1963-, (Orient.). II. Grazziotin, Ana Laura, 1985-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.</p> <p>CDU: 619</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



**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 ZOONOSSES				

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(às) 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 **Belchiolina 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](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



peessoas 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.

Agradeço 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<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>* - 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 3ª 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<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>SHV</sub>* -  $\beta$ -lactams) by the PCR technique. The minimum inhibitory concentration (MIC) determined the phenotypic resistance to the classes of antimicrobials considered important: meropenem:  $\beta$  lactam / carbapenem; colistin: polymyxins; ciprofloxacin: fluoroquinolones; ceftriaxone:  $\beta$ -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

<b>Tabela 1.</b>	Genes e funções, condições de amplificação, tamanho do amplicon e referências utilizadas na avaliação de <i>S. Typhimurium</i> .	56
<b>Tabela 2.</b>	Perfis de virulência de <i>S. Typhimurium</i> isoladas de alimentos e humanos no Brasil entre 2011 e 2017	59
<b>Tabela 3.</b>	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
<b>Tabela 4.</b>	Perfis de resistência aos antimicrobianos em <i>S. Typhimurium</i> isoladas de alimentos e humanos no Brasil entre 2011 a 2017.	63
<b>S1 Tabela</b>	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

<b>Tabela 1.</b>	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
<b>Tabela 2.</b>	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

<b>Tabela 3.</b>	Perfil gênico de virulência de <i>S. Heidelberg</i> isoladas de alimentos e humanos no Brasil de 2011 a 2017.	<del>80</del>
<b>Tabela 4.</b>	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
<b>Tabela 5.</b>	Perfis de resistência aos antimicrobianos de <i>S. Heidelberg</i> isoladas de alimentos e humanos no Brasil entre 2011 a 2017.	93
<b>Tabela A1</b>	Identificação e dados do isolamento das cepas de <i>Salmonella Heidelberg</i> 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 $\beta$ -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 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

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

### 2.1. ESPECÍFICOS

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

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

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

- a presença de genes associados à resistência aos antimicrobianos: *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>* (classe dos betalactâmicos) e *qnrS* e *qnrA* (classe das fluorquinolonas), utilizando a técnica de PCR;

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

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

- os dados da PCR para criar perfis de patogenicidade;

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

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

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

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

### 3.2 Características gerais do gênero *Salmonella*

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

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

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

As características bioquímicas usadas para identificação fenotípica de *Salmonella* incluem a produção de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), ausência de produção de indol, redução de nitratos a nitritos, descarboxilação da lisina e ornitina, não hidrolisar a uréia, utilizar o citrato como fonte de carbono, produzir gás pela fermentação da glicose, não fermentar a lactose e sacarose, positividade para os testes de catalase e vermelho de metila e negativa para os testes de oxidase, urease e fenilalanina (ATIKUR et al., 2019).

### 3.3 Características e dados epidemiológicos do gênero *Salmonella*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.4 Sintomatologia e prevenção de salmonelose em humanos

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

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

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

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

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

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

### 3.5 *Salmonella* e cadeia produtiva avícola

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **3.7.1 $\beta$ -lactâmicos**

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

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

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

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

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

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

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

O gene *bla<sub>CMY</sub>* carrega a mensagem para sintetizar a enzima  $\beta$ -lactamase AmpC, responsável pela resistência às cefalosporinas, e está associado a plasmídeos. Esse tipo de associação facilita a permuta do gene que promove a resistência entre bactérias e pode ser propagada à população bacteriana. Pode-se inferir que o aumento expressivo de micro-organismos resistentes às cefalosporinas na atualidade é resultante dessa associação (AARESTRUP, 2004; CARSON et al., 2019).

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

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

### 3.7.2 Quinolonas e fluoroquinolonas

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

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

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



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

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

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

### 3.7.3 Polimixinas

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

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

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

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

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

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

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

#### 3.7.4 Fosfomicinas

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

Ao estudar uma cepa do gênero *Salmonella* isolada de alimento, Lin e Chen (2015) descreveram um mecanismo de resistência a esse fármaco mediado por *fosA3*, o primeiro gene de resistência a fosfomicina, localizado em um plasmídeo conjugativo. Nessa pesquisa, constatou-se que esse mesmo plasmídeo carregava, além do gene *fosA3*, o *bla<sub>CTX-M-55</sub>* e levantou-se a hipótese de que ele possa propagar entre enterobactérias.

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

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

#### 3.7.5 *Salmonella* multirresistentes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **3.7.6 Marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos em *Salmonella***

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.8 Virulência

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

### **3.9 Similaridade genética de *Salmonella* spp**

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

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

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

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

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

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

Outra técnica molecular tem sido utilizada em pesquisas, o sequenciamento de parte ou do genoma bacteriano completo. Ao interpretar o genoma sequenciado, é possível avaliar se a cepa possui determinados genes de virulência já descritos e que são relacionados à resistência antimicrobiana, à 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  
1109  
1110  
1111  
1112  
1113  
1114  
1115  
1116  
1117  
1118  
1119  
1120  
1121  
1122  
1123  
1124  
1125  
1126  
1127  
1128  
1129  
1130  
1131  
1132  
1133

## CAPÍTULO 2

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

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

1134 Potencial virulento, susceptibilidade aos antimicrobianos e a relação filogenética de *Salmonella*  
1135 Typhimurium isoladas de alimentos e humanos no Brasil

1136 **Guilherme Paz Monteiro<sup>1</sup>, Eliane Pereira Mendonça<sup>1,2</sup>, Fernanda Aparecida Longato dos Santos<sup>1</sup>,**  
1137 **Edson Campos Valadares Júnior<sup>1</sup>, Roberta Torres de Melo<sup>1</sup>, Phelipe Augusto Borba Martins**  
1138 **Peres<sup>1</sup>, Dália dos Prazeres Rodrigues<sup>3</sup>, Belchiolina Beatriz Fonseca<sup>1</sup>, Daise Aparecida Rossi<sup>1</sup>**

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

## Resumo

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

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

## Abstract

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



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

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

## Introdução

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

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

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

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

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

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

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

## Material e métodos

### Origem das cepas

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

### Desenho do estudo

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

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

### Genes associados à virulência e resistência

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

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

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

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

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

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

**Tabela 1.** Genes e funções, condições de amplificação, tamanho do amplicon e referências utilizadas na 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>	TCCACAATGGGGCGGCGGCG CCTGACGCACCATTACGCTG	350	Virulência- Fímbria	35x (94°C, 45s / 66°C, 30s / 72°C,	[10]

90s)

<i>lpfA</i>	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTTAACAGAAACCAGT	250	Virulência- Fímbria	35x (94°C, 45s / 50°C, 30s / 72°C, 90s)	[12]
<i>sopE</i>	ACACACTTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	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>	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	Virulência- Invasão	35x (94°C, 45s / 58°C, 30s / 72°C, 90s)	[13]
<i>hilA</i>	CTGCCGCGAGTGTTAAGGATA CTGTCGCCTTAATCGCATGT	497	Virulência- Invasão	35x (94°C, 45s / 50°C, 30s / 72°C, 90s)	[11]
<i>sivH</i>	CAGAATGCGAATCCTTCGCAC GTATGCGAACAAGCGTAACAC	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<sub>TEM</sub></i>	CAGCGGTAAGATCCTTGAGA ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	643	Resistência- β-lactâmicos	30x (94°C, 45s / 50°C, 45s / 72°C, 90s)	[16]
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	GGCCGCGTAGGCATGATAGA CCCGGCGATTGCTGATTTC	714	Resistência- β-lactâmicos	30x (94°C, 45s / 56°C, 45s / 72°C, 90s)	[16]
<i>qnrA</i>	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	Resistência- Fluoroquinolonas	35x (95°C, 60s / 54°C, 60s / 72°C, 90s)	[17]
<i>qnrS</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	Resistência- Fluoroquinolonas	35x (95°C, 60s / 54°C, 60s / 72°C, 90s)	[17]

## Concentração inibitória mínima (CIM)

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

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

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

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

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

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

## Similaridade genética

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

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

## Análise dos resultados

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

## Resultados e discussão

### Genes de virulência

Houve 100% de positividade para os genes *invA*, *agfA*, *hilA* e *sivH*. O gene *avrA* foi identificado 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 *sefA* não foi identificado em nenhuma das 43 cepas. O teste de Fisher não apontou diferença ( $p>0,05$ ) na prevalência dos genes entre as amostras de alimentos e humanos. Foram identificados cinco perfis de virulência distintos (Tabela 2), com todas as cepas apresentando positividade concomitante para pelo menos cinco genes.

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

## Resistência aos antimicrobianos

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

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

**Tabela 3.** Distribuição da CIM e percentuais de resistência e resistência intermediária em cepas de *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) <sup>a</sup>	35 (81,4) <sup>c</sup>	10 (23,2) <sup>b</sup>	18 (41,9) <sup>b</sup>
Total de resistência intermediária - I (%)	35 (81,4) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	19 (44,2) <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
Total de R e I (%)	35 (81,4) <sup>a</sup>	35 (81,4) <sup>a</sup>	29 (67,4) <sup>a</sup>	18 (41,9) <sup>b</sup>

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

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

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

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

**Tabela 4.** Perfis de resistência aos antimicrobianos em *S. Typhimurium* isoladas de alimentos e humanos 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) <sup>b</sup>
PII: CFT/COL/CIP	0 (0,0)	2 (8,8)	2 (4,6) <sup>b</sup>
PIII: COL/CIP/[CFT]/[MER]	0 (0,0)	1 (4,3)	1 (2,3) <sup>b</sup>
PIV: COL/CIP/[MER]	1 (5,0)	4 (17,4)	5 (11,7) <sup>ab</sup>
PV: CFT/COL/[MER]	2 (10,0)	3 (13,1)	5 (11,7) <sup>ab</sup>
PVI: COL/CIP/[CFT]	0 (0,0)	1 (4,3)	1 (2,3) <sup>b</sup>
PVII: CFT/CIP/[MER]	1 (5,0)	0 (0,0)	1 (2,3) <sup>b</sup>
PVIII: COL/[CFT]/[MER]	6 (30,0)	7 (30,4)	13 (30,4) <sup>a</sup>
PIX: CIP/[CFT]/[MER]	2 (10,0)	0 (0,0)	2 (4,6) <sup>b</sup>
PX: COL/CIP	2 (10,0)	0 (0,0)	2 (4,6) <sup>b</sup>
PXI: CFT/COL	0 (0,0)	1 (4,3)	1 (2,3) <sup>b</sup>
PXII: COL/[MER]	1 (5,0)	1 (4,3)	2 (4,6) <sup>b</sup>
PXIII: CIP/[MER]	1 (5,0)	2 (8,8)	3 (7,1) <sup>b</sup>
PXIV: COL/[CFT]	2 (10,0)	0 (0,0)	2 (4,6) <sup>b</sup>
PXV: [MER]	2 (10,0)	0 (0,0)	2 (4,6) <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>20 (100,0)</b>	<b>23 (100,0)</b>	<b>43 (100,0)</b>

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

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

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

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

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

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

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

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

## Genes de resistência antimicrobiana

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

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

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

## Similaridade genética

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Conclusão

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



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

## Agradecimentos

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

## Referências

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

2. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016; EFSA, 2017. (Acesso 26 Novembro, 2019, em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5500>.)
3. Ministério da Saúde (MS, Brasil). Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: MS, 2018. (Acesso 21 Agosto, 2019, em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>.)
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Contact with Dairy Calves: CDC, 2018. (Acesso 11 Agosto, 2019, em: <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>.)
5. Ministério da Saúde (MS, Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: MS, 2016.
6. Reis RO dos, Souza MN, Cecconi MCP, Timm L, Ikuta N, Simon D. et al. Increasing prevalence and dissemination of invasive nontyphoidal *Salmonella* serotype Typhimurium with multidrug resistance in hospitalized patients from southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2018; 22: 424-432
7. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J*. 2015; 13: 162.
8. Lupolova N, Dallman TJ, Holden NJ, Gally DL. Patchy promiscuity: machine learning applied to predict the host specificity of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Microb. Genom.* 2017; 3: e000135.
9. Tack DM, Marder EP, Griffin PM, Cieslak PR, Dunn J, Hurd S. et al. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015–2018. *MMWR*. 2019; 68: 369-373.
10. Collinson SK, Dig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella Enteritidis* to fibronectin. *J Bacteriol.* 1993; 175: 12–18.
11. Guo X, Chen J, Beuchat LR, Brackett RE. PCR Detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hila*. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 5248-5252.
12. Heuzenroeder MW, Murray CJ, Dalcin RM. Molecular basis of benign colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. *RIRDC*, 2001; 106.
13. Oliveira SD, Santos LR, Schuch DM, Silva AB, Salle CT, Canal CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet Microbiol.* 2002; 87:25-35.
14. Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, De Zoete MH, Winter S, Papaconstantinopoulou A et al. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: Identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun.* 2003; 71: 629–640.

15. Prager R, Rabsch W, Streckel W, Voigt W, Tietze E, Tschape H. Molecular properties of *Salmonella* enteric Serotype Paratyphi B Distinguish between Its Systemic and Its Enteric Pathovars. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4270-4278.
16. Chen S, Zhao S, White DG, Schroeder CM, Lu R, Yang H. et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. Appl Environ Microbiol, 2004; 70: 1-7.
17. Cattoir V, Weill FX, Poirel L, Fabre L, Soussy C, Nordmann P. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. J Antimicrob Chemother 2007; 59:751-754.
18. Castilla KS, Ferreira CSA, Moreno AM, Nunes IA, Ferreira AJP. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* e *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. Braz J Microbiol. 2006; 37: 135-139.
19. World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine. Geneva: WHO; 2011.
20. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Reading guide for broth microdilution. Version 1.0. EUCAST, 2019. (Acesso 22 Novembro, 2019, em: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2019\\_manuals/Reading\\_guide\\_BMD\\_v\\_1.0\\_2019.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf).)
21. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. EUCAST, 2019. (Acesso 22 Novembro, 2019, em: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf).)
22. Magiorakos, AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18: 268-281.
23. Center Disease and Control (CDC). Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Campylobacter jejuni* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). PulseNet USA. The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance. CDC, 2013.
24. Melo RT, Mendonça EP, Monteiro GP, Siqueira MC, Pereira CB, Peres PABM. et al. Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. Front Microbiol. 2017; 8:15.
25. Barth S, Bauerfeind R. Virulence plasmids of *Salmonella enterica*: incidence and properties. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2005; 118: 8-23.
26. Borges KA, Furian TQ, Borsoi A, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. Pesq Vet Bras. 2013; 33: 1416-1422.
27. Mirmomeni MH, Kiani S, Sisakhtnezhad S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. Pak J Biol Sci. 2008; 11: 1497-1501.

28. ElSheikh M, Abdeen EE, Ammar AM, Hussien A. Molecular Detection of Some Virulence Genes of *Salmonella* Serotypes Isolated From Poultry in Egypt. *Journal of Current Veterinary Research..* 2019; 1.
29. Petrovska L, Mather AE, AbuOun M, Branchu P, Harris SR, Connor T. et al. Microevolution of monophasic *Salmonella* Typhimurium during epidemic, United Kingdom, 2005-2010. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22: 617– 624.
30. Ahmed HA, El-Hofy FI, Shafik SM, Abdelrahman MA, Elsaid GA. Characterization of Virulence-Associated Genes, Antimicrobial Resistance Genes, and Class 1 Integrons in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Isolates from Chicken Meat and Humans in Egypt. *Foodborne Pathog Dis.* 2016; 13: 281–288.
31. Aravena C, Valencia B, Villegas A, Ortega M, Fernández AR, Araya PR, et al. Caracterización de cepas clínicas y ambientales de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg aisladas en Chile. *Rev Med Chile.* 2019; 147: 24-33.
32. Borges K, Furian T, Souza S, Salle C, Moraes H, Nascimento V. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotypes Isolated from Poultry Sources in Brazil. *Braz J Poultry Sci.* 2019; 21.
33. Von Hertwig AM, Neto DPA, de Almeida EA, Casas MRT, da Silva do Nascimento M. Genetic diversity, antimicrobial resistance and virulence profile of *Salmonella* isolated from the peanut supply chain. *Int J Food Microbiol.* 2019; 294: 50-54.
34. Webber B, Borges KA, Furian TQ, Rizzo NN, Tondo EC, Santos RS et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2019; 61:e36.
35. Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12: 405-28.
36. Yoo AY, Yu JE, Yoo H, Lee TH, Lee WH, Oh Ji, et al. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 430: 131-136.
37. Campioni F, Bergamini AMM, Falcão JP. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiol.* 2012; 32: 254-264.
38. Labriola JM, Zhou Y, Nagar B. Structural Analysis of the Bacterial Effector AvrA Identifies a Critical Helix Involved in Substrate Recognition. *Biochemistry.* 2018; 57: 4985-4996.
39. Ochoa IMF, Rodriguez AV. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Review Article. *Rev Latinoam Microbiol.* 2005; 47: 25-42.
40. Lin D, Chen K, Wai-Chin Chan E, Chen S. Increasing prevalence of ciprofloxacin-resistant food-borne *Salmonella* strains harboring multiple PMQR elements but not target gene mutations. *Sci. Rep.* 2015; 5: 14754.
41. Nisar M, Kassem II, Rajashekara G, Goyal SM, Lauer d, Voss S et al. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the midwestern United States. *J Vet Diagn Invest.* 2017; 29:370–375.

42. Chiou CS, Hong Y, Liao Y, Wang Y, Tu Y, Chen B, et al. New Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Anatum Clone, Taiwan, 2015–2017. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25:144-147.
43. Gupta R, Chauhan SL, Kumar S, Jindal N, Mahajan NK, Joshi VG. Carriage of Class 1 integrons and molecular characterization of *intI1* gene in multidrug-resistant *Salmonella* spp. isolates from broilers. *Vet World*. 2019; 12: 609–613.
44. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa N° 26, de 09 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal: Brasil, 2009.
45. Mendonça EP, Melo RT, Nalevaiko PC, Monteiro GP, Fonseca BB, Galvão NN. et al. Spread of the serotypes and antimicrobial resistance in strains of *Salmonella* spp. isolated from broiler. *Braz J Microbiol*. 2019; 50: 515–522.
46. Pribul BR, Festivo ML, de Souza MMS dos Prazeres Rodrigues D. Characterization of quinolone resistance in *Salmonella* spp. isolates from food products and human samples in Brazil. *Braz J Microbiol*. 2016; 47: 196–201.
47. Ministério da Saúde (MS, Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, MS Brasil, 2012. (Acesso 21 Novembro, 2019 em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>).
48. Mendonça EP. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. Tese Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia. 2016. (Acesso 01 Dezembro, 2019 em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17625/1/CaracteristicasVirulenciaResistencia.pdf>).
49. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum B-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 117-123.
50. Pandini JA, Pinto FGS, Muller JM, Weber LD, Moura AC. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* sp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arq Inst Biol*. 2014; XX: 1-6.
51. Vinueza-Burgos C, Cevallos M, Ron-Garrido L, Bertrand S, De Zutter L. Prevalence and Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter Age. *PLoS One*. 2016; 11:e0159567.
52. Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TSR, Almeida JN de, Duarte AJ da S. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis*, 2017; 21: 98–101.
53. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) Instrução Normativa N°45, de 22 de novembro de 2016. 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. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito 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.** <sup>1</sup>CBR = carne bovina  
1811    resfriada; <sup>2</sup>SBM = salada de batata com maionese; <sup>3</sup>CMS = carne mecanicamente separada; <sup>4</sup>FR = farinha  
1812    de resíduos; <sup>5</sup>CSC = carne suína congelada; <sup>6</sup>Sec. = secreção; <sup>7</sup>Cong. = 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 <sup>1</sup>
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 <sup>2</sup>
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 <sup>3</sup>
19T	2017	Alimento	MG	Orelha suína
20T	2015	Humano	RS	Fezes
21T	2016	Alimento	SC	CMS <sup>3</sup>
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 <sup>4</sup>
29T	2011	Humano	RS	Fezes
30T	2015	Humano	RS	Fezes
31T	2012	Alimento	MT	CSC <sup>5</sup>
32T	2013	Alimento	SC	CF
33T	2016	Humano	GO	Sec. <sup>6</sup> 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. <sup>7</sup>
41T	2013	Humano	MG	Humano
42T	2013	Humano	RS	Sangue
43T	2011	Humano	RS	Fezes

1819 <sup>1</sup>CBR = carne bovina resfriada; <sup>2</sup>SBM = salada de batata com maionese; <sup>3</sup>CMS = carne mecanicamente  
1820 separada; <sup>4</sup>FR = farinha de resíduos; <sup>5</sup>CSC = carne suína congelada; <sup>6</sup>Sec. = secreção; <sup>7</sup>Cong. =  
1821 congelado.

1822

1823

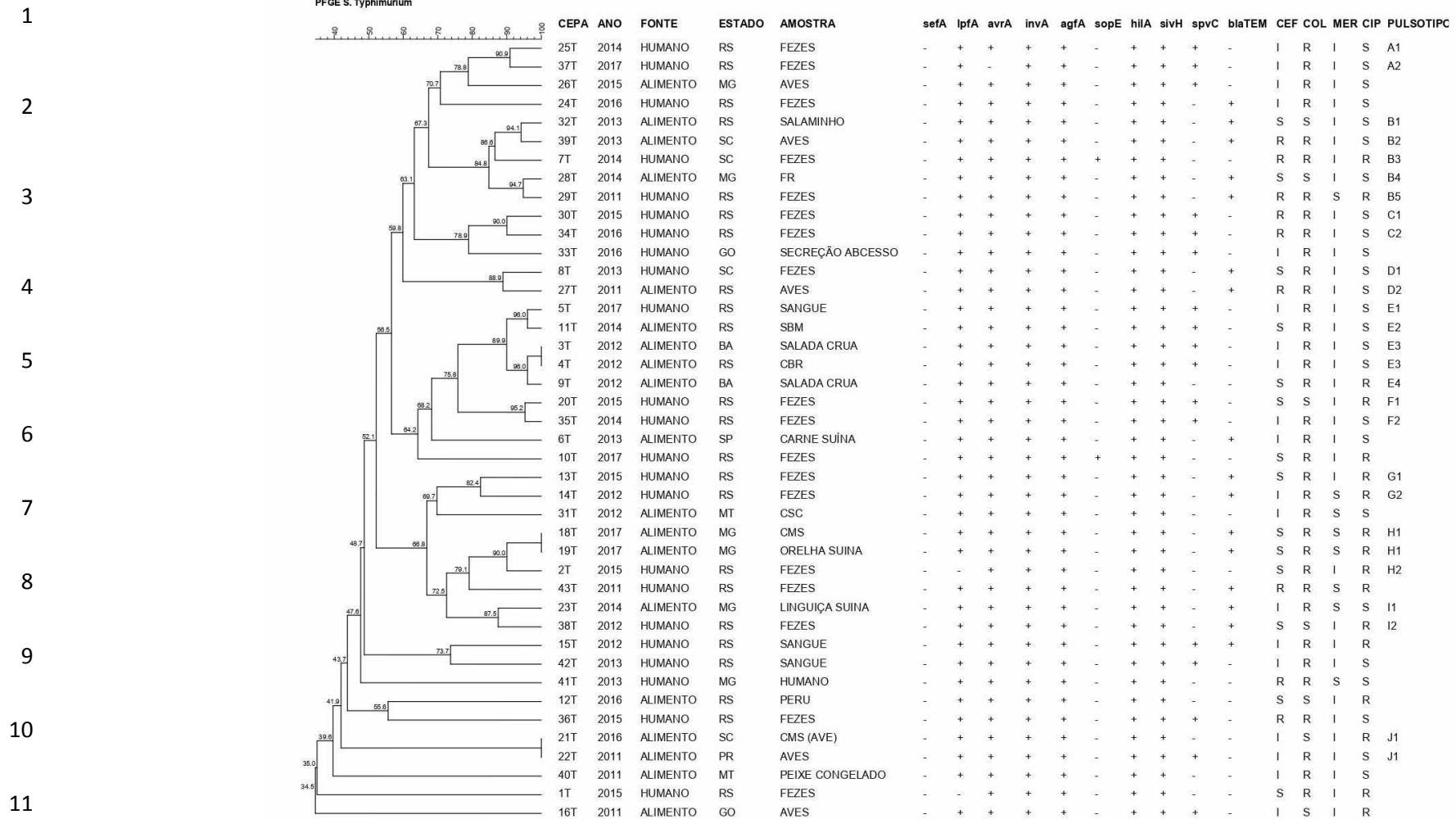
1824

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  
 13 Dice/UPGMA (tolerância de 0,5%, otimização de 0,5%, clusterização > 80%).

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

### **CAPÍTULO 3**

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

Artigo a ser publicado no periódico  
**Food Control**

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

Guilherme Paz Monteiro<sup>1</sup>, Eliane Pereira Mendonça<sup>1,2</sup>, Edson Campos Valadares Júnior<sup>1</sup>,  
Fernanda Aparecida Longato dos Santos<sup>1</sup>, Roberta Torres de Melo<sup>1</sup>, Phelipe Augusto Borba  
Martins Peres<sup>1</sup>, Dália dos Prazeres Rodrigues<sup>3</sup>, Belchiolina Beatriz Fonseca<sup>1</sup>, Rodrigo Profeta  
Silveira Santos<sup>4</sup>, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo<sup>4</sup>, Ana Laura Grazziotin<sup>1</sup>, Daise Aparecida  
Rossi<sup>1</sup>

- <sup>4</sup>. Laboratório de Epidemiologia Molecular, Universidade Federal de Uberlândia,  
Uberlândia, MG, Brasil.
- <sup>5</sup>. Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil.
- <sup>6</sup>. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Laboratório de Enterobactérias, Rio de Janeiro,  
RJ, Brasil.
- <sup>7</sup>. 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](mailto:guil.paz@hotmail.com)

## Resumo

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

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

## Abstract

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

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

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

## 1. Introdução

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

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

## 2. Material e métodos

### 2.1 Amostras e amostragem

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

### 2.2 Genes de virulência e resistência aos antimicrobianos

Foram pesquisados, individualmente, pela técnica de PCR, nove genes de virulência: *invA*, *hila*, *avrA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*, *sopE*, *spvC* e *sivH* e quatro genes associados a resistência aos antimicrobianos: *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* (classe dos  $\beta$ -lactâmicos) e *qnrS* e *qnrA* (classe das fluoroquinolonas).

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

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, 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®).

**Tabela 1.** Peso molecular (pb), fator de virulência, sequência dos *primers*, protocolo de amplificação e referências utilizadas para identificação de genes de 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	TCCACAATGGGGCGGCGGCG CCTGACGCACCATTACGCTG	94°C, 45seg 66°C, 30seg, 72°C, 90seg	35	(Collinson et al., 1993)
<i>lpfA</i>	250	Fímbria	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTTAACAGAAACCAGT	94°C, 45seg 50°C, 30seg, 72°C, 90seg	35	(Heuzenroeder, Murray & Dalcin, 2001)
<i>sopE</i>	398	Proteína efetora	ACACACTTTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	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	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	94°C, 45seg 58°C, 30seg, 72°C, 90seg	35	(Oliveira et al., 2002)
<i>hilA</i>	497	Invasão	CTGCCGCAGTGTTAAGGATA CTGTCGCCTTAATCGCATGT	94°C, 45seg 50°C, 30seg, 72°C, 90seg	35	(Guo et al., 2000)
<i>sivH</i>	763	Invasão	CAGAATGCGAATCCTTCGCAC GTATGCGAACAAGCGTAACAC	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 **Tabela 2.** Peso molecular (pb), classe de antimicrobianos, sequência dos *primers*, protocolo de amplificação e referências utilizadas para identificação de  
 225 Genes de resistência em *SH*.

Gene	Peso Molecular (PB)	Classe de Antimicrobianos	Primer (5'→ 3')	Amplificação	Nº de ciclos	Referência
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	643	β-lactâmicos	CAGCGGTAAGATCCTTGAGA ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	94°C, 45seg 50°C, 45seg, 72°C, 90seg	30	Chen et al., 2004
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	714	β-lactâmicos	GGCCGCGTAGGCATGATAGA CCCGGCGATTTGCTGATTTC	94°C, 45seg 56°C, 45seg, 72°C, 90seg	30	Chen et al., 2004
<i>qnrA</i>	580	Fluoroquinolonas	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	95°C, 60seg 54°C, 60seg, 72°C, 90seg	35	Cattoir et al., 2007
<i>qnrS</i>	428	Fluoroquinolonas	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	95°C, 60seg 54°C, 60seg, 72°C, 90seg	35	Cattoir et al., 2007

### 2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM para os antimicrobianos ceftriaxona, ciprofloxacina, meropenem e colistina foi realizada pela técnica da microdiluição em caldo descrita no *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2020).

Resumidamente, preparou-se a suspensão bacteriana com colônias puras em NaCl 0,85% até atingirem a concentração correspondente a escala 0,5 de MacFarland e preparadas diluições para obter oito concentrações dos antimicrobianos, a partir dos valores máximos, sendo eles: ceftriaxona (16,0 µg/mL), ciprofloxacina (1,0 µg/mL), meropenem e colistina (32,0 µg/mL). As diferentes concentrações dos antibióticos e suspensão bacteriana foram adicionadas às placas de micro diluição e incubadas a 36°C por 16 a 20 horas. A leitura foi realizada visualmente, sendo considerada a CIM, a menor concentração de antibiótico em que não houve turvação do caldo.

Para classificação da susceptibilidade foram utilizados os pontos de corte para à família Enterobacterales, (EUCAST, 2019b): ceftriaxona (Triaxon – TEUTO, Brasil) e colistina (Colis-tek - Opem Pharmaceuticals, Brasil) > 2 mg.L<sup>-1</sup>, ciprofloxacina (Ciprodez – Biovet, Brasil) > 0,0625 mg.L<sup>-1</sup> e meropenem (Meropenem – TEUTO, Brasil) > 8 mg.L<sup>-1</sup>.

A classificação das cepas como multirresistentes foi realizada conforme proposto por Magiorakos et al. (2012), que utiliza os pontos de corte propostos pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), EUCAST e *Food and Drug Administration* (FDA) para definir multirresistência como sendo a não suscetibilidade (resistência ou resistência intermediária) a pelo menos um agente em três ou mais categorias (classes e/ou subclasses) de antimicrobianos.

A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo. Para a colistina foi incorporado um segundo controle positivo, a cepa *E. coli* NCTC 13846, positiva para o gene *mcr-1*, conforme recomendado no EUCAST (EUCAST, 2019b).

### 2.4 Similaridade genética (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada conforme protocolo descrito pelo CDC (2013), com a digestão do DNA genômico realizada com 30U da enzima *XbaI* (Invitrogen) por 2 horas a 25°C. Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1% (SeaKem Gold) em tampão TBE 0,5X no aparelho CHEF DRIII (Bio-Rad) por 19 horas, com os seguintes parâmetros, 200v, ângulo de 120°, gradiente de 6v / cm e temperatura do tampão de 14°C. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV.

A construção do dendrograma foi realizada utilizando o *software* GelCompare II, utilizando a análise UPGMA e o coeficiente de similaridade de Dice, considerando como perfis

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

## 2.5 Sequenciamento genômico e montagem dos genomas

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

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

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

## 2.6 Análise dos resultados

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

# 3. Resultados e discussão

## 3.1 Genes de virulência

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.2 Concentração inibitória mínima

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

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

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



**Tabela 4.** Distribuição da CIM e da resistência aos antimicrobianos em *S. Heidelberg* isoladas 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) <sup>a</sup>	30 (83,3) <sup>b</sup>	28 (77,8) <sup>b</sup>	25 (69,4) <sup>b</sup>
Total de resistência intermediária - I (%)	22 (61,1) <sup>a</sup>	--	6 (16,7) <sup>b</sup>	--
Total de R e I (%)	22 (61,1) <sup>a</sup>	30 (83,3) <sup>ab</sup>	34 (94,4) <sup>b</sup>	25 (69,4) <sup>ab</sup>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.3 Genes de resistência

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

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

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

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

### 3.4 Similaridade genética

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.5 Sequenciamento genômico

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

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

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

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

Dentre os genes de resistência identificados no DNA cromossômico considerando grupos de antimicrobianos mais amplamente utilizados na terapêutica humana e/ou animal, destacamos o gene *fosA7* para fosfomicina, *aac(6')* para aminoglicosídeos, *bla<sub>CMY-2</sub>* para beta-lactâmicos/cefalosporinas, *marA* para beta-lactâmicos/carbapenêmicos, e os genes *emrA* e *emrB* para fluoroquinolonas. Os genes identificados no DNA plasmidial foram: *sul2* para sulfonamidas e *tetA* para tetraciclina. Caso esses genes sejam expressos, podemos destacar um perfil de multirresistência alarmante em ambas as cepas.

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

Quanto aos genes associados a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), *bla<sub>CMY-2</sub>*, relacionado à resistência a ceftriaxona, é um dos mais frequentes em isolados de *Salmonella* em alimentos de origem animal (Jeon et al., 2018; Castro-Vargas et al., 2019), e também foram detectados nas cepas 5H e 13H neste estudo. A detecção deste e de outros genes *bla* são motivo de alerta, já que em 2014 o CDC americano relatou mais de 26.000 infecções e 1.700 mortes decorrentes infecções por cepas produtoras de ESBL (CDC, 2014).

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

#### 4. Conclusão

*S. Heidelberg* isoladas de alimentos e pacientes humanos apresentaram a maioria dos genes de virulência pesquisados e caráter de multirresistência aos antimicrobianos, alertando para a ocorrência de quadros de salmonelose potencialmente graves e de difícil tratamento em humanos. Consideramos importante o desenvolvimento de modelos de administração de medicamentos *target*-específicos como alternativa para o tratamento de cepas multirresistentes. O PFGE indicou correlações pontuais entre cepas de alimentos e humanos, evidenciando a infecção de humanos pela via alimentar, mesmo para regiões distantes. O sequenciamento confirmou os dados de resistência fenotípicas obtidos pela CIM e ainda indicou os potenciais mecanismos e genes envolvidos na multirresistência, inclusive para outras classes de antimicrobianos não avaliadas fenotipicamente. Os dados podem servir de alerta aos órgãos de saúde pública para a necessidade do reconhecimento do sorovar *Heidelberg* como potencialmente perigoso à saúde pública, sugerimos ainda que seja listado dentre os sorovares que devem ser monitorados e controlados pelo Programa Nacional de Redução de Patógenos.

#### Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento da pesquisa. À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo fornecimento das cepas.

#### Conflitos de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse

## 5. Referências

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. (2012).  
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES/> Acesso 12 Janeiro 2020.
- Alterthum, F. (2008). Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In L. R. Trabulsi (Ed.), *Microbiologia* (pp. 79-85). São Paulo: Atheneu.
- Aravena, C., Valencia, B., Villegas, A., Ortega, M., Fernández, A. R., Araya, P. R., et al. (2019). Caracterización de cepas clínicas y ambientales de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg aisladas en Chile. *Revista Médica de Chile*, 147: 24-33.
- Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Relatório anual 2016. (2018)  
[http://abpabr.com.br/storage/files/versao\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web1.pdf/](http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf/) Acesso 12 Janeiro 2019.
- Barth, S. & Bauerfeind, R. (2005). Virulence plasmids of *Salmonella enterica*: incidence and properties. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 118: 8-23.
- Ben-Barak, Z., Streckel, W., Yarona, S., Cohenc, S., Prager, R., Tschape, H. (2006). The expression of the virulence-associated effector protein gene *avrA* is dependent on a *Salmonella enterica*-specific regulatory function. *International Journal of Medical Microbiology*, 296: 25-38.
- Bernat, I. G., Lima, J. B., Guedes, L. P. & Pereira, S. S. (2019). *Jornada de Alfabetização do Maranhão: Mobilização Popular. Cultura e Emancipação*. São Luís: Eduema.
- Borges, K. A., Furian, T. Q., Borsoi, A., Moraes, H. L.S., Salle, C. T. P. & Nascimento, V. P. (2013). Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33: 1416-1422.
- Borges, K. A., Furian, T. Q., Souza, S. N., Salle, C. T. P., Moraes, H. L. S., Nascimento, V. P. (2018). Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotypes Isolated from Poultry Sources in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21: 1-8.
- Campioni, F., Bergamini, A. M. M., Falcão, J. P.(2012). Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiology*, 32: 254-264.
- Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum B-lactamase producers. *Clinical and Microbiology Infection*, 14: 117-123.
- Castilla, K. S., Ferreira, C. S. A., Moreno, A. M., Nunes, I. A., Ferreira, A. J. P. (2006) Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* e *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 135-139.

- 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-](http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/05/new-resistance-gene-foundsalmonella-isolated-chickens/)  
 791 [foundsalmonella-isolated-chickens/](http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/05/new-resistance-gene-foundsalmonella-isolated-chickens/) 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 Entiridis* to  
 801 fibronectin. *Journal of Bacteriology*, **175**: 12–18.
- 802 Craciunaș, 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

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

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. (2019b).

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf/](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf/) Acesso 19 Dezembro 2019

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Reading guide for broth microdilution. Version 1.0. (2019a).

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2019\\_manuals/Reading\\_guide\\_BMD\\_v\\_1.0\\_2019.pdf/](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.

European Food Safety Authority (EFSA). EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. (2017).

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5182/> Acesso 26 Janeiro 2019.

European Food Safety Authority (EFSA). *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. (2019)

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5596/> Acesso 02 Agosto 2019.

European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. (2017).

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5500/> Acesso 26 Novembro 2019.

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

Figueiredo, R., Henriques, A., Sereno, R., Mendonça, N., Silva, G. J. (2013). Resistência a antibióticos em isolados de *Salmonella enterica* em alimentos de origem animal.

*Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 108: 39-43.

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

Giuriatti, J., Stefani, L. M., Brisola, M. C., Crecencio, R. B., Bitner, D. S. & Faria, G. A.

(2017). *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Microbial Pathogenesis*, 109, 195–199.

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

- Heuzenroeder, M. W., Murray, C. J., Dalcin, R. M. (2001). Molecular basis of benign colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. *Rural Industries Research and Development Corporation*, (1), 106.
- Hiley, L., Graham, R. M. A. & Jennison, A. V. (2019). Genetic characterisation of variants of the virulence plasmid, pSLT, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium provides evidence of a variety of evolutionary directions consistent with vertical rather than horizontal transmission. *PLoS ONE*, 14: e0215207.
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12, 504-521.
- Karasova, D., Havlickova, H., Sisak, F. & Rychlik, I. (2009). Deletion of *sodCI* and *spvBC* in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reduced its virulence to the natural virulence of serovars Agona, Hadar and Infantis for mice but not for chickens early after infection. *Veterinary Microbiology*, 139, 304-309.
- Keefer, A. B., Xiaoli, L., M'ikanatha, N. M., Yao, K., Hoffmann, M., Dudley, E. G. (2019). Retrospective whole-genome sequencing analysis distinguished PFGE and drug-resistance-matched retail meat and clinical *Salmonella* isolates. *Microbiology*, 165(3), 270-286.
- Kingsley, R. A., Humphries, A. D., Weening, E.H., De Zoete, M. H., Winter, S., Papaconstantinopoulou, A. et al. (2003). Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: Identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infection Immunology*, 71: 629–640.
- Konaté, A., Guessennd, N. K., Kouadio, F. K., Dembélé, R., Kagambèga, A., Kouadio, I. K. et al. Epidemiology and Resistance Phenotypes of *Salmonella* spp. Strains Responsible for gastroenteritis in Children Less Than Five Years of Age in Ouagadougou, Burkina Faso. *Archives of Clinical Microbiology*, 10(2), 90.
- Labriola, J. M., Zhou, Y. & Nagar, B. (2018). Structural Analysis of the Bacterial Effector AvrA Identifies a Critical Helix Involved in Substrate Recognition. *Biochemistry*, 57: 4985-4996.
- Lima, T., Domingues, S.; Da Silva, G. J. (2019). Plasmid-mediated colistin resistance in *Salmonella enterica*: a review. *Microorganisms*, 7, e55.
- Lin, D., Chen, K., Wai-Chin Chan, E., Chen, S. (2015). Increasing prevalence of ciprofloxacin-resistant food-borne *Salmonella* strains harboring multiple PMQR elements but not target gene mutations. *Science Reports*, 5: 14754.
- Lomovskaya, O. & Lewis, K. (1992). Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 8938-8942.

- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology Infection*, 18: 268-281.
- Melo, R. T., Mendonça, E. P., Monteiro, G. P., Siqueira, M. C., Pereira, C. B., Peres, P. A. B. M. (2017) Intrinsic and Extrinsic Aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1332.
- Mendonça, E. P. (2016). Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia. 2016.  
<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17625/1/CaracteristicasVirulenciaResistencia.pdf>/ Acesso 12 Janeiro 2020.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 26, de 09 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. (2009). Brasília, Distrito Federal: Brasil.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) Instrução Normativa Nº45, de 22 de novembro de 2016. 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. (2016). Brasília, Distrito Federal: 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 Nº45, de 22 de novembro de 2016. (2016). Brasília, DF, Brasil.
- Ministério da Saúde . Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. (2018). <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf> ./ Acesso 25 Novembro 2019.
- Mion, L., Colla, F. L., Cisco, I. C., Webber, B., Diedrich, L. N., Pilotto, F. et al. (2014). Perfil de resistência a antimicrobianos por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42: 1197.
- Mirmomeni, M. H., Kiani, S. & Sisakhtnezhad, S. (2008). Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11: 1497-1501.
- Mota, L. J., Sorg, I., Cornelis, G. R. (2005). Type III secretion: The bacteria-eukaryotic express. *FEMS Microbiology Letters*, 252: 1-10.

- Nakao, J.H., Talkington, D., Boop, C. A., Besse, J., Sanchez, M. L., Guarisco, J. et al. (2018). Unusually high illness severity and short incubation periods in two foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections with potential coincident *Staphylococcus aureus* intoxication. *Epidemiology & Infection*, 146(19), 27.
- Nascimento, S. R. L. (2017). *Análise genômica comparativa de Salmonella enterica sorovares Heidelberg e Typhimurium de origem avícola*. 49p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Areia.
- Nisar, M., Kassem, I. I., Rajashekara, G., Goyal, S. M., Lauer, d, Voss S. et al. (2017) Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the midwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29:370–375.
- Noh, E. B., Kim, Y. B., Jeon, H. Y., Seo, K. W., Son, S. H., Lee, Young, J. (2019). Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Salmonella* Serotypes Recovered from Edible Pork Offal from Korea. *Microbial Drug Resistance*, 25(10): 1514-1520.
- Ochoa, I. M. F. & Rodriguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Review Article. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 47: 25-42.
- Oliveira, S. D., Santos, L. R., Schuch, D. M., Silva, A. B., Salle, C. T., Canal, C. W. (2002). Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, 87: 25-35.
- Pandini, J. A., Pinto, F. G. S., Muller, J. M., Weber, L. D., Moura, A. C. (2014). Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* sp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, XX: 1-6.
- Pornsukarom, S., van Vliet, A. H. M. & Thakur, S. (2018). Whole genome sequencing analysis of multiple *Salmonella* serovars provides insights into phylogenetic relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals and agriculture environmental sources. *BMC Genomics*, 19, 801.
- Prager, R., Rabsch, W., Streckel, W., Voigt, W., Tietze, E., Tschape, H. (2003). Molecular properties of *Salmonella* enteric Serotype Paratyphi B Distinguish between Its Systemic and Its Enteric Pathovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4270-4278.
- Pribul, B. R., Festivo, M. L., Rodrigues, M. S., Costa, R. G., Rodrigues, E. C. dos P., de Souza, M. M. S., & Rodrigues, D. dos P. (2017). Characteristics of Quinolone Resistance in *Salmonella* spp. Isolates from the Food Chain in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Notifications by product category and notifying country. European Commission. (2018) <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList/> Acesso 02 Novembro 2019.



- Rehman, M. A., Yin, X., Persaud-Lachhman, M. G., Diarra, M. S. (2017). First detection of a 731 fosfomycin resistance gene, *fosA7*, in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from broiler chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61:e00410–e00417.
- Rezende, C. S. M., Mesquita, A. J., Andrade, M. A., Linhares, G. F. C., Mesquita, A. Q., Minafra, C. S. (2005). Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100: 199-203.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(10), 629–640.
- Sedeik, M. E., El-shall, N. A. & Awad, A. M. et al. (2019). Isolation, conventional and molecular characterization of *Salmonella* spp. from newly hatched broiler chicks. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, 9: 136.
- Skiada, A., Markogiannakis, A., Plachouras, D. & Daikos, G. L. (2011). Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37:187–193.
- Sousa, T. J., Parise, D., Profeta, R. Parise, M. T. D., PintoGomide, A. C., Kato, R. B. (2019). Re-sequencing and optical mapping reveals misassemblies and real inversions on *Corynebacterium pseudotuberculosis* genomes. *Scientific Reports*, 9: 16387.
- Souza, I. D. P. (2015). Heidelberg é a salmonela da vez. *O presente rural - Avicultura, corte e postura*, 1(1), 28.
- Stefani, L. M., das Neves, G. B., Brisola, M. C., Crecencio, R. B., Pick, E.C., Araújo, D.N. (2018). *Salmonella* Heidelberg resistant to ceftiofur and disinfectants routinely used in poultry. *Semina: Ciências Agrárias*, 39: 1029-1036.
- Suez, J., Porwollik, S., Dagan, A., Marzel, A., Schorr, Y. I., Desai, P. T. et al.(2013). Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS ONE*, 8: e58449.
- Torpdahl, M., Sørensen, G., Lindstedt, B. A., Nielsen, E. M. (2007). Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella* Typhimurium infections. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 388-395.
- Webber, B., Borges, K. A., Furian, T. Q., Rizzo, N. N., Tondo, E. C., Santos, R. S. et al. (2019). Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 61:e36.
- World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine. (2011).

Yoo, A. Y., Yu, J. E., Yoo, H., Lee, T. H., Lee, W. H., Oh, J., et al. (2013). Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430: 131-136.

## Apêndices

**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 <sup>1</sup>
2H	2016	Alimento	MG	CF <sup>2</sup>
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 <sup>3</sup>
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 <sup>1</sup>CFR = carcaça de frango resfriada; <sup>2</sup>CF = carcaça de frango; <sup>3</sup>CMS = carne mecanicamente  
1023 separada.

1024

1025

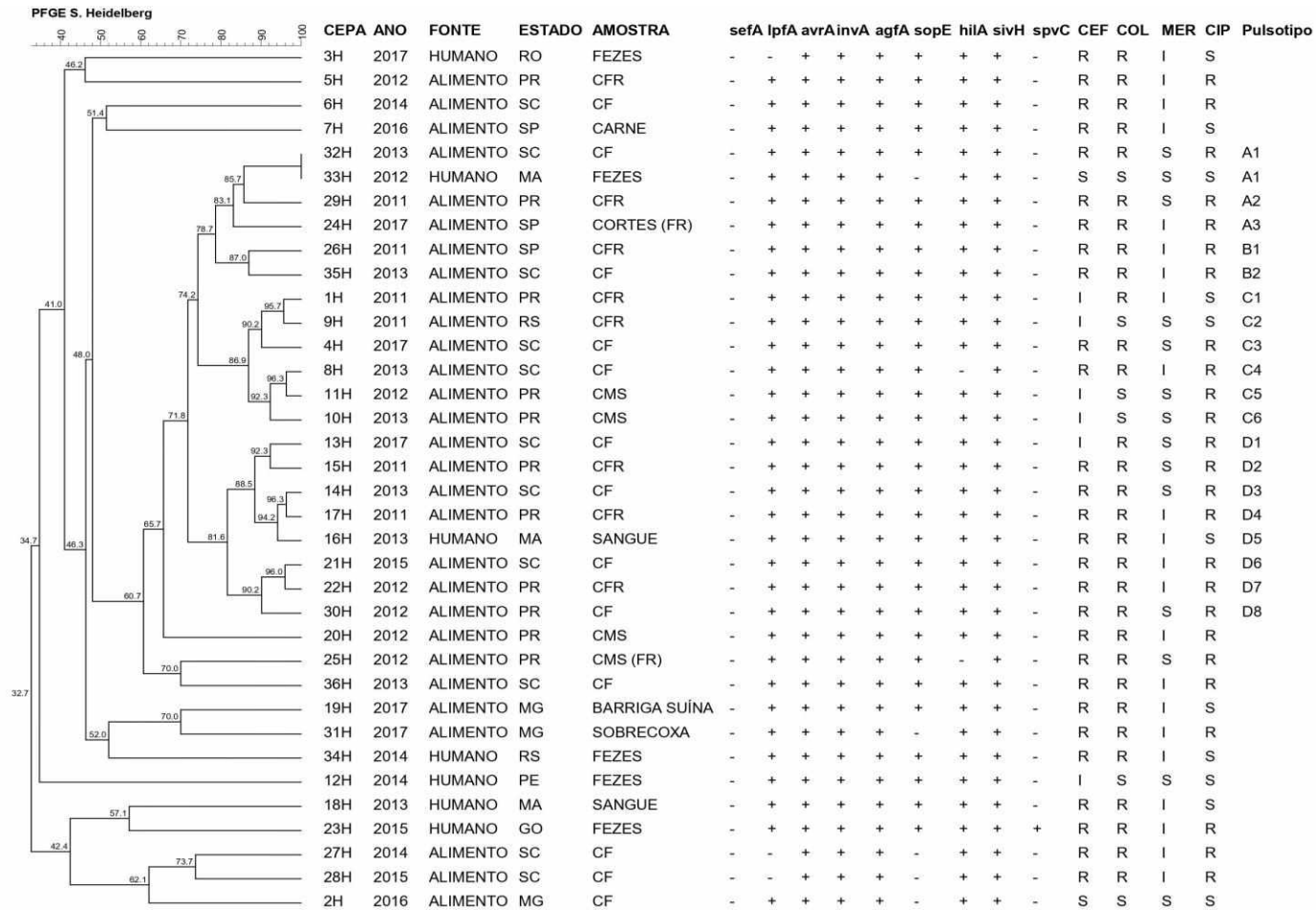
1026

1027

1028

1029

Fig. A.1



Dendrograma

método de Dice/UPGMA (tolerância de 0,5%, otimização de 0,5%, similaridade &gt; 80%)

análise pelo

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

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

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

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **Journal of Veterinary Medicine. B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, n. 8-9, p. 380-388, 2004.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00775.x>

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

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2016**.

Disponível em:

[http://abpabr.com.br/storage/files/versao\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2\\_016\\_portugues\\_web1.pdf](http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2_016_portugues_web1.pdf). Acesso em: 16/11/2019.

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Exportações de Carne de Frango Alcançam 4,1 Milhões de Toneladas em 2018**. Disponível em:

<http://abpa-br.com.br/noticia/exportacoes-de-carne-de-frangoalcancam-41-milhoes-de-toneladas-em-2018-2656>. Acesso em: 16/11/2019.

ADLEY, C. C.; RYAN, M. P. “The nature and extent of foodborne disease,” In: BARROS-VEL’AZQUEZ, J. **Antimicrobial Food Packaging**. San Diego: Academic Press; 2016, p. 1–10.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00001-2>

AHRENFELDT, J. et al. Bacterial whole genome-based phylogeny: construction of a new benchmarking dataset and assessment of some existing methods.

**BMC Genomics**, v. 18, n. 19, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3407-6>

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

ARAVENA, C. et al. Caracterización de cepas clínicas y ambientales de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg aisladas en Chile.

**Revista Médica de Chile**, v. 147, p. 24-33, 2019.

<https://doi.org/10.4067/S0034-98872019000100024>

ATIKUR, R. et al. Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity Pattern of *Salmonella* spp from Locally Isolated Egg Samples. **American Journal of Pure and Applied Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2019.

<https://doi.org/10.34104/ajpab.019.019111>

BAPTISTA, D. Q. et al. Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frangos vivos e carcaças no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1278-1285, 2018.

<https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5289>

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

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

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **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 da União, Brasília, DF, Brasil, 2009.

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

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



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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 2012a. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm). Acesso em: 18/12/2019.

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

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

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

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

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

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

CARSON, C. et al. Ceftiofur-resistant *Salmonella* enterica serovar Heidelberg of poultry origin – a risk profile using the Codex framework. **Epidemiology and 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)

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

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

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

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

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

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

CHAMPION, O. L., et al. Comparative phylogenomics of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 44, p. 16043-16048, 2005.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0503252102>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EUCAST – EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **EUCAST Reading guide for broth microdilution. Version 1.0**. EUCAST, 2019. Disponível em: <[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2019\\_manuals/Reading\\_guide\\_BMD\\_v\\_1.0\\_2019.pdf](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: 19/10/2019.

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

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

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

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

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

- GAY, K. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 297–304, 2006. <https://doi.org/10.1086/505397>
- GIERALTOWSKI, L., et al. National Outbreak of Multidrug Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to a Single Poultry Company. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, e0162369, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162369>
- GILCHRIST, C. A., et al. Whole-genome sequencing in outbreak analysis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, p. 541–563, 2015. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-13>
- GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866-875, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.023>
- GOGOI, P., et al. Efficacy of pulsedfield gel electrophoresis and repetitive element sequence-based pcr in typing of *Salmonella* isolates from Assam, **Indian Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, e02043-e0204317, 2018. <https://doi.org/10.1128/JCM.02043-17>
- GOUVEIA, M. A. D. C.; LINS, M. T. C.; SILVA, G. A. P. Acute diarrhea with blood: diagnosis and drug treatment. **Jornal de Pediatria** (Rio J), 2019.
- GUPTA, R. et al. Carriage of Class 1 integrons and molecular characterization of intl1 gene in multiridrug-resistant *Salmonella* spp. isolates from broilers. **Veterinary World**, v. 12, n. 4, p. 609-613, 2019. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.609-613>
- GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella* (9th ed.): Institut Pasteur, Paris. 2007.
- HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X1997000200003>
- HU, L., KOPECKO, D. J. Typhoid *Salmonella*. In: MILLOTIS, M. D.; BIER, J.W. (Ed.). **International handbook of foodborne pathogens**. New York: Marcel Dekker, Inc; p. 151–165, 2003. <https://doi.org/10.1201/9780203912065.ch10>
- IBRAHIM, G. M. and MORIN, P.M. *Salmonella* Serotyping Using Whole Genome Sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2993, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02993>
- JAJERE, S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- VAN ASTEN, A. J. A. M.; KONINKX, J. F. J. G.; VAN DIJK, J. E. *Salmonella* entry: M cells versus absorptive enterocytes. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 149-152, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.001>
- VAN BAMBEKE, et al. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 4, p. 256-80, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01131.x>
- VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Journal of Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015. <https://doi.org/10.3382/ps/peu081>
- WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Genotyping of *Campylobacter* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2000. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.1-9.2000>
- WEBBER, B., et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, e36, 2019. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961036>
- WHITE, D. G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T. C. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). **NMC Annual Meeting Proceedings**, Florida, p. 56-60, 2006.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**. WHO, 2011. 3<sup>rd</sup> rev. Geneva, Switzerland.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella**. WHO, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 21/10/2019.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella**. 2020. Disponível em:<[https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodbornediseases/salmonella/en/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodbornediseases/salmonella/en/)>. Acesso em: 02/02/2020.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Typhoid vaccines: WHO position paper. **WHO The Weekly Epidemiological Record**, v. 13, n. 93, p. 153–72, 2018.
- WHO/FAO/OIE - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **1st Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance**: Scientific Assessment, Geneva, December 2003.
- YOO, A. Y., et al. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, p. 131-136, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.025>
- YORK, A. Lysozyme protects bacteria from  $\beta$ -lactams. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 183, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.26>

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

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**

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

### *Current Microbiology* Instructions for Authors

#### Aims & Scope

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

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

#### **Manuscript Submission – General**

Submission of a manuscript implies:

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

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

#### Online Submission

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

#### Compliance with Ethical Standards

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

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

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

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

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

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

## Manuscript Submission – Guidelines

### • Title Page

The title page should include:

- A concise and informative title
- The name(s) of the author(s) must be formatted as ‘full first name, middle initial, full last name’.
- The affiliation(s) and full institutional address(es) and where possible the ORCID of the author(s)  
We strongly recommend the use of standard individual identifiers, especially ORCID <https://orcid.org/>  
Please visit the ORCID site where you can create an ORCID profile, or link your existing profile to this account. For more information about this journal’s ORCID policy, please visit the ORCID FAQ: [www.springernature.com/orcid](http://www.springernature.com/orcid)
- The institutional e-mail address and telephone number of the corresponding author
- Abstract  
Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.
- Keywords  
Please provide a list of (X) keywords

### • Types of papers

**Current Microbiology** welcomes the following article categories:  
research articles, new taxa, (mini)-reviews, commentaries & letters to the editor.

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

Structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Compliance with Ethical Standards, Authors’ Contributions and References

#### **New Taxa:**

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

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

Structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Authors’ Contributions, Compliance with Ethical Standards, and References

### (mini)-Reviews:

The length of a Review Article will depend on the topic covered but should not exceed 8,000 words (excluding references) or 5,000 words in case of a mini-Review. The maximum number of references is 100.

Structure: Abstract, Introduction, The body of the review should be organized into sub-sections headed by informative sub-titles, Conclusion, Acknowledgements, Authors' Contributions and References.

**Letters to the Editor:** Letters to the Editor are brief communications focusing on an article that has been published in the journal within the previous six months. They should focus on some aspect(s) of the paper that is, in the author's opinion, incorrectly stated or interpreted, controversial, misleading or in some other way worthy of comment. All Letters to the Editor must address a scientific issue in an objective fashion, should have fewer than 1,000 words (main body text), and will be externally refereed.

### • **Materials and Methods**

The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in two publicly accessible culture collections located in two different countries. The collections must be listed in the WDCM (see the below Link for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable).

The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), **a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section.**

Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the Link below).

For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the Link below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below Link) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable.

For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers.

For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

- WDCM culture collections <http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/>
- NCBI Bio Project <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>
- HUPO proteomics standard initiative <http://www.psidev.info/?q=node/91>

### *Genome Sequencing Data*

Authors are requested to provide full genome sequencing data along with their description of a new taxon. If it's not possible to obtain sequence data please give a short explanation on the reasons in your cover letter. Submissions without genome sequencing data will be evaluated on a case-by-case basis.

- *Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

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

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

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

## Headings

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

## Abbreviations

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

## Scientific style

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

## References

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

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
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*  
884 341:325–329

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://www.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.

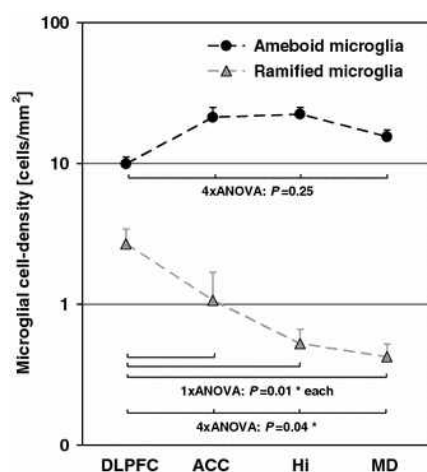
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## Artwork and Illustrations Guidelines

### Electronic Figure Submission

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

### Line Art



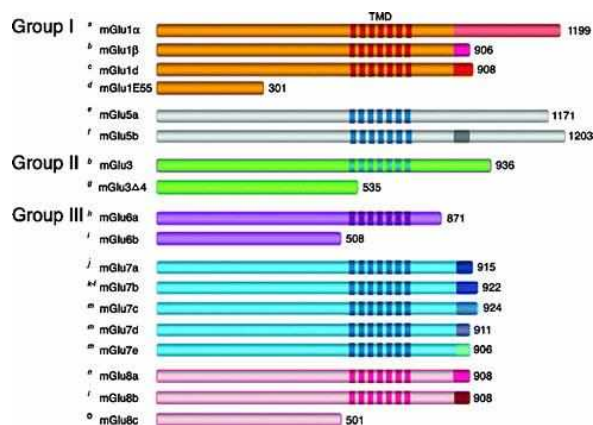
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.**
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should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

### Halftone Art



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

### Combination Art



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

### Color Art

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

### Figure Lettering

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

### Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.

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

#### Figure Captions

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

#### Figure Placement and Size

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

#### Permissions

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

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that:

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

#### **Acknowledgments and Funding Information**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full. In addition, please provide the funding information in a separate step of the submission process in the peer review system. Funder names should preferably be selected from the standardized list you will see during submission. If the 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

- 1022 • Supply all supplementary material in standard file formats.
- 1023 • Please include in each file the following information: article title, journal name,  
 1024 author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- 1025 • To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may  
 1026 require very long download times and that some users may experience other problems  
 1027 during downloading.

1028

#### 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.

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

**Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.**

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure that the author group, the Corresponding Author and the order of authors is all correct at the point of submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail.  
Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

\*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
  - an erratum/correction may be placed with the article
  - an expression of concern may be placed with the article
  - 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.

## Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

## English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is proficient in English to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial, which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.

Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

### [English language tutorial](#)

### [Nature Research Editing Service](#)

### [American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

## 2 Normas do periódico Food Control - Capítulo 3

### Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



### Before You Begin

### Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose

any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### **Preprints**

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

## **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

## **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

## **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

## **Elsevier supports responsible sharing**

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

## **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of

the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

## **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

## ***Elsevier Researcher Academy***

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

## ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

## **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

## ***Referees***

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



## **Preparation**

## **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert

reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

### ***Use of word processing software***

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

**Request you to kindly submit your manuscript with continuous line numbers.**

## **Article structure**

### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### ***Materials and Methods***

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

## **Key Resources Table**

To enable reproducibility of the research, we encourage authors to submit a Key Resources Table, which helps make the resources clear to readers. The Key Resources Table highlights the genetically modified organisms and strains, 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
- 1462 • **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval  
 1463 systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
  - 1464 • **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and  
 1465 family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled.  
 1466 You can add your name between parentheses in your own script behind the  
 1467 English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the  
 1468 actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-  
 1469 case superscript letter immediately after the author's name and in front of the  
 1470 appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including  
 1471 the country name and, if available, the e-mail address of each author.
  - 1472 • **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at  
 1473 all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility  
 1474 includes answering any future queries about Methodology and  
 1475 Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details**  
 1476 **are kept up to date by the corresponding author.**
  - 1477 • **Present/permanent address.** If an author has moved since the work  
 1478 described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address'  
 1479 (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name.  
 1480 The address at which the author actually did the work must be retained as the



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***

## **Electronic artwork**

### **General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### **Formats**

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

## **Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### **Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### **References**

#### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### ***Reference management software***

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. *Heliyon*, 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*

*data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions.*

Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

### ***Journal abbreviations source***

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please 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](#).

### **Data statement**

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



### **After Acceptance**

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



### **Author Inquiries**



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