UNIVERSITY OF SÃO PAULO
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Food Science Graduate Program

**Genome-wide characterization of *Salmonella enterica* serovars circulating
in the Brazilian animal food production chain**

DANIEL FARIAS MARINHO DO MONTE

Corrected proof of PhD thesis according to CoPGr 6018

A thesis submitted to the Graduate Program of
Food Science at University of Sao Paulo (USP)
in partial fulfillment of the requirements for the
degree of Doctor of Food Sciences.

Advisor: Prof.^a Dra. Mariza Landgraf

Co-Advisor: Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo

2019

ABSTRACT

Monte D. F. M. **Genome-wide characterization of *Salmonella enterica* serovars circulating in the Brazilian animal food production chain.** 2019. 147p. Thesis (PhD in Food Science), University of São Paulo, São Paulo. Advisor: Prof.^a Dra. Mariza Landgraf.

Salmonella enterica remains one of the most important global foodborne pathogens identified in foods, food-producing animals, environmental sources and humans. Recently, an increase in antibiotic-resistant *S. enterica* has caused global concern as treatment options become limited. As a result, the World Health Organization has deemed antibiotic-resistant *S. enterica* a high-priority bacterium. Thus, there is a need to monitor the rise and occurrence of *S. enterica* serotypes, and to strengthen surveillance of all serotypes that are a pathogenic threat and may carry relevant antimicrobial resistance and virulence genes. Additionally, the high diversity of *S. enterica* genome makes the efforts more difficult for developing mitigation strategies to aid in the reduction of this pathogen. Considering these aspects, the aim of this PhD study was to investigate the distribution of *S. enterica* serovars isolated from different sources over a 16-year period. Furthermore, to examine the current resistome and virulome of these strains, since these aspects constantly change and adapt to new surroundings. Finally, investigate the relatedness between these strains through phylogenomics, and the implication of persistent strains and their impacts on one health.

In **Monte I**, we addressed a review of the current insights regarding *S. enterica* in food and foodstuffs highlighting the most important aspects of high priority antibiotic-resistant *S. enterica*.

In **Monte II**, we investigated two hundred and sixty-four *S. enterica* isolates recovered over a 16-year period from the poultry and swine production chains, in Brazil, by whole-genome sequencing (WGS). Most international lineages belonging to 29 serovars, including, *S. enterica* serovars *S. Schwarzengrund* sequence type (ST) 96, *S. Typhimurium* ST19, *S. Minnesota* ST548, *S. Infantis* ST32, *S. Heidelberg* ST15, *S. Newport* ST45, *S. Brandenburg* ST65 and *S. Kentucky* ST198 displayed multi-drug resistant (MDR) and virulent genetic backgrounds. In this regard, resistome analysis revealed presence of *qnrE1*, *qnrB19*, *qnrS1*, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CMY-2} genes, as well as *gyrA* mutations; whereas ColpVC, IncHI2A, IncHI2, IncFIA, IncI1, IncA/C2, IncR, IncX1 and pO111 plasmids were detected. In addition, phylogenetic analysis revealed multiple independent lineages such as *S. enterica* serovars *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Minnesota*, *S. Kentucky* and *S. Brandenburg*. In brief, occurrence and persistence of international lineages of *S. enterica* serovars in the food production chain is supported by conserved genomes and wide virulome and resistome.

In **Monte III**, we subsequently reported an important observation from the epidemiological point of view of the early emergence of *qnrE1* gene in *S. Typhimurium*. We provide in this study, new insights into the *qnrE1* genetic environment and suggest that the emergence of *qnrE1* is much earlier than previously thought. It is likely that unless a continuous surveillance is established, we will continue to underestimate the prevalence of these and other antimicrobial resistance (AMR) genes at the environmental-animal-human interface.

In **Monte IV**, we addressed an investigation using WGS analysis and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) genotyping that was able to reveal rare antibiotic-resistant *S. enterica* serovars isolated from the food production chain. Technologically, our results illustrate how this WGS-CRISPR combined approach constitutes a useful means to decipher the phylogenetic relationships between and provide high-resolution

genotyping of *Salmonella* strains. These results also confirm the potential of CRISPR-based approaches to typifying various *Salmonella* strains, including infrequent serotypes.

Finally, in **Monte V**, we aimed to study the rising *S. Heidelberg* serotype, an emerging multi-drug resistant (MDR) serotype in Brazilian food chain. A total of 81 (100%) *S. Heidelberg* strains were pheno- and genotypically resistant, whereas 91.3% were multidrug resistant. Presence of antimicrobial resistance genes and plasmids demonstrated little variation across the strains. The broad distribution and abundance of *S. Heidelberg* in the farms, slaughterhouse, transport, lairage and retail market suggests high adaptability of this serovar in the poultry production chain in Brazil. In summary, our findings underscore the potential role of *S. Heidelberg* as key pathogen in the Brazilian poultry production chain.

Overall, our results demonstrate the emergence of new resistance mechanisms and a high distribution of MDR *S. enterica* serovars isolated in different years from distinct hosts and regions in Brazil, which likely contribute to the dissemination of resistant foodborne pathogens to humans in the food chain. These results highlight the importance of food-producing animals serving as an important reservoir of genes, which confer resistance to the most important antibiotics for human and veterinary medicine. Multiple resistance, and in particular resistance to drugs of last resort are cause for public health concern. In Brazil, we have reported a broad host range of pathogens of great importance to Brazilian agribusiness particularly, since Brazil is the second largest chicken meat producing country globally and the largest exporter of this product with a high domestic consumption. Further, these results suggest the wide dissemination of MDR isolates/serotypes showing high genomic identity regionally which suggests that plasmid promiscuity contributes to the endemic spread. Therefore, continued surveillance of *S. enterica* in the food chain needs to be established as a national priority with characterization at the genome level if Brazil wishes to prevent the further spread and emergence of new serotypes or resistance attributes.

Keywords: Antimicrobial resistance, CRISPR genotyping, phylogeny, *Salmonella enterica*, virulence.

RESUMO

Monte D. F. M. **Caracterização genômica ampla de sorotipos de *Salmonella enterica* em circulação na cadeia produtiva de alimentos de origem animal do Brasil.** 2019. 147p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo. Orientadora: Prof.^a Dra. Mariza Landgraf.

Salmonella enterica continua sendo um dos mais importantes agentes patogênicos de origem alimentar sendo identificada em alimentos, animais de produção, fontes ambientais e seres humanos. Recentemente, um aumento na *S. enterica* resistente a antibióticos causou preocupação global, uma vez que as opções de tratamento se tornaram limitadas. Como resultado, a Organização Mundial de Saúde considerou a *S. enterica* resistente a antibióticos uma bactéria de alta prioridade. Assim, existe a necessidade de monitorar a ascensão e a ocorrência de sorotipos de *S. enterica* e fortalecer a vigilância de todos os sorotipos que são uma ameaça patogênica e que podem abrigar genes de resistência antimicrobiana e virulência relevantes. Além disso, a alta diversidade do genoma de *S. enterica* dificulta o desenvolvimento de estratégias de mitigação para auxiliar na redução desse patógeno. Considerando esses aspectos, o objetivo deste estudo de doutorado foi investigar a distribuição de sorovares de *S. enterica* isolados de diferentes fontes no período de 16 anos. Além disso, examinar o atual resistoma e viruloma dessas linhagens, uma vez que esses aspectos mudam constantemente e se adaptam a novos ambientes. Finalmente, investigar a relação entre essas linhagens através de filogenômica e a implicação de linhagens persistentes e seus impactos em *One health*.

Em **Monte I**, abordamos os principais *insights* sobre *S. enterica* em alimentos destacando os aspectos mais importantes sobre *S. enterica* resistente a antibióticos em uma revisão.

Em **Monte II**, foram investigados duzentos e sessenta e quatro isolados de *S. enterica* recuperados em um período de 16 anos das cadeias produtivas de aves e suínos, no Brasil, por sequenciamento do genoma completo. A maioria das linhagens internacionais pertenceram a 29 sorovares, incluindo *S. enterica* sorovares *S. Schwarzengrund* ST96, *S. Typhimurium* ST19, *S. Minnesota* ST548, *S. Infantis* ST32, *S. Heidelberg* ST15, *S. Newport* ST45, *S. Brandenburg* ST65 e *S. Kentucky* ST198 foram multirresistentes de origens genéticas virulentas. A este respeito, a análise do resistoma revelou a presença dos genes *qnrE1*, *qnrB19*, *qnrS1*, *bla_{CTX-M-8}*, *bla_{CTX-M-2}* e *bla_{CMY-2}*, bem como mutações *gyrA*; enquanto os plasmídeos ColpVC, IncHI2A, IncHI2, IncFIA, IncI, IncA / C2, IncR, IncX1 e pO111 foram detectados. Além disso, a análise filogenética revelou múltiplas linhagens independentes, como sorovares *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Minnesota*, *S. Kentucky* e *S. Brandenburg*. Em suma, a ocorrência e persistência de linhagens internacionais de sorovares de *S. enterica* na cadeia produtiva de alimentos é apoiada por genomas conservados com amplo viruloma e resistoma.

Em **Monte III**, subsequentemente fizemos uma importante observação sob o ponto de vista epidemiológico do surgimento precoce do gene *qnrE1* em *S. Typhimurium*. Nós fornecemos neste estudo, novos *insights* sobre o ambiente genético do *qnrE1* e sugerimos que o surgimento desse gene pode ter sido muito mais cedo do que se pensava anteriormente. É provável que, a menos que a vigilância contínua seja estabelecida, continuaremos a subestimar a prevalência desses e de outros genes de resistência na interface ambiental-animal-humano.

Em **Monte IV**, abordamos uma investigação utilizando sequenciamento do genoma completo (WGS) e genotipagem por repetições palindrômicas curtas regularmente intercaladas em cluster (CRISPR) que revelou sorovares raros resistentes a antibióticos isolados da cadeia produtiva. Tecnologicamente, os nossos resultados ilustram como esta abordagem combinada WGS-CRISPR constitui um meio útil para decifrar as relações filogenéticas e fornecer genotipagem de alta resolução de cepas de *Salmonella*. Esses resultados também confirmam o potencial de

abordagens baseadas em CRISPR para genotipagem de cepas de *Salmonella*, incluindo sorotipos pouco frequentes.

Finalmente, em **Monte V**, nosso objetivo foi estudar o crescente sorotipo *S. Heidelberg*, um sorotipo multirresistente emergente na cadeia produtiva de frangos. Um total de 81 (100%) isolados de *S. Heidelberg* foram feno-genotipicamente resistentes, enquanto 91,3% foram resistentes a múltiplas drogas. Presença de genes de resistência antimicrobiana e plasmídeos demonstraram pouca variação entre as cepas. A ampla distribuição e abundância de *S. Heidelberg* nas fazendas, frigoríficos, transportes e comércio sugere alta adaptabilidade deste sorovar na cadeia de produção avícola no Brasil. Em resumo, nossos resultados ressaltam o papel potencial de *S. Heidelberg* como principal patógeno na cadeia de produção avícola brasileira.

De maneira geral, nossos resultados demonstraram o surgimento de novos mecanismos de resistência e alta distribuição de sorovares de *S. enterica* multirresistentes isolados em diferentes anos de diferentes hospedeiros e regiões do Brasil, o que provavelmente contribui para a disseminação de patógenos resistentes de alimentos para o homem na cadeia alimentar. Estes resultados destacam a importância de animais de produção que potencialmente atuam como importantes reservatórios de genes, que conferem resistência aos antibióticos mais importantes para a medicina humana e veterinária. A resistência múltipla e, em particular, a resistência às drogas de última alternativa são motivo de preocupação para a saúde pública. No Brasil, temos relatado uma ampla gama de patógenos de grande importância para o agronegócio brasileiro, em particular, já que o Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango e o maior exportador deste produto com alto consumo doméstico. Além disso, esses resultados sugerem a ampla disseminação de isolados/sorovares multirresistentes, mostrando alta identidade genômica regionalmente, o que sugere que a promiscuidade do plasmídeo contribui para a disseminação endêmica. Portanto, a vigilância contínua de *S. enterica* na cadeia alimentar precisa ser estabelecida como uma prioridade no país, com a caracterização concomitante ao nível do genoma, se o Brasil desejar evitar a disseminação e emergência de novos sorotipos ou atributos de resistência.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana, CRISPR, filogenia, *Salmonella enterica*, virulência.