

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular de linhagens de *Salmonella* Typhimurium
isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente no Brasil**

Fernanda de Almeida

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular de linhagens de *Salmonella* Typhimurium
isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente no Brasil**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Fernanda de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Almeida, F.

Caracterização molecular de linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente no Brasil.

103 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Falcão, Juliana Pfrimer.

1. *Salmonella* Typhimurium
2. Genes de virulência
3. Resistência a antimicrobianos
4. PFGE
5. ERIC-PCR
6. MLVA
7. CRISPR-MVLST
8. MLST
9. Sequenciamento do genoma completo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda de Almeida

Caracterização molecular de linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente no Brasil

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a meus pais Oswaldo e Lucinéia por todo o apoio e incentivo em mais essa etapa.

Agradecimentos

À Deus que não me deixou desistir dos meus sonhos e me deu forças para conseguir chegar até o fim.

À minha orientadora Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão, pela oportunidade de realização deste trabalho, pelos ensinamentos, pelo apoio e empenho e por toda a confiança em mim depositada.

Aos amigos de laboratório Amanda, Carolina, Fabio, Miliane, Priscilla e Roberto pela disposição em ajudar, pelo ambiente de trabalho harmonioso, pelas inúmeras sugestões e discussões científicas e pelos agradáveis momentos de descontração. É uma honra fazer parte desse grupo!

À minha família por todo o apoio e amor incondicional!

Ao Gustavo Pamplona Fieno por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e pela paciência.

Ao Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, em especial à Marta Inês Cazentini Medeiros pelas linhagens cedidas utilizadas neste trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz, em especial à Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues pelas linhagens cedidas utilizadas neste trabalho.

À Embrapa Suínos e Aves, em especial à Dra. Jalusa Deon Kich pelas linhagens cedidas utilizadas neste trabalho.

À Jaqueline Passaglia pelo apoio técnico no decorrer desse trabalho.

À Vânia Cláudia de Albuquerque pelo auxílio administrativo, pela correção do resumo em espanhol e também pela amizade ao longo desse trabalho.

À Adriana Aparecida Marques, funcionária da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelos sequenciamentos realizados.

Ao Dr. Marc Allard por ter me recebido em seu laboratório nos Estados Unidos e por toda a ajuda com o sequenciamento do genoma completo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, juntamente com os funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP, do programa Biociências Aplicadas à Farmácia.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro deste projeto (Proc. 2012/191321-1).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e também da bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

E à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

RESUMO

ALMEIDA, F. **Caracterização molecular de linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente no Brasil.** 2016. 103f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Salmonella spp. é reconhecida como uma das bactérias que mais causam doenças de origem alimentar no mundo. Dentre as diversas sorovariedades de *Salmonella*, a Typhimurium é uma das sorovariedades de maior ocorrência no mundo. Várias metodologias de tipagem fenotípicas e genotípicas foram desenvolvidas com o intuito de se delinear a epidemiologia e diversidade genotípica de *Salmonella* Typhimurium. Entretanto, a tipagem fenotípica é muitas vezes limitada por sua baixa capacidade de diferenciação de subtipos pertencentes a uma mesma sorovariedade de *Salmonella*, um problema minimizado pelos métodos genotípicos. No Brasil, foram realizados poucos estudos que genotiparam linhagens de *S. Typhimurium*. Os objetivos deste estudo foram caracterizar linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente do animal no Brasil quanto ao seu potencial patogênico, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade genotípica. Foram estudadas 119 linhagens de *S. Typhimurium*, isoladas de material clínico de humanos (43), alimentos diversos (49), material clínico de suínos (22) e do ambiente de suínos (5), entre 1983 e 2013, provenientes de várias Estados do Brasil. A presença de 12 genes de virulência foi pesquisada por PCR. O perfil de resistência a 13 antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão. A tipagem molecular foi realizada por *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis* (MLVA), *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - Multi-virulence locus sequence typing* (CRISPR-MVLST), *Multilocus sequence typing* (MLST) e sequenciamento do genoma completo para 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos (43) e alimentos (46). As metodologias PFGE, ERIC-PCR e MLVA foram realizadas para 70 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos (43), animais (22) e ambiente do animal (5). Todas as 119 linhagens apresentaram os genes *sipA*, *flgK*, *flgL* e *invA*. O gene *sipD* e o gene *sopE2* foram encontrados em 118 (99,2%) linhagens. O gene *fljB* foi encontrado em 117 (98,3%) linhagens. O gene *sopD* foi presente em 114 (95,8%) linhagens, o gene *sopB* em 111 (93,3%) linhagens, o gene *ssaR* em 102 (85,7%) linhagens, o gene *sifA* em 86 (72,3%) linhagens e 45 (37,8%) linhagens apresentaram o gene plasmidial *spvB*. De um total de 119 linhagens, 64 (62,2%) linhagens foram resistentes a pelo menos um dos 13 antimicrobianos testados, sendo que 36 (30,3%) linhagens foram multi-droga resistentes (MDR). Na comparação dos isolados de humanos e alimentos, as linhagens isoladas de humanos antes de meados 1990, ficaram alocadas nos grupos PFGE-A, PFGE-B1, PFGE-B2, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A, MLVA-B1, MLVA-B2 e G1, G2, H para CRISPR-MVLST. As linhagens isoladas de humanos após esse período ficaram alocadas nos grupos PFGE-B1, ERIC-A, MLVA-B1, MLVA-B2 e G2. As linhagens isoladas de alimentos ficaram alocadas nos grupos PFGE-A, PFGE-B1, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A, MLVA-B1, MLVA-B2, G1 e G2. Por MLST, do total de 92 linhagens isoladas de humanos e alimentos, 77 linhagens foram tipadas como ST19. Pelo sequenciamento do genoma completo, as linhagens isoladas de alimentos e humanos ficaram alocadas no grupos I e J independente das datas de isolamento. Na comparação dos isolados de humanos e animais, as linhagens das duas origens ficaram alocadas nos grupos PFGE-D1, PFGE-D2, ERIC-C1, MLVA-C1 e MLVA-D.

Conclui-se que a grande prevalência de genes de virulência nas linhagens de *S. Typhimurium* estudadas reforça o potencial das mesmas causarem doenças em humanos, bem como, os riscos de sua presença em alimentos, animais para consumo humano e ambiente. A ocorrência de *S. Typhimurium* multi-droga resistentes isoladas de alimentos diversos e de suínos para consumo é um alerta para o possível risco de humanos ingerirem alimentos contaminados por tais linhagens. Em conjunto os resultados de PFGE, ERIC-PCR, MLVA, CRISPR-MVLST sugerem que as linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos eram geneticamente mais diversificadas antes de meados de 1990, o que pode sugerir a seleção de um subtipo de *S. Typhimurium* mais adaptado, depois que *Salmonella* Enteritidis tornou-se a sorovariedade de maior ocorrência no Brasil após esse período. Com relação às linhagens isoladas de alimentos, os resultados de PFGE, ERIC-PCR, MLVA e CRISPR-MVLST sugerem que durante o período estudado houve a circulação de mais de um subtipo no país. Os resultados de MLST sugerem que tais linhagens tenham uma origem filogenética comum. Os resultados do sequenciamento do genoma completo sugerem que houve a circulação de mais de um subtipo de *S. Typhimurium* no país, com relação às linhagens de humanos e alimentos. Também alerta para o possível risco de linhagens MDR isoladas de alimentos contaminarem humanos e/ou disseminarem genes de resistência a antibióticos para linhagens de origem clínica e não clínica. Na comparação dos isolados de humanos e animais, os resultados de PFGE, ERIC-PCR e MLVA sugerem que algumas linhagens isoladas de suínos e humanos podem descender de um subtipo comum. Ademais, as linhagens MDR isoladas de suínos e do ambiente de suínos alertam para o possível risco de porcos usados para consumo contaminarem humanos, o ambiente e outros porcos.

Palavras-chave: *Salmonella* Typhimurium; genes de virulência; resistência a antimicrobianos; PFGE; ERIC-PCR; MLVA; CRISPR-MVLST; MLST; sequenciamento do genoma completo.

ABSTRACT

ALMEIDA, F. **Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from humans, food, animals and environment in Brazil.** 2016. 103f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Salmonella spp. is recognized as one of the most involved bacteria that cause food-borne diseases in the world. Among the various serovars of *Salmonella*, Typhimurium is one of the most frequent serovars worldwide. Several phenotypic and genotypic typing methods have been developed in order to delineate the epidemiology and genotypic diversity of *Salmonella* Typhimurium. However, phenotypic typing is often limited by its low capacity to differentiate subtypes belonging to the same serovar of *Salmonella*, a problem minimized by genotypic methods. In Brazil, few studies have been conducted that genotyped *S. Typhimurium* strains. The aims of this study were to characterize *S. Typhimurium* strains isolated from humans, food, animals and animal's environment in Brazil regarding its pathogenic potential, antimicrobial resistance and genotypic diversity. We studied 119 *S. Typhimurium* strains isolated from human clinical material (43), different foods (49), clinical material from pigs (22) and pigs environment (5), between 1983 and 2013 from various States of Brazil. The presence of 12 virulence genes was investigated by PCR. The resistance profile against 13 antimicrobial was performed by the disk diffusion method. Molecular typing was performed by *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis* (MLVA), *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - Multi-virulence locus sequence typing* (CRISPR-MVLST), *Multilocus sequence typing* (MLST) and whole genome sequencing for 92 *S. Typhimurium* strains isolated from humans (43) and food (46). PFGE, ERIC-PCR and MLVA methods were performed for 70 *S. Typhimurium* strains isolated from humans (43), animals (22) and the animal's environment (5). All 119 strains showed the *sipA*, *flgK*, *flgL* and *invA* genes. The *sipD* and *sopE2* genes were found in 118 (99.2%) strains. The *fljB* gene was found in 117 (98.3%) strains. The *sopD* gene was present in 114 (95.8%) strains, the gene *sopB* in 111 (93.3%) strains, the *ssaR* gene in 102 (85.7%) strains, the gene *sifA* in 86 (72.3%) strains and 45 (37.8%) strains showed the plasmid gene *spvB*. From a total of 119 strains, 64 (62.2%) strains were resistant to at least one of the 13 antimicrobials tested, and 36 (30.3%) strains were multi-drug resistant (MDR). In the comparison of isolates from humans and food, the strains isolated from humans before mid-1990s were allocated in PFGE-A, PFGE-B1, PFGE-B2, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A, MLVA-B1, MLVA-B2 and G1, G2, H for CRISPR-MVLST. The strains isolated from humans after this period were allocated in PFGE-B1, ERIC-A, MLVA-B1, MLVA-B2 and G2 clusters. The strains isolated from food were allocated in PFGE-A, PFGE-B1, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A, MLVA-B1, MLVA-B2, G1 and G2 clusters. By MLST, of the total of 92 strains isolated from humans and food, 77 strains were typed as ST19. By whole genome sequencing, the strains isolated from food and humans were allocated in I and J clusters independently of its isolation date. In the comparison of isolates from humans and animals, strains of the two origins were allocated in PFGE-D1, PFGE-D2, ERIC-C1, MLVA-C1 and MLVA-D clusters. In conclusion, the high frequency of virulence genes in the *S. Typhimurium* strains studied reinforces their potential hazard to cause disease in humans, as well as the risk of its presence in food, animals for human consumption and the environment. The occurrence of *S. Typhimurium* multi-drug

resistant isolated from various food and pigs for consumption is an alert of the possible risk for humans to ingest contaminated food with those strains. Together the results of PFGE, ERIC-PCR, MLVA e CRISPR-MVLST suggest that *S. Typhimurium* strains isolated from humans were genetically more diverse before mid-1990s, which might indicate the selection of a more adapted *S. Typhimurium* subtype after *Salmonella* Enteritidis became the most prevalent serovar in Brazil. Regarding the strains isolated from food, the results of PFGE, ERIC-PCR, MLVA and CRISPR-MVLST suggest that during the studied period there was circulation of more than one subtype in the country. The MLST results suggest that these strains have a common phylogenetic origin. The results of the whole genome sequencing suggest that there may be more than one subtype circulating in the country, with respect to the strains of human and food origins. Also, alerts for the possible risk of MDR strains isolated from food to contaminate humans and/or disseminate antibiotic resistance genes for strains of clinical and non-clinical origin. In the comparison of isolates from humans and animals, the results of PFGE, ERIC-PCR and MLVA suggest that some strains isolated from pigs and humans may descend from a common subtype. In addition, the MDR strains isolated from pigs and pig environment warn for the possible risk of pigs used for human consumption to contaminate humans, the environment and other pigs.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium; virulence genes; antimicrobial resistance; PFGE; ERIC-PCR; MLVA; CRISPR-MVLST; MLST; whole genome sequencing.

RESUMEN

ALMEIDA, F. **Caracterización molecular de cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de humanos, alimentos, animales y del ambiente en Brasil.** 2016. 103f. Tesis (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Salmonella spp. es conocida como una de las bacterias causadoras de enfermedades de origen alimentar en el mundo. Entre las diversas serovariedades de *Salmonella*, la Typhimurium es una de las más comunes. Varias metodologías de tipificación fenotípica y genotípica fueron desarrolladas con el objetivo de delinear la epidemiología y la diversidad genotípica de *Salmonella* Typhimurium. Entretanto, la tipificación fenotípica es casi siempre limitada debido a su baja capacidad de diferenciación de subtipos pertenecientes a una misma serovariedad de *Salmonella*, problema este ya minimizado por los métodos genotípicos. En Brasil, pocos estudios de genotificación de cepas de *S. Typhimurium* han sido realizados. El objetivo de ese estudio fue caracterizar cepas de *S. Typhimurium* aisladas de humanos, alimentos, animales y del ambiente en Brasil cuanto a su potencial patogénico, perfil de resistencia a antimicrobianos y diversidad genotípica. Se estudió 119 cepas de *S. Typhimurium*, aisladas de material clínico de humanos (43), alimentos diversos (49), material clínico de cerdos (22) y del ambiente de los cerdos (5), entre los años 1983 y 2013, provenientes de varios estados de Brasil. La presencia de 12 genes de virulencia fue pesquisada por PCR. El perfil de resistencia a 13 antimicrobianos fue realizado por el método de disco difusión. La tipificación molecular fue realizada por *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis* (MLVA), *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - Multi-virulence locus sequence typing* (CRISPR-MVLST), *Multilocus sequence typing* (MLST) y la secuenciación del genoma completo para 92 cepas de *S. Typhimurium* aisladas de humanos (43) y de alimentos (46). Las metodologías PFGE, ERIC-PCR y MLVA fueron realizadas para 70 cepas de *S. Typhimurium* aisladas de humanos (43), animales (22) y del ambiente del animal (5). Todas las 119 cepas presentaron los genes *sipA*, *flgK*, *flgL* e *invA*. El gene *sipD* y el gene *sopE2* fueron encontrados en 118 (99,2%) cepas. El gene *fljB* fue encontrado en 117 (98,3%) cepas. El gene *sopD* estuvo presente en 114 (95,8%) cepas, el gene *sopB* en 111 (93,3%) cepas, el gene *ssaR* en 102 (85,7%) cepas, el gene *sifA* en 86 (72,3%) cepas y 45 (37,8%) cepas presentaron el gene plasmidial *spvB*. De un total de 119 cepas, 64 (62,2%) fueron resistentes a por lo menos uno de los 13 antimicrobianos probados, siendo que 36 (30,3%) cepas fueron multidroga resistentes (MDR). Comparando los aislados de humanos y alimentos, las cepas aisladas de humanos anteriores al año 1990 se quedaron alocadas en los grupos PFGE-A, PFGE-B1, PFGE-B2, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A, MLVA-B1, MLVA-B2 y G1, G2, H para CRISPR-MVLST. Las cepas aisladas de humanos pos ese período se quedaron alocadas en los grupos PFGE-B1, ERIC-A, MLVA-B1, MLVA-B2 y G2. Las cepas aisladas de alimentos se quedaron alocadas en los grupos PFGE-A, PFGE-B1, ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A, MLVA-B1, MLVA-B2, G1 y G2. Por MLST, de las 92 cepas aisladas de humanos y alimentos, 77 fueron tipificadas como ST19. Por la secuenciación del genoma completo, las cepas aisladas de alimentos y humanos se quedaron alocadas en los grupos I y J independiente de la fecha de aislamiento. Las cepas aisladas de humanos y de animales se quedaron alocadas en los grupos PFGE-D1, PFGE-D2, ERIC-C1, MLVA-C1 y MLVA-D. Se concluyó que la grande prevalencia de los genes de virulencia en las cepas de *S.*

Typhimurium estudiadas refuerza la potencialidad de las mismas causaren enfermedades en humanos, así como, los riesgos de su presencia en alimentos, animales para consumo humano y en el ambiente. La ocurrencia de *S. Typhimurium* multidroga resistente aislado de alimentos diversos y de cerdos para el consumo es un alerta para el probable riesgo que los humanos ingieran alimentos contaminados por tales cepas. Aún, los resultados de PFGE, ERIC-PCR, MLVA, CRISPR-MVLST sugieren que las cepas de *S. Typhimurium* aisladas de humanos fueron genéticamente más diversificadas antes del 1990, lo que puede sugerir la selección de un subtipo de *S. Typhimurium* mas adaptado, después que *S. Enteritidis* se convirtió en la serovariedad más común en Brasil después de ese período. Con relación a las cepas aisladas de alimentos, los resultados de PFGE, ERIC-PCR, MLVA y CRISPR-MVLST sugieren que, durante el período estudiado hubo la circulación de más de un subtipo en el país. Los resultados de MLST sugieren que tales cepas tengan un origen filogenético común. Los resultados de la secuenciación del genoma completo sugieren la posibilidad de haber más de un subtipo circulante en el país, con relación a las cepas de humanos y de alimentos. También alerta para el probable riesgo de las cepas MDR aisladas de alimentos contaminaren humanos y/o diseminaren genes de resistencia a antibióticos para las cepas de origen clínico y no clínico. En las cepas aisladas de humanos y animales, los resultados de PFGE, ERIC-PCR y MLVA sugieren que algunos aislados de cerdos y de humanos pueden descender de un subtipo común. Además, las cepas MDR aisladas del ambiente de cerdos alertan para el probable riesgo de cerdos usados para el consumo contaminaren los humanos, el ambiente y otros cerdos.

Palabras-llave: *Salmonella* Typhimurium; genes de virulencia; resistencia a antimicrobianos; PFGE; ERIC-PCR; MLVA; CRISPR-MVLST; MLST; secuenciación del genoma completo.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Gel de agarose 1% representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de *Salmonella* Typhimurium estudadas digeridas com a enzima *Xba*I. M: marcador de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker - New England). Canaletas de 1 a 10, linhagens representativas de *Salmonella* Typhimurium estudadas: STm01 (1), STm02 (2), STm03 (3), STm04 (4), STm05 (5), STm06 (6), STm07 (7), STm08 (8), STm09 (9), STm10 (10), STm11 (11), STm12 (12) 48
- Figura 2** – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por PFGE para 92 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43) e alimentos (49) 50
- Figura 3** – Gel representativo dos produtos de amplificação das sequências ERIC seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaletas de 1 a 16, linhagens representativas de *Salmonella* Typhimurium estudadas: STm18 (1), STm19 (2), STm20 (3), STm21 (4), STm22 (5), STm23 (6), STm24 (7), STm25 (8), STm26 (9), STm27 (10), STm28 (11), STm29 (12), STm30 (13), STm31 (14), STm32 (15), STm33 (16), STm34 (17) 51
- Figura 4** – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por ERIC-PCR para 92 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43) e alimentos (49) 53
- Figura 5** – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA de 92 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43) e alimentos (49) 55
- Figura 6** – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por PFGE para 70 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43), de suínos (22) e ambiente do suíno (5) 57
- Figura 7** – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por ERIC-PCR para 70 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43), de suínos (22) e ambiente do suíno (5) 59
- Figura 8** – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA de 70 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43), suínos (22) e ambiente do suíno (5) 61
- Figura 9** – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir da análise dos espaçadores de CRISPR 1 e 2 de 92 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43) e alimentos (49). Em preto, representa a presença dos espaçadores em cada linhagem nos CRISPR 1 e 2 64

Figura 10 – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir da análise dos espaçadores de CRISPR 1 e 2 e das sequências dos genes *fimH* e *sseL* de 92 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43) e alimentos (49) 65

Figura 11 – Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com os dados de 89 linhagens de *S. Typhimurium* estudadas e 1240 linhagens de *S. Typhimurium* disponíveis no banco de dados. Em rosa, ST encontrado nas linhagens de *S. Typhimurium* estudadas e disponíveis no banco de dados; azul, STs centrais de complexos clonais; amarelo, são subgrupos centrais; preto, demais linhagens de *S. Typhimurium*. O tamanho das esferas é proporcional à quantidade de linhagens 67

Figura 12 – Árvore filogenética baseada na análise dos SNPs encontrados nos genomas das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos (43) e alimentos (49) correlacionado com a resistência a antimicrobianos. AMG: aminoglicosídeo; BETA: beta-lactâmico; FLU: fluoroquinolona; PHE: fenicol; SUL: sulfonamida; TET: tetraciclina; TRI: trimetoprima; MLS: macrolídeo 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de sorovarietades presentes em cada espécie e subespécie do gênero <i>Salmonella</i>	3
Tabela 2 – Fonte, origem, Estado e ano de isolamento das 119 linhagens de <i>Salmonella</i> Typhimurium estudadas, listadas em ordem cronológica e pelo Instituto de Pesquisa de que são provenientes.....	23
Tabela 3 – Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa dos genes de virulência por PCR.....	28
Tabela 4 – Sequência, tamanho do <i>amplicon</i> e referência dos <i>primers</i> usados na pesquisa de genes de virulência.....	29
Tabela 5 – Descrição dos reagentes utilizados na técnica de ERIC-PCR	33
Tabela 6 – <i>Primers</i> utilizados para metodologia de MLVA específicos para <i>S. Typhimurium</i>	34
Tabela 7 – Descrição dos reagentes utilizados na PCR de MLVA	35
Tabela 8 – <i>Primers</i> utilizados na amplificação e sequenciamento dos genes <i>fimH</i> e <i>sseL</i>	36
Tabela 9 – Descrição dos reagentes utilizados para amplificação dos genes <i>fimH</i> e <i>sseL</i>	37
Tabela 10 – Frequência dos genes de virulência <i>sipA</i> , <i>flgK</i> , <i>flgL</i> , <i>invA</i> , <i>sipD</i> , <i>sopE2</i> , <i>fljB</i> , <i>sopD</i> , <i>sopB</i> , <i>ssaR</i> , <i>sifA</i> , e <i>spvB</i> em 119 linhagens de <i>Salmonella</i> Typhimurium isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente do animal no Brasil.....	45
Tabela 11 – Número de linhagens resistentes a cada antimicrobiano testado.....	46
Tabela 12 – Perfil de resistência das 119 linhagens de <i>S. Typhimurium</i> isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente do animal	47
Tabela 13 – STs e alelos encontrados para as 92 linhagens de <i>S. Typhimurium</i> estudadas por MLST	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
<i>aroC</i>	Do inglês, <i>Chorismate synthase</i>
BHI	Do inglês, <i>Brain Heart Infusion</i>
C	Citosina
CDC	Do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHEF	Do inglês, <i>Countor-clamped homogeneous electric field</i>
CLSI	Do inglês, <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CRISPR	Do inglês, <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
D	Índice de discriminação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>dnaN</i>	Do inglês, <i>DNA polymerase III beta subunit</i>
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPM	Escola Paulista de Medicina
ERIC	Do inglês, <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
Fig.	Figura
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Guanina

hemD	Do inglês, <i>Uroporphyrinogen III cosynthase</i>
hisD	Do inglês, <i>Histidinol dehydrogenase</i>
IAL/RP	Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto
IRU	Do inglês, <i>Intergenic Repeat Units</i>
MILi	Motilidade-indol-lisina
MLVA	Do inglês, <i>Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis</i>
MLST	Do inglês, <i>Multilocus Sequence Typing</i>
MVLST	Do inglês, <i>Multi-virulence locus sequence typing</i>
PCR	Do inglês, <i>Polimerase chain reaction</i>
PFGE	Do inglês, <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
purE	Do inglês, <i>Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para
spp.	Espécies
ST	Do inglês, <i>Sequence Type</i>
sucA	Do inglês, <i>Alpha ketoglutarate dehydrogenase</i>
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
thrA	Do inglês, <i>Aspartokinase + homoserine dehydrogenase</i>
Tris	Hidroximetilaminometano
TSI	Do inglês, <i>Triple Sugar Iron</i>
UPGMA	Do inglês, <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
Σ	Somatório
λ	Comprimento de onda
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma (s)
μL	Microlitro (s)
g	Gravidade
HCl	Ácido clorídrico
H₂S	Sulfeto de hidrogênio
Kb	Quilobase (s)
KV	Quilovolt (s)
Mb	Megabase
mg	Miligrama (s)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
ng	Nanograma (s)
nm	Nanômetro (s)
pb	Pares de base
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
U	Unidade (s)
UV	Ultra-violeta
V	Volt (s)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
RESUMEN	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Gênero <i>Salmonella</i>	2
1.2 <i>Salmonella</i> não tifoide	4
1.3 Manifestações Clínicas e Patogênese	5
1.3.1 Gastroenterite.....	5
1.3.2 Febre Entérica.....	6
1.4 <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovariedade Typhimurium	7
1.5 Genes de virulência	8
1.6 Resistência a antimicrobianos	9
1.7 Métodos genotípicos de tipagem bacteriana.....	10
1.7.1 <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> – PFGE	11
1.7.2 <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i> PCR – ERIC-PCR.....	12
1.7.3 <i>Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis</i> - MLVA.....	13
1.7.4 <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> – CRISPR.....	14
1.7.5 <i>Multilocus sequence typing</i> – MLST.....	15
1.7.6 Sequenciamento do genoma completo	15
2 RELEVÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20

4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Linhagens bacterianas.....	22
4.2 Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens	26
4.3 Extração e verificação da pureza do DNA genômico.....	26
4.4 Genes de virulência por PCR.....	27
4.5 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	30
4.6 PFGE	30
4.6.1 Preparação dos <i>plugs</i> de agarose	30
4.6.2 Lise celular e lavagem dos <i>plugs</i> de agarose.....	31
4.6.3 Digestão dos <i>plugs</i>	31
4.6.4 Corrida eletroforética.....	31
4.6.5 Análise do perfil de bandas gerado com os dados de PFGE	32
4.6.6 Construção dos dendrogramas de similaridade genotípica gerado com os dados de PFGE	32
4.7 ERIC-PCR	33
4.7.1 Condições da PCR.....	33
4.7.2 Análise do perfil de bandas gerado com os dados de ERIC-PCR.....	33
4.7.3 Construção do dendrograma de similaridade genética gerado com os dados de ERIC-PCR	34
4.8 MLVA	34
4.8.1 Amplificação e eletroforese capilar.....	34
4.8.2 Análise dos dados gerados a partir da eletroforese capilar.....	35
4.8.3 Construção dos dendrogramas de similaridade genotípica gerado com os dados de MLVA	35
4.9 CRISPR-MVLST	36
4.9.1 Amplificação e sequenciamento dos genes de virulência <i>fimH</i> e <i>sseL</i>	36
4.9.2 Análise das sequências obtidas.....	37
4.9.3 Análise dos <i>loci</i> CRISPR.....	37
4.9.4 Construção do dendrograma de similaridade genotípica gerado com os dados de CRISPR-MVLST	38
4.10 MLST	38
4.10.1 Construção dos diagramas de similaridade genética com os dados de MLST.....	38
4.11 Cálculo dos índices de discriminação.....	38
4.12 Sequenciamento do genoma completo	39
4.12.1 Diluição do DNA.....	39
4.12.2 Fragmentação do DNA.....	40

4.12.3 Amplificação	40
4.12.4 Purificação da PCR.....	40
4.12.5 Normalização da biblioteca	41
4.12.6 Mistura da biblioteca	41
4.12.7 Análise dos dados gerados pelo sequenciamento	42
4.12.8 Análise <i>in silico</i> de genes de resistência.....	42
5 RESULTADOS	44
5.1 Reconfirmação da pureza	44
5.2 Extração e verificação da pureza do DNA genômico.....	44
5.3 Genes de virulência	44
5.4 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	45
5.5 PFGE – Humanos e alimentos.....	48
5.6 ERIC-PCR – Humanos e alimentos	51
5.7 MLVA – Humanos e alimentos.....	54
5.8 PFGE – Humanos, animais e ambiente do animal	56
5.9 ERIC-PCR – Humanos, animais e ambiente do animal	58
5.10 MLVA – Humanos, suínos e ambiente do suíno.....	60
5.11 CRISPR-MVLST – Humanos e alimentos.....	62
5.11.1 Análise dos genes <i>fimH</i> e <i>sseL</i>	62
5.11.2 Análise dos espaçadores de CRISPR	62
5.11.3 Dendrogramas gerados com os dados de CRISPR-MVLST	62
5.12 MLST – Humanos e alimentos.....	66
5.13 Sequenciamento do genoma completo – Humanos e alimentos	67
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES.....	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é reconhecida como uma das bactérias que mais causam doenças de origem alimentar no mundo (Majowicz *et al.*, 2010). Na Europa, a *Salmonella* foi reportada como o principal agente causador de surtos de origem alimentar e o segundo agente bacteriano em casos esporádicos, segundo dados do *European Food Safety Authority* (EFSA) em 2013 (EFSA, 2015). Nos Estados Unidos, a *Salmonella* foi o agente bacteriano mais comum em surtos de origem alimentar e também em casos esporádicos, segundo o *Centers and Disease Control and Prevention* (CDC) em 2014 (CDC, 2015a). No Brasil, a *Salmonella* foi reportada como o principal patógeno responsável por surtos de origem alimentar entre 2000 e 2015, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde (SVS, 2015).

O gênero foi proposto por Lignieres em 1900, em homenagem ao bacteriologista americano Daniel Elmer Salmon, que foi o primeiro a isolar *Salmonella choleraesuis* de intestino de porco em 1884. O micro-organismo foi originalmente chamado de “*Bacillus choleraesuis*” que subsequentemente foi alterado para *Salmonella choleraesuis* (Su e Chiu, 2007). *Salmonella* spp. são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, oxidase negativa, intracelulares facultativos, não formadores de esporos e termófilos, crescendo em temperatura ótima de 37°C (Nataro *et al.*, 2007).

A nomenclatura e a taxonomia de *Salmonella* já sofreram diversas alterações. O Centro de Referência e Pesquisa em *Salmonella* localizado no Instituto Pasteur, Paris, França, da Organização Mundial da Saúde é responsável pela atualização da taxonomia desse gênero. Atualmente, considera-se que o gênero é composto por duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta última por sua vez, é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica* (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014).

A classificação sorológica, que divide as salmonelas em sorotipos ou sorovariedades, é baseada na identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), este último quando presente, sendo esse esquema de identificação denominado de esquema de

Kaufmann & White. Atualmente existem 2.659 sorovariedades, entre as quais 1.586 pertencem a *S. enterica* subespécie *enterica* (Tabela 1) (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014).

Os antígenos O são designados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*. O antígeno Vi tem apenas um único tipo sorológico e é encontrado apenas nas sorovariedades *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin* (Campos, 2005). Já os antígenos flagelares (H) podem ocorrer em duas fases, denominadas 1 e 2. Os antígenos de fase 1 são designados por letras minúsculas do alfabeto, e os antígenos de fase 2 são designados por números arábicos. Como o número de antígenos flagelares de fase 1 é maior que o número de letras do alfabeto, a letra z é utilizada com expoentes numéricos, tais como z₁, z₂, z₃, etc (Campos, 2005).

Algumas salmonelas não possuem flagelo e, portanto são imóveis, e outras possuem flagelo de uma só fase, denominadas monofásicas. A maioria possui flagelos de fase 1 e de fase 2, denominadas bifásicas. A mudança de uma fase para outra é explicada pelo funcionamento dos seus genes H1 e H2, responsáveis pela síntese dos flagelos de fase 1 e de fase 2, respectivamente. Estudos genéticos demonstraram que o gene H2 pode estar ou não funcional, dependendo da posição do seu promotor. Quando o H2 está funcionando, ele forma não só o flagelo, mas também uma proteína repressora de H1. Quando não funcionando, o H1 forma livremente seu flagelo (Campos, 2005).

As sorovariedades mais frequentemente isoladas não são designadas corriqueiramente pelas fórmulas antigênicas e sim por nomes que podem indicar: o local onde foram primeiramente isoladas como *S. Panama* e *S. London*; seu hospedeiro como *S. Infantis*; a síndrome que causam como *S. Typhi* e *S. Enteritidis* entre outras. As sorovariedades são escritas com a primeira letra maiúscula e não em itálico (Tindall *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Número de sorovariedades presentes em cada espécie e subespécie do gênero *Salmonella*

<i>S. enterica</i>	Número de sorovariedades
subesp. <i>enterica</i>	1586
subesp. <i>salamae</i>	522
subesp. <i>arizonae</i>	102
subesp. <i>diarizonae</i>	338
subesp. <i>houtenae</i>	76
subesp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
Total	2659

Fonte: Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014

1.2 *Salmonella* não tifoide

As doenças de origem alimentar tem um grande impacto na economia e na saúde pública em todo o mundo. Estima-se que ocorram cerca de 93,8 milhões de casos anualmente de gastroenterite devido a *Salmonella* não tifoide e 155 mil mortes por ano no mundo todo (Majowicz *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos, a *Salmonella* é o principal agente bacteriano causador de surtos e casos esporádicos de doenças de origem alimentar (Scallan *et al.*, 2011; CDC, 2015a). É responsável por causar cerca de um milhão de doenças, o que resulta em mais de 19 mil hospitalizações e em mais de 450 mortes por ano, segundo dados do CDC (2015b).

Na Europa, a *Salmonella* é o segundo agente bacteriano causador de gastroenterite em humanos seguido de *Campylobacter* sp, entretanto é o principal agente etiológico causador de surtos de origem alimentar (EFSA, 2015). Em 2013, cerca de 82 mil casos de salmonelose foram confirmados na União Europeia, segundo dados do EFSA (2015).

No Brasil, a *Salmonella* foi identificada como o principal agente etiológico causador de surtos de doenças transmitidas por alimento, no período de 2000 a 2015 (SVS, 2015). Do total de surtos de doenças transmitidas por alimento ocorridos no Brasil, 58,5% não tiveram o agente etiológico identificado. Entretanto, sabe-se que *Salmonella* spp. foi responsável por 14,4% dos surtos de doenças transmitidas por alimento no país, segundo dados da SVS, do Ministério da Saúde. Porém, acredita-se que esse número possa ser ainda maior, pois não se sabe ao certo os verdadeiros números associados à infecção por *Salmonella* spp. no Brasil, devido a falhas no sistema de vigilância epidemiológica e também do sistema de saúde (SVS, 2015).

A salmonelose é um sério problema de saúde pública no Brasil, sobretudo, devido à qualidade precária de saneamento básico nas regiões mais pobres do país e falta de noções sobre higiene pessoal e manuseio adequado de alimentos por parte de uma parcela da população brasileira, por isso a dificuldade de se controlar a disseminação dessa bactéria (Hofer e Dos Reis, 1994; Taunay *et al.*, 1996).

A salmonelose é uma doença de grande importância e apresenta-se como um desafio para a saúde pública, em razão da elevada endemicidade, alta morbidade e, acima de tudo, pela dificuldade do seu controle (CDC, 2015b).

1.3 Manifestações Clínicas e Patogênese

No homem, as manifestações clínicas mais comuns causadas pelas salmonelas são a gastroenterite e a febre entérica (Campos, 2005). A gastroenterite é causada pelas sorovariedades *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Agona*, entre outras, também chamadas de *Salmonella* não tifoides. Já a febre entérica é causada pelas sorovariedades *S. Typhi* e *S. Paratyphi A, B ou C*, denominadas de *Salmonella* tifoides (Campos, 2005).

1.3.1 Gastroenterite

A infecção por *Salmonella* inicia-se com a ingestão de água ou alimentos contaminados. A bactéria é capaz de resistir ao suco gástrico no estômago, chegando ao intestino. A *Salmonella* adere-se a superfície apical do epitélio intestinal e injeta proteínas efetoras por meio do sistema de secreção do tipo III (T3SS) codificado pela ilha de patogenicidade de *Salmonella* 1 (SPI-1) no citosol de enterócitos e de células M. Algumas proteínas efetoras alteram a via de sinalização da célula hospedeira que promove a alteração no citoesqueleto com consequente endocitose da *Salmonella*. A bactéria então endocitada passa a residir no endossoma da célula, multiplicando-se exacerbadamente, e este evento acontece em células M e enterócitos (Santos *et al.*, 2003; Fàbrega e Vila, 2013).

Em adição ao rearranjo do citoesqueleto, algumas proteínas efetoras da bactéria desencadeiam uma resposta que aumenta a expressão de fatores quimiostáticos. Em resposta ao estímulo quimiostático, há uma infiltração de neutrófilos na lâmina própria. Uma hora após a infecção, a *Salmonella* atinge a porção basal da camada epitelial e sofre fagocitose por neutrófilos e macrófagos, podendo ocorrer morte de macrófagos, o que pode aumentar a reação inflamatória. Em contraste, os neutrófilos não sofrem morte celular devido à infecção por *Salmonella*. Como a reação inflamatória progride, os neutrófilos migram através da camada epitelial, resultando no acúmulo de células inflamatórias e fluido rico em proteínas no lúmen intestinal. A reação inflamatória exacerbada resulta em uma maciça migração transepitelial de neutrófilos, que causa distanciamento das células epiteliais a partir da membrana basal, favorecendo a secreção de fluido no interior do lúmen intestinal e diarreia inflamatória e autolimitada (Santos *et al.*, 2003; Fàbrega e Vila, 2013).

Devido à liberação de proteases e outros mediadores a partir de células inflamatórias, uma necrose extensa da mucosa superficial acontece entre 24 e 48 horas após a infecção. Os detritos resultantes da necrose fornecem um substrato adequado para o crescimento bacteriano

facilitando a dispersão e contaminação ambiental (Santos *et al.*, 2003; Campos, 2005; Fàbrega e Vila, 2013).

A gastroenterite clinicamente caracteriza-se por diarreia aguda geralmente acompanhada de náuseas, dor de cabeça, cólicas abdominais e, às vezes, febre e vômito. O período de incubação varia de 12 a 72 horas. Esse quadro sintomatológico dura usualmente menos de 10 dias. Após o término da gastroenterite, a bactéria ainda é encontrada nas fezes durante quatro a cinco semanas. Raramente o tratamento antimicrobiano é aconselhado, pois o uso de antibióticos desequilibra a microbiota intestinal e favorece a colonização pela *Salmonella*, prolongando o período de excreção da bactéria. Normalmente as salmonelas não-tifóides limitam-se ao intestino, mas em alguns casos podem ocorrer infecção sistêmica. A terapia antimicrobiana só é indicada para pacientes com a doença muito severa ou sinais positivos de doença invasiva (Santos *et al.*, 2003; Fàbrega e Vila, 2013).

1.3.2 Febre Entérica

A febre entérica pode ser ocasionada pelas sorovariedades *Salmonella* Typhi, que causa a chamada febre tifoide e pela *Salmonella* Paratyphi A, B, C, que causa a chamada febre paratifoide, sendo o homem seu único reservatório. Sua ocorrência está diretamente relacionada às condições de saneamento básico existentes e aos hábitos individuais (Campos, 2005).

A febre tifoide é uma infecção sistêmica, sua transmissão também ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados. No caso da febre tifoide praticamente não ocorre inflamação no intestino. A *Salmonella* Typhi atravessa e invade o epitélio intestinal. A bactéria invasora é internalizada ou é fagocitada por macrófagos. As proteínas produzidas por SPI-1 induzem a morte dos macrófagos infectados através da via dependente de caspase-1 resultando na liberação de IL-1. A liberação de citocinas pró-inflamatórias induz o recrutamento de monócitos do sangue e outras células inflamatórias até o sítio de infecção. A bactéria dissemina-se através do corpo, por meio de células CD18⁺ que foram recrutadas no sítio de infecção. A *S. Typhi* dissemina-se através do sangue, esta bacteremia primária é assintomática e as hemoculturas geralmente são negativas. As bactérias se replicam dentro de órgãos do sistema reticuloendotelial, fígado, baço, medula óssea. A replicação bacteriana provavelmente ocorre dentro das células de linhagens monocíticas. A bactéria então retorna à corrente sanguínea. Esta bacteremia secundária marca o início dos sintomas clínicos. Durante

a fase sintomática da doença *S. Typhi* pode ser cultivada a partir do sangue. No entanto, o número de bactérias por mL de sangue é baixo (<1 UFC). Alguns pacientes recuperam-se da doença enquanto outros desenvolvem uma doença grave ou uma infecção crônica assintomática, na qual a bactéria persiste na vesícula biliar, tornando este paciente um portador assintomático (Campos, 2005).

A febre tifoide tem um longo período de incubação, de cinco a nove dias e um longo período de sintomas com febre que persiste por aproximadamente três semanas (Raffatellu *et al.*, 2008).

A sintomatologia clínica clássica consiste em febre alta, cefaleia, mal-estar geral, dor abdominal, falta de apetite, bradicardia relativa (dissociação pulso-temperatura), esplenomegalia, manchas rosadas no tronco, constipação intestinal ou diarreia e tosse seca. Atualmente, o quadro clínico completo é de observação rara, sendo mais frequente um quadro em que a febre é a manifestação mais expressiva, acompanhada por alguns dos demais sinais e sintomas citados, segundo o CDC (2015c).

1.4 *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovariedade Typhimurium

Das mais de 2500 sorovariedades de *Salmonella enterica*, a *S. Typhimurium* é uma das sorovariedades de maior ocorrência no mundo. Entre os anos 2001 e 2007, nos Estados Unidos, Canadá, Austrália e Nova Zelândia, a *S. Typhimurium* foi a sorovariedade mais isolada. Nesse mesmo período, a *S. Typhimurium* foi a segunda sorovariedade mais isolada na África, Ásia, Europa, América Latina, incluindo o Brasil, precedida apenas pela *S. Enteritidis* (Hendriksen *et al.*, 2011).

No Estado de São Paulo, *S. Typhimurium* foi a terceira sorovariedade mais isolada de fontes humanas e não humanas, no período de 1991 a 1995 (Tavechio *et al.*, 1996). Nos anos de 1996 a 2000, a *S. Typhimurium* apresentou um declínio no isolamento a partir de fontes não humanas (Tavechio *et al.*, 2002). Entretanto, no período de 1996 a 2003, foi a segunda sorovariedade mais isolada de fontes humanas atrás apenas de *S. Enteritidis* (Fernandes *et al.*, 2006).

A *S. Typhimurium* pode colonizar diferentes animais, como gado, cabras, ovelhas, porcos, frango e pode representar um importante fator de risco para a infecção humana pela manipulação ou consumo de carne contaminada (Best *et al.*, 2007; Kich *et al.*, 2011). A infecção por *S. Typhimurium* em aves (frango) e porcos pode ser um grande problema na

detecção do patógeno uma vez que normalmente não há sintomas clínicos nos animais, podendo assim ocorrer a transmissão da bactéria aos seres humanos (Best *et al.*, 2007).

Devido a grande importância da sorovariedade *S. Typhimurium* no Brasil e no mundo várias metodologias de tipagem fenotípicas e genotípicas foram desenvolvidas com o intuito de se delinear a epidemiologia das infecções causadas por esse patógeno.

1.5 Genes de virulência

A *Salmonella* possui várias estratégias de virulência para escapar da resposta imune do hospedeiro. A presença de genes de virulência é indicativa do potencial patogênico das linhagens. A maioria dos genes que codificam importantes fatores de virulência estão localizados em regiões conservadas chamadas de Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPIs), e outros são encontrados em plasmídeos e também no cromossomo (Fàbrega e Vila, 2013). A ilha de patogenicidade tipicamente acomoda grandes *clusters* de genes que contribuem para um fenótipo de virulência particular e estão localizados dentro do cromossomo de *Salmonella* (Marcus *et al.*, 2000).

Vinte e uma ilhas de patogenicidade diferentes já foram descritas no gênero *Salmonella*, entretanto muitos genes identificados nessas ilhas ainda não tem seu papel claro na patogênese de *Salmonella* (Blondel *et al.*, 2009). Especificamente, um total de cinco SPIs (SPI-1 a SPI-5) foram identificadas como diretamente envolvidas na virulência de *S. Typhimurium* juntamente com outros componentes de virulência como o plasmídeo pLST que carrega o *operon spv* (Fàbrega e Vila, 2013).

A SPI-1 codifica várias proteínas efetoras que tem um papel de invasão no epitélio das células hospedeiras através do rearranjo do citoesqueleto e consequentemente internalização da bactéria. Essas proteínas efetoras são injetadas na célula hospedeira através do sistema de secreção do tipo III (T3SS) que também é codificado por genes localizados na SPI-1 (Fàbrega e Vila, 2013). Algumas proteínas importantes codificadas por genes da SPI-I incluem: proteínas efetoras (SopA-E); proteínas associadas a invasão (SipA e InvA) e proteína de montagem (SipD) (Rychlik, Gregorova e Hradecka, 2006; Hur *et al.*, 2011).

A SPI-2 contém mais de 40 genes e é dividida em dois segmentos. A porção menor contém o *operon ttrRSBCA* o qual está envolvido na redução de tetratoato e sete *open reading frames* (ORFs) com função desconhecida (Marcus *et al.*, 2000; Fàbrega e Vila, 2013). A SPI-2 codifica um sistema de secreção do tipo III estrutural e funcionalmente distinto do

T3SS da SPI-1 e proteínas como SsaR e SifA que estão associadas com a sobrevivência e replicação dentro de células hospedeiras (Hur *et al.*, 2011; Fàbrega e Vila, 2013)

As outras SPI não são ainda muito estudadas. A SPI-3 contém apenas quatro ORFs; as proteínas codificadas por genes dessa ilha de patogenicidade estão envolvidas nos estágios iniciais e persistência da infecção bem como sobrevivência durante a disseminação sistêmica. A SPI-4 contém seis ORFs dispostas em um único *operon* (*siiABCDEF*) e tem papel na interação inicial da bactéria com o epitélio intestinal e possivelmente contribui para a persistência bacteriana no hospedeiro. Finalmente, pouco é sabido sobre a SPI-5, entretanto sabe-se que está envolvida no processo patogênico durante a infecção (Fàbrega e Vila, 2013).

A produção de flagelos é importante não apenas para a motilidade e quimiotaxia, mas também é requerido para vários outros processos na patogênese. Os flagelos são codificados por genes cromossomais como *flgK*, *fljB* e *flgL* (Shah *et al.*, 2011; Fàbrega e Vila, 2013).

Entre as várias sorovariedades de *Salmonella*, poucas carregam plasmídeo de virulência sorovariedade-específico. As sorovariedades *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* usualmente são positivas para o plasmídeo de virulência sorovariedade-específico. No caso de *S. Typhimurium*, o plasmídeo de virulência tem aproximadamente 95 Kb e é denominado de pSLT. Todos eles compartilham o *operon* *spvRABCD* que pode restaurar a virulência. A região *spv* ao que parece promove a sobrevivência e o rápido crescimento no hospedeiro. O primeiro gene *spvR* codifica uma proteína reguladora. SpvB e SpvC são proteínas efetoras, o SpvB tem um papel no estágio intracelular da doença e o SpvC é importante durante a resposta pró-inflamatória do hospedeiro. SpvA é encontrado exclusivamente em membrana externa e o SpvD é exportado para fora da célula e ambas não tem um papel bem elucidado (Fàbrega e Vila, 2013).

1.6 Resistência a antimicrobianos

As infecções causadas pelas salmonelas não tifoides são normalmente autolimitadas e não necessitam de tratamento com antimicrobianos. Na maioria dos casos, o paciente se recupera sem o uso de antibióticos (Fàbrega e Vila, 2013).

Apesar da terapia com antimicrobianos ser recomendada apenas em casos de pacientes com a doença muito grave ou sinais positivos de doença invasiva, o teste de susceptibilidade a antimicrobianos pode ser utilizado a fim de se tentar obter uma correlação epidemiológica das linhagens isoladas de diferentes fontes e também como um alerta para o risco de

contaminação por linhagens multidroga resistentes (Campioni, Moratto Bergamini e Falcão, 2012; Sun *et al.*, 2014).

O aumento da resistência a antibióticos em *S. Typhimurium* tem sido relatado em linhagens isoladas de diversas fontes e de vários lugares do mundo incluindo o Brasil (Olsen *et al.*, 2004; Kich *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013; Feasey *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Tamang *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2015).

No estudo de Sun *et al.* (2014) das 294 linhagens de *S. Typhimurium*, isoladas de pacientes doentes, de 2007 a 2011, na China, 268 (91,16%) foram multi-droga resistentes (MDR). Um grande número de resistência foi encontrado para ampicilina (87,75%), ácido nalidixico (82,65%), sulfametoxazol (89,79%), trimetoprim (71,43%), tetraciclina (89,12%), gentamicina (65,31%), estreptomicina (78,57%) e cloranfenicol (74,49%).

No Brasil, Lopes e colaboradores (2015) investigaram o perfil de resistência de 225 linhagens de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* isoladas de fábricas de ração, ambiente relacionado a suínos, conteúdo intestinal de porcos e carcaça. A sorovariedade mais isolada foi *S. Typhimurium* (33,8%) e dessas 60,5% foram MDR. O perfil de resistência mais comum nas linhagens de *S. Typhimurium* foi ampicilina, ácido nalidíxico, estreptomicina, sulfonamida, tetraciclina e trimetoprima.

1.7 Métodos genotípicos de tipagem bacteriana

A biotipagem, sorotipagem, fagotipagem e susceptibilidade a antimicrobianos são alguns dos métodos fenotípicos clássicos utilizados em estudos epidemiológicos. A sorotipagem baseada na identificação de antígenos somáticos (O) e flagelares (H de fase 1 e 2) é umas das técnicas mais comumente utilizadas na caracterização de linhagens de *Salmonella* (Nataro *et al.*, 2007). Porém, os genes que codificam os antígenos somáticos e flagelares de fase 1 são extremamente variáveis e podem sofrer recombinações, o que explica o enorme número de sorovariedades de *Salmonella* (Reeves, 1993).

Esses métodos convencionais são muitas vezes limitados por problemas referentes à reprodutibilidade e à sua baixa capacidade de diferenciação de subtipos dentro de uma determinada espécie ou de subtipos pertencentes a uma mesma sorovariedade de *Salmonella* (Olive e Bean, 1999).

Muitos métodos genotípicos tem sido utilizados para a identificação, caracterização em estudos epidemiológicos e taxonômicos bacterianos. Tais estudos de investigação epidemiológica molecular possibilitam determinar qual a fonte e os veículos de transmissão, bem como, informam se os microrganismos envolvidos nos surtos representam ou não um único clone, entre outras informações (Olive e Bean, 1999).

Vários métodos moleculares têm sido utilizados na tipagem de bactérias do gênero *Salmonella*. As metodologias de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR), *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Multilocus sequence typing* (MLST), *Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis* (MLVA), caracterização das regiões *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR), CRISPR com genes de virulência, denominado de CRISPR-MVLST (*multi-virulence locus sequence typing*) e mais recentemente o sequenciamento do genoma completo, vêm sendo utilizadas com sucesso para tais finalidades (Liu *et al.*, 2011; Allard *et al.*, 2012; Campioni, Moratto Bergamini e Falcão, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Campioni *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2013; Shariat, Sandt, *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2015; Shariat *et al.*, 2015).

1.7.1 *Pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE

A técnica de *Pulsed-field gel electrophoresis* foi descrita pela primeira vez em 1984 como uma ferramenta para análise de DNA cromossômico de organismos eucariotos. Posteriormente, essa técnica foi aplicada a muitas espécies bacterianas e provou ser altamente eficiente para tipagem molecular de bactérias (Schwartz e Cantor, 1984; Arbeit *et al.*, 1990; Goering, 2010).

Essa técnica baseia-se na fragmentação do DNA bacteriano por meio de uma enzima de restrição que contenha poucos sítios de reconhecimento. Permite a separação de fragmentos de DNA maiores que 10 Kb, por usar uma eletroforese de campo pulsado, ou seja, a corrente é aplicada em diferentes ângulos pré-determinados por curtos períodos de tempo (pulsos), por grupos de eletrodos, diferente de uma eletroforese convencional ao qual a corrente é aplicada em uma única direção (Schwartz e Cantor, 1984). A partir da foto do gel de agarose, a análise dos fragmentos é feita com *softwares* especializados que comparam o perfil de bandas de cada linhagem estabelecendo a similaridade genética entre elas (Tenover *et al.*, 1995).

A técnica de PFGE é considerada uma das técnicas mais reprodutíveis e com maior poder discriminatório disponível e é o método de tipagem de escolha para muitas espécies bacterianas (Tenover *et al.*, 1995; Goering, 2010).

O PFGE é considerado “padrão-ouro” em estudos epidemiológicos e de tipagem molecular de *Salmonella* spp. de origens diversas, isoladas em diferentes locais do mundo, tendo sido utilizada com sucesso para tal finalidade (Heir *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2009; Kich *et al.*, 2011; Campioni, Moratto Bergamini e Falcão, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Ngoi *et al.*, 2013; Campioni, Zoldan e Falcão, 2014; Almeida *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 2015).

1.7.2 *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR – ERIC-PCR

Sequências repetitivas de nucleotídeos foram descritas em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, e em outras famílias bacterianas (Versalovic, Koeuth e Lupski, 1991).

Uma família de elementos repetitivos de 126 pb foram descobertas em Enterobactérias e denominadas de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC), também conhecidas como *Intergenic Repeat Units* (IRUs). Esses elementos repetitivos são altamente conservados e estão localizados em regiões intergênicas não-codificantes do genoma bacteriano, ou seja, situam-se entre genes transcritos dentro ou fora de *operons*, com sua posição variando em relação à posição das sequências de terminação e promotora de genes, fazendo com que apenas uma pequena parte destas sequências ERIC seja transcrita na forma de mRNA (Versalovic, Koeuth e Lupski, 1991).

As sequências ERIC têm sido utilizadas como base para tipagem bacteriana a partir de uma simples reação de cadeia em polimerase (PCR). A metodologia utiliza *primers* específicos para amplificar regiões entre as sequências ERIC do genoma bacteriano. A partir dessa PCR é possível fazer uma análise do perfil de bandas ou fragmentos resultantes da reação, sendo este perfil de bandas visualizados em gel de agarose a partir de uma corrida de eletroforese horizontal (Lupski e Weinstock, 1992; Wilson e Sharp, 2006).

Cada linhagem bacteriana pode apresentar um perfil de bandas diferente entre si ou até mesmo igual, isso vai depender do polimorfismo quanto ao número e posição dessas sequências. A comparação de perfis gerados para cada linhagem pode ser utilizado para determinar o grau de similaridade genética entre as linhagens. Considerando que o perfil de bandas gerado por PCR é reprodutível e que uma mesma linhagem bacteriana testada repetidas vezes, apresenta sempre o mesmo padrão, pode-se dizer que este método de tipagem

é eficiente e que o padrão de bandas obtido é específico para cada linhagem (Lupski e Weinstock, 1992).

Alguns estudos utilizaram com sucesso a técnica de ERIC-PCR para tipar molecularmente linhagens de *S. Typhimurium* e de outras sorovariedades de *Salmonella* (Ağın *et al.*, 2011; Campioni, Moratto Bergamini e Falcão, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Campioni, Zoldan e Falcão, 2014; Turki *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2015; Krawiec *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 2015).

1.7.3 *Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis - MLVA*

Com a análise de sequências de genomas tanto de procariotos quanto de eucariotos foi descoberto uma alta porcentagem de repetições no DNA, variando no tamanho, local, complexidade e maneira como ocorrem (Lindstedt, 2005).

O genoma bacteriano contém numerosos *loci* com várias sequências de nucleotídeos repetidos ou repetições em “*tandem*”, ou seja, que se repetem uma atrás da outra. As repetições denominadas de “*variable numbers of tandem repeats*” (VNTRs) são repetições em “*tandem*” encontradas tanto no DNA de procarioto quanto de eucarioto e essas repetições podem variar de uma linhagem para outra quanto ao número de unidades repetitivas (Kruy, Van Cuyck e Koeck, 2011)

Acredita-se que essa variação nas repetições ocorra por erros de pareamento da DNA polimerase que ao fazer a cópia das unidades repetitivas, acaba inserindo ou excluindo as mesmas (Van Belkum, 2007).

A metodologia MLVA determina o número de repetições em “*tandem*”, ou o número de cópias das unidades repetitivas em vários *loci* (Nadon *et al.*, 2013). Tipicamente, uma reação de PCR multiplex convencional é feita para amplificar os VNTRs. Após a amplificação, os produtos da PCR são corridos em eletroforese capilar. Para determinar o número de repetições em cada *locus* são utilizados *softwares* específicos (Nadon *et al.*, 2013).

A técnica de MLVA tem sido muito utilizada para tipar linhagens de *S. Typhimurium* e de outras sorovariedades e tem apresentado bons resultados em discriminar linhagens altamente monomórficas (Lindstedt *et al.*, 2003; Lindstedt *et al.*, 2004; Hopkins *et al.*, 2007; Larsson *et al.*, 2009; Campioni *et al.*, 2013).

1.7.4 *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – CRISPR

Frequentemente os micro-organismos desenvolvem várias estratégias para sobreviver à exposição de elementos genéticos externos. Recentemente, um “sistema imune” microbiano adaptativo denominado de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) foi descoberto. Esse sistema fornece uma imunidade adquirida à bactéria contra bacteriófagos ou plasmídeos (Sorek, Kunin e Hugenholtz, 2008; Horvath e Barrangou, 2010).

O CRISPR representa uma família de repetições de DNA encontrados em genomas bacterianos (~40%) e de archaea (~90%). O conjunto CRISPR e os genes *cas* (CRISPR-*associated*) formam o sistema CRISPR, que pode variar estruturalmente entre as espécies microbianas (Sorek, Kunin e Hugenholtz, 2008). O conjunto CRISPR é formado por sequências repetidas (*direct repeats* “DR”) contendo de 21 a 47 pb separadas por espaçadores de tamanho similar. Os espaçadores são porções de ácidos nucleicos não pertencentes à célula bacteriana, como por exemplo, DNA de fagos ou até mesmo de plasmídeos (Sorek, Kunin e Hugenholtz, 2008; Horvath e Barrangou, 2010; Sorek, Lawrence e Wiedenheft, 2013).

Uma sequência denominada de líder antecede o conjunto CRISPR. Usualmente, essa sequência é rica em adenina e tirosina. Um novo espaçador e DR sempre são adicionados ao conjunto CRISPR entre a sequência líder e a unidade adjacente, o que sugere que a sequência líder atue como um promotor, reconhecendo a sequência para a aquisição de novos espaçadores (Sorek, Kunin e Hugenholtz, 2008).

As proteínas Cas funcionam tipicamente como nucleases, helicases, polimerases e estão envolvidas na propagação e funcionalidade do CRISPR. Elas foram classificadas em oito subtipos (Touchon e Rocha, 2010). Em *Salmonella*, o sistema CRISPR é composto por oito genes *cas* do tipo I-E (Shariat *et al.*, 2015).

Especificamente, o gênero *Salmonella* possui dois *loci* CRISPR, CRISPR1 e CRISPR2 separados por ~16 Kb. O polimorfismo de CRISPR em *Salmonella* resulta mais da deleção ou duplicação de unidades de espaçadores-DR do que da aquisição de novos espaçadores (Shariat *et al.*, 2015). O sistema CRISPR tem sido muito utilizado para subtipar linhagens de *Salmonella* (Liu *et al.*, 2011; Shariat, Dimarzio, *et al.*, 2013; Shariat, Kirchner, *et al.*, 2013; Shariat, Sandt, *et al.*, 2013; Bachmann *et al.*, 2014; Shariat *et al.*, 2015).

Um modelo de análise proposto por Liu e colaboradores (2011) vem sendo muito utilizado na caracterização molecular de sorovariedades de *Salmonella*. O modelo agrega aos dois *loci* CRISPR de *Salmonella*, dois genes de virulência, *sseL* e *fimH*. O gene *sseL* tem as

funções de induzir a inflamação e a morte de macrófagos e possui 954 pb. O gene *fimH* apresenta a função de reconhecer a célula-hospedeira e possui 1.008 pb. Esse método ficou conhecido como CRISPR- *multi-virulence locus sequence typing* (CRISPR-MVLST) (Liu *et al.*, 2011; Shariat, Sandt, *et al.*, 2013).

1.7.5 Multilocus sequence typing – MLST

Multilocus sequence typing é um método de tipagem molecular que utiliza o sequenciamento de genes *housekeeping* e vem sendo utilizado por diversos pesquisadores para diferentes microrganismos. Em 1998, Maiden e colaboradores propuseram a técnica e, a partir de então, ela tem-se apresentado como uma importante e eficaz técnica na caracterização molecular e investigação epidemiológica de patógenos bacterianos (Maiden *et al.*, 1998).

Este método tem as vantagens de ser altamente reprodutível e seus resultados poderem ser compartilhados *on-line*, pois possui banco de dados, o que possibilita a análise comparativa da diversidade genética de bactérias isoladas em diferentes partes do mundo (Maiden *et al.*, 1998; Urwin e Maiden, 2003; Achtman *et al.*, 2012).

MLST baseia-se na amplificação e sequenciamento de diferentes genes *housekeeping*. Para cada gene, as sequências são referidas como alelos e do conjunto de diferentes alelos provém um perfil alélico que difere o *sequence type* (ST) de cada amostra bacteriana. Sequências que diferem em apenas um nucleotídeo são considerados como alelos diferentes (Maiden *et al.*, 1998; Urwin e Maiden, 2003).

Especificamente, a técnica de MLST para *Salmonella* é baseado em sete genes: *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA*. O banco de dados de *Salmonella* pode ser encontrado no endereço eletrônico: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>.

Alguns estudos mostram a utilização do MLST para análise filogenética de *Salmonella enterica* (Kidgell *et al.*, 2002; Kotetishvili *et al.*, 2002; Fakhr, Nolan e Logue, 2005; Torpdahl *et al.*, 2005; Achtman *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014; Campioni *et al.*, 2015).

1.7.6 Sequenciamento do genoma completo

Na década de 1970, Sanger e colaboradores (1977) e Maxam e Gilbert (1977) desenvolveram métodos para sequenciar o DNA por técnicas de terminação e fragmentação,

respectivamente. Essa descoberta revolucionou o campo da biologia e permitiu decifrar genes completos e mais tarde genomas inteiros. O sequenciamento de Sanger, comumente chamado, tornou-se o método de sequenciamento mais utilizado por requerer menos manipulação com produtos químicos tóxicos e radioisótopos do que o método proposto por Maxam e Gilbert (Van Dijk *et al.*, 2014).

Em 2004, o *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) iniciou um programa com o objetivo de reduzir o custo do sequenciamento do genoma humano para US\$1000 em 10 anos. Isso estimulou muito o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (Schloss, 2008; Van Dijk *et al.*, 2014).

A primeira tecnologia de *next-generation sequencing* (NGS) foi lançada em 2005 através do método de pirosequenciamento do 454 Life Sciences, agora da Roche (Margulies *et al.*, 2005). Um ano depois, a plataforma Solexa/Illumina foi comercializada (Illumina adquiriu a Solexa em 2007). Em 2007, foi lançado a plataforma *Sequencing by Oligo Ligation Detection* (SOLiD) na época pela Applied Biosystems. Em 2010, Ion Torrent lançou o *Personal Genome Machine* (PGM). Outras metodologias foram lançadas como o Helicos BioSciences e o mais atual sequenciador lançado foi o PacBio (Van Dijk *et al.*, 2014).

Nos anos recentes, o custo do sequenciamento do genoma completo tem diminuído drasticamente e a tecnologia de NGS tem sido cada vez mais utilizada em laboratórios. Ademais, o tempo de duração do sequenciamento está diminuindo para dias e talvez para horas num futuro próximo. O baixo custo e a alta velocidade de NGS permite que o sequenciamento do genoma completo se torne muito útil e prático em vários laboratórios de estudos de bactérias, incluindo uso para diagnóstico e saúde pública (Van Dijk *et al.*, 2014).

Sequências genômicas completas de múltiplas linhagens bacterianas podem agora ser coletadas e analisadas, em apenas alguns dias, ressaltando o potencial desta tecnologia como uma ferramenta epidemiológica molecular para auxiliar na investigação de surtos de origem alimentar, filogenia, evolução etc (Holt *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2010; Gardy *et al.*, 2011; Allard *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2014).

O sequenciamento do genoma completo tem sido utilizado com sucesso para elucidar a evolução, epidemiologia e diversidade genotípica de algumas sorovariedades de *Salmonella* (Allard *et al.*, 2012; Okoro *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2013; Leekitcharoenphon *et al.*, 2014).

Relevância do Presente Estudo

2 RELEVÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO

A *Salmonella* Typhimurium é uma das principais sorovariedades de *Salmonella* causadora de doença de origem alimentar no mundo (Hendriksen *et al.*, 2011). Entre os anos 2001 e 2007, a *S. Typhimurium* foi a sorovariedade mais isolada nos Estados Unidos, Canadá, Austrália e Nova Zelândia. Nesse mesmo período, a *S. Typhimurium* foi a segunda sorovariedade mais isolada na África, Ásia, Europa, América Latina, incluindo o Brasil, precedida apenas pela *S. Enteritidis* (Hendriksen *et al.*, 2011).

No Brasil, há poucos trabalhos publicados em que metodologias moleculares foram utilizadas para tipar linhagens de *S. Typhimurium*, e dentre as metodologias genotípicas utilizadas estão o ERIC-PCR, PFGE e *Repetitive extragenic palindromic sequences* PCR (REP-PCR) (Ghilardi, Tavechio e Fernandes, 2006; Bessa *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2009; Tavechio *et al.*, 2009; Kich *et al.*, 2011; Palhares *et al.*, 2014). Alguns trabalhos relataram o perfil de resistência a antimicrobianos de linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de várias fontes, como humanos, animais, água e alimentos no Brasil (Bessa *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2009; Dos Reis *et al.*, 2011; Kich *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013; Palhares *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2015). Em relação ao perfil de genes de virulência em *S. Typhimurium* isoladas no país, poucos trabalhos são encontrados na literatura (Rowlands *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2015).

Portanto, devido à escassez de estudos de tipagem molecular com linhagens de *Salmonella* da sorovariedade Typhimurium isoladas no país, estudos que abordem diferentes aspectos da biologia, genética e epidemiologia dessa sorovariedade são de grande importância. Ademais, pelo nosso conhecimento não há nenhum trabalho publicado que analisou linhagens de *S. Typhimurium* isoladas por três décadas e de fontes diversas no Brasil.

Dessa forma, verificar o perfil de resistência a antimicrobianos, o potencial patogênico, bem como, realizar a tipagem molecular de linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de diversas fontes tais como humanos, alimentos, animais e ambiente do animal no Brasil durante três décadas ajudará em uma melhor caracterização da diversidade genotípica, potencial de causar doença e de resistir a possíveis antimicrobianos utilizados para tratamento de linhagens dessa sorovariedade circulante no país.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Caracterizar linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente do animal no Brasil quanto ao seu potencial patogênico, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade genotípica.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o potencial patogênico de linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente do animal através da pesquisa de alguns genes marcadores de virulência da SPI-I, SPI-II e de plasmídeos associados à virulência;
- Analisar o perfil de resistência de linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente do animal através do teste de susceptibilidade a antimicrobianos;
- Analisar a diversidade genotípica de linhagens de *S. Typhimurium* por PFGE, ERIC-PCR e MLVA comparando os isolados de humanos e alimentos;
- Analisar a diversidade genotípica de linhagens de *S. Typhimurium* por PFGE, ERIC-PCR e MLVA comparando os isolados de humanos, animais e ambiente do animal;
- Analisar a diversidade genotípica de linhagens de *S. Typhimurium* por CRISPR-MVLST comparando os isolados de humanos e alimentos;
- Analisar a diversidade genética de linhagens de *S. Typhimurium* por MLST, comparando linhagens isoladas no Brasil de humanos e alimentos entre si e com outras linhagens isoladas de diversas fontes em diferentes locais do mundo;
- Analisar a diversidade genética de linhagens de *S. Typhimurium* através do sequenciamento do genoma completo pela tecnologia de NGS comparando os isolados de humanos e alimentos.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas

Um total de 119 linhagens de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovariedade Typhimurium isoladas de material clínico de humanos (43), alimentos diversos (49), material clínico de suínos (22) e do ambiente de suínos (5) foram estudadas.

Todas as linhagens isoladas de humanos (43) e seis linhagens isoladas de alimento fazem parte da coleção de cultura do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (IAL\RP). Essas linhagens são provenientes do Estado de São Paulo e foram isoladas durante o período de 1983 a 2010.

As outras linhagens isoladas de alimentos (43) fazem parte da coleção de cultura da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), elas são provenientes de vários Estados do Brasil, incluindo Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Goiás, Paraná, São Paulo e Bahia e foram isoladas durante o período de 1999 a 2013.

As linhagens isoladas de material clínico de suínos (22) e do ambiente de suínos (5) foram isoladas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Suínos e Aves de Concórdia-SC, provenientes do Estado de Santa Catarina durante o período de 2000 a 2012.

A Tabela 2 traz as informações sobre o ano de isolamento, o Estado em que foram isoladas, a fonte e a origem de isolamento das 119 linhagens de *S. Typhimurium* estudadas. Importante mencionar que todas as linhagens foram isoladas independentemente a partir de diferentes materiais.

Tabela 2 – Fonte, origem, Estado e ano de isolamento das 119 linhagens de *Salmonella* Typhimurium estudadas, listadas em ordem cronológica e pelo Instituto de Pesquisa de que são provenientes

Instituto de Pesquisa	Linhagens	Fonte	Origem	Estado	Ano de isolamento
IAL-RP	STm 01	Fezes	Humano	SP	1983
IAL-RP	STm 02	Fezes	Humano	SP	1983
IAL-RP	STm 03	Fezes	Humano	SP	1983
IAL-RP	STm 04	Fezes	Humano	SP	1983
IAL-RP	STm 05	Fezes	Humano	SP	1983
IAL-RP	STm 06	Fezes	Humano	SP	1983
IAL-RP	STm 07	Fezes	Humano	SP	1983
IAL-RP	STm 08	Fezes	Humano	SP	1983
IAL-RP	STm 09	Fezes	Humano	SP	1984
IAL-RP	STm 10	Fezes	Humano	SP	1984
IAL-RP	STm 11	Fezes	Humano	SP	1984
IAL-RP	STm 12	Fezes	Humano	SP	1984
IAL-RP	STm 13	Fezes	Humano	SP	1984
IAL-RP	STm 14	Fezes	Humano	SP	1984
IAL-RP	STm 15	Fezes	Humano	SP	1985
IAL-RP	STm 16	Fezes	Humano	SP	1985
IAL-RP	STm 17	Fezes	Humano	SP	1985
IAL-RP	STm 18	Fezes	Humano	SP	1985
IAL-RP	STm 19	Fezes	Humano	SP	1986
IAL-RP	STm 20	Fezes	Humano	SP	1986
IAL-RP	STm 21	Fezes	Humano	SP	1986
IAL-RP	STm 22	Fezes	Humano	SP	1986
IAL-RP	STm 23	Fezes	Humano	SP	1986
IAL-RP	STm 24	Fezes	Humano	SP	1986
IAL-RP	STm 25	Fezes	Humano	SP	1986
IAL-RP	STm 26	Fezes	Humano	SP	1986
IAL-RP	STm 27	Fezes	Humano	SP	1986
IAL-RP	STm 28	Fezes	Humano	SP	1988
IAL-RP	STm 29	Fezes	Humano	SP	1989
IAL-RP	STm 30	Fezes	Humano	SP	1990
IAL-RP	STm 31	Fezes	Humano	SP	1991
IAL-RP	STm 32	Fezes	Humano	SP	1992
IAL-RP	STm 33	Fezes	Humano	SP	1992
IAL-RP	STm 34	Fezes	Humano	SP	1993
IAL-RP	STm 35	Fezes	Humano	SP	1995
IAL-RP	STm 36	Frango resfriado	Alimento	SP	1995
IAL-RP	STm 37	Linguiça crua de porco	Alimento	SP	1996
IAL-RP	STm 38	Fezes	Humano	SP	1997
IAL-RP	STm 39	Fezes	Humano	SP	1998
IAL-RP	STm 40	Hortaliça (alface crespa)	Alimento	SP	1998
IAL-RP	STm 41	Kafta crua	Alimento	SP	1998

Continua

Continuação

Instituto de Pesquisa	Linhagens	Fonte	Origem	Estado	Ano de isolamento
IAL-RP	STm 42	Fezes	Humano	SP	1999
IAL-RP	STm 43	Fezes	Humano	SP	2000
IAL-RP	STm 44	Sangue	Humano	SP	2000
IAL-RP	STm 45	Linguiça de suíno crua	Alimento	SP	2000
IAL-RP	STm 46	Linguiça toscana crua	Alimento	SP	2002
IAL-RP	STm 47	Fezes	Humano	SP	2003
IAL-RP	STm 48	Abscesso cerebral	Humano	SP	2005
IAL-RP	STm 49	Fezes	Humano	SP	2010
FIOCRUZ	702/99	Produto acabado	Alimento	SC	1999
FIOCRUZ	12288/06	Suíno	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	12278/06	Suíno	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	12290/06	Suíno	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	12268/06	Suíno	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	12381/06	Suíno	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	5936/06	Frango resfriado	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	5937/06	Frango resfriado	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	5934/06	Suíno	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	5961/06	Suíno	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	5962/06	Suíno	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	5929/06	Ave	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	13609/06	Ave	Alimento	SC	2006
FIOCRUZ	3848/08	Alimento	Alimento	SC	2008
FIOCRUZ	16238/09	Prato pronto	Alimento	MS	2009
FIOCRUZ	16239/09	Prato pronto	Alimento	MS	2009
FIOCRUZ	16240/09	Prato pronto	Alimento	MS	2009
FIOCRUZ	16202/09	Produto industrializado	Alimento	RS	2009
FIOCRUZ	16251/09	Produto industrializado	Alimento	GO	2009
FIOCRUZ	16273/09	Produto industrializado	Alimento	GO	2009
FIOCRUZ	17307/09	Produto industrializado	Alimento	-	2009
FIOCRUZ	9461/10	Carne in natura	Alimento	SC	2010
FIOCRUZ	9479/10	Carne in natura	Alimento	SC	2010
FIOCRUZ	7032/10	Ave	Alimento	PR	2010
FIOCRUZ	3057/10	Carcaça congelada frango	Alimento	PR	2010
FIOCRUZ	6346/10	Frango	Alimento	SP	2010
FIOCRUZ	5635/10	-	Alimento	RS	2010
FIOCRUZ	9109/10	Suíno	Alimento	PR	2010
FIOCRUZ	426/10	Frango	Alimento	SC	2010
FIOCRUZ	447/10	Frango	Alimento	SC	2010
FIOCRUZ	2452/11	Carcaça congelada frango	Alimento	SP	2011
FIOCRUZ	6709/11	Frango resfriado	Alimento	RS	2011

Continua

Conclusão

Instituto de Pesquisa	Linhagens	Fonte	Origem	Estado	Ano de isolamento
FIOCRUZ	948/12	Salada crua	Alimento	BA	2012
FIOCRUZ	1103/12	Suíno (salame caseiro)	Alimento	RS	2012
FIOCRUZ	1104/12	Suíno (salame caseiro)	Alimento	RS	2012
FIOCRUZ	3330/12	Bovino (carne assada)	Alimento	SC	2012
FIOCRUZ	994/13	Produto acabado de venda (origem animal)	Alimento	SP	2013
FIOCRUZ	374/13	Produto acabado de venda (origem animal)	Alimento	SC	2013
FIOCRUZ	465/13	Produto acabado de venda (origem animal)	Alimento	SP	2013
FIOCRUZ	618/13	Produto acabado de venda (origem animal)	Alimento	SC	2013
FIOCRUZ	622/13	Produto acabado de venda (origem animal)	Alimento	SC	2013
FIOCRUZ	583/13	Produto acabado de venda (origem animal)	Alimento	SC	2013
FIOCRUZ	623/13	Produto acabado de venda (origem animal)	Alimento	SC	2013
EMBRAPA	739	Linfonodo mesentérico	Animal	SC	2000
EMBRAPA	1030	Fezes de suíno	Animal	SC	2003
EMBRAPA	29	Fezes de suíno	Animal	SC	2004
EMBRAPA	20	Linfonodo mesentérico	Animal	SC	2004
EMBRAPA	22	Linfonodo inguinal	Animal	SC	2004
EMBRAPA	51	Suabe carcaça	Animal	SC	2004
EMBRAPA	58	Fezes de suíno	Animal	SC	2004
EMBRAPA	68	Fezes de suíno	Animal	SC	2004
EMBRAPA	1212	Linfonodo mesentérico	Animal	SC	2005
EMBRAPA	1218	Linfonodo mesentérico	Animal	SC	2005
EMBRAPA	1220	Linfonodo mesentérico	Animal	SC	2005
EMBRAPA	1221	Linfonodo mesentérico	Animal	SC	2005
EMBRAPA	1222	Linfonodo mesentérico	Animal	SC	2005
EMBRAPA	1224	Linfonodo mesentérico	Animal	SC	2005
EMBRAPA	343	cama de suíno	Ambiente	SC	2006
EMBRAPA	1214	cama de suíno	Ambiente	SC	2006
EMBRAPA	1213	cama de suíno	Ambiente	SC	2007
EMBRAPA	338	Fezes de suíno	Animal	SC	2008
EMBRAPA	345	Fezes de suíno	Animal	SC	2008
EMBRAPA	804	Urina de suíno	Animal	SC	2011
EMBRAPA	812	Urina de suíno	Animal	SC	2011
EMBRAPA	824	Urina de suíno	Animal	SC	2011
EMBRAPA	1206	Suabe arrasto	Ambiente	SC	2011
EMBRAPA	1209	Suabe comedouro	Ambiente	SC	2011
EMBRAPA	1207	Suabe carcaça	Animal	SC	2012
EMBRAPA	1210	Suabe carcaça	Animal	SC	2012
EMBRAPA	1211	Suabe carcaça	Animal	SC	2012

IAL/RP: Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto; FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz; EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; SP: São Paulo; SC: Santa Catarina; MS: Mato Grosso do Sul; RS: Rio Grande do Sul; GO: Goiás, PR: Paraná; BA: Bahia.

4.2 Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens

As 119 linhagens de *S. Typhimurium* provenientes do IAL/RP, da FRIOCRUZ e da EMBRAPA foram inicialmente inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid) a 37°C, por 18-24 horas. Após esse período foram semeadas em ágar MacConkey (Himedia), incubadas a 37°C, por 18-24 horas para isolamento de colônias e a observação da utilização ou não da lactose. Em seguida, as colônias características de *Salmonella* foram inoculadas em meios de identificação bioquímica como ágar *Triple Sugar Iron* (TSI), EPM, MILi e Citrato de Simmons e incubadas a 37°C por 18-24 horas. Posteriormente, as linhagens com as características bioquímicas compatíveis com *Salmonella* spp. foram semeadas em frascos contendo caldo BHI com 20% de glicerol e mantidas em freezer -80°C.

O ágar TSI é utilizado para a diferenciação de bacilos entéricos patogênicos Gram-negativos através de sua capacidade de fermentar glicose, lactose e sacarose e pela produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). O meio EPM informa quanto à produção de gás a partir da fermentação da glicose, produção de H₂S, urease e L-triptofano desaminase. O meio MILi permite verificar a motilidade, produção de indol e atividade de lisina-descarboxilase. O meio Citrato de Simmons avalia a utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono. Os três meios englobam oito testes bioquímicos que somados ao teste de fermentação da lactose são de extrema importância na caracterização de bactérias pertencentes à Família *Enterobacteriaceae*.

4.3 Extração e verificação da pureza do DNA genômico

Os DNAs genômicos bacterianos das 119 linhagens de *S. Typhimurium* estudadas foram extraídos segundo (Campioni e Falcão, 2014) para serem utilizados na pesquisa de genes de virulência, nas metodologias de ERIC-PCR, MLVA, CRISPR-MVLST, MLST e no sequenciamento do genoma completo.

Todas as linhagens foram crescidas em 3 mL de caldo BHI e inoculadas a 36°C por 24 horas. Em seguida, foram sedimentadas por centrifugação (20817 x *g* por 3 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf) e o sedimento suspenso em 250 µL de solução I (20% de sacarose, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 50 mM EDTA) a 4°C.

Após 10 minutos em gelo, as células bacterianas foram lisadas com 500 µL de solução II (50 mM NaCl e 1% de sarcosil) adicionados 0,05 mg/mL de proteinase K. Em seguida, incubou-se em banho de água por no mínimo 2 horas a 37°C.

O próximo passo foi adicionar 750 μL de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e centrifugar a 20817 x g por 10 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de polipropileno de fundo cônico de 1,5 mL e a ele foi adicionado 750 μL de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1, em seguida centrifugado a 20817 x g por 10 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e novamente transferido para um novo tubo de polipropileno de fundo cônico de 1,5 mL, a ele foi adicionado 1 mL de etanol a 4°C e o DNA foi precipitado em gelo por 15 minutos.

Em seguida, o DNA foi sedimentado por centrifugação (20817 x g por 15 minutos a 4°C em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf). O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o sedimento seco a vácuo em *Speed vac* (Concentrator 5301, Eppendorf) e, posteriormente suspenso em 400 μL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Invitrogen). Aos 400 μL de suspensão de DNA foram adicionados 2 μL de RNase 50 mg/mL e incubadas em banho de água a 37°C por 1 hora.

A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% preparado com TAE (Tris Acetato EDTA) 1x. Em 3 μL do DNA extraído foram adicionados 2 μL de solução de azul de bromofenol (40% de sacarose, 0,25% de azul de bromofenol e água destilada q.s.p.). A eletroforese foi conduzida a 80 Volts até o marcador azul de bromofenol alcançar aproximadamente metade do gel. Os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 20 minutos) e observados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

A concentração e a pureza do DNA genômico extraído foram analisadas em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Foram consideradas de boa qualidade, as extrações da razão entre 1,6 e 1,9 ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$), pois esses valores demonstram que a amostra de DNA está com baixo nível de impurezas. Para amostras acima ou abaixo desses valores uma nova extração foi realizada.

4.4 Genes de virulência por PCR

A pesquisa dos genes de virulência por PCR foi realizada para 119 linhagens de *S. Typhimurium* listadas na Tabela 2. A PCR foi realizada utilizando reagentes para o volume

final de 50 μ L. A Tabela 3 traz de forma detalhada os reagentes utilizados para a amplificação dos genes de virulência.

Tabela 3 – Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa dos genes de virulência por PCR

Componentes	Volume (μ L)	Concentração Final
10x Tampão "PCR Buffer" ^a	5	1x
10 mM "dNTP Mixture" ^a	1	0,2 mM de cada dNTP
<i>Primer forward</i>	2,5	25 pmol
<i>Primer reverse</i>	2,5	25 pmol
50 mM MgCl ₂ ^a	2	2 mM
DNA Genômico (10 ng/ μ L)	5	50 ng
Taq DNA Polimerase ^a 2U	0,5	1U
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p.-50	_____

^a Produto Life Technologies

Os genes pesquisados foram *invA*, *sopB*, *sopD*, *sipA*, *sipD*, *flgK*, *fljB*, *flgL*, *ssaR*, *sifA*, *sopE2* e *spvB* cujas sequências dos *primers* utilizados estão na Tabela 4.

As condições das reações de amplificação foram desnaturação inicial do DNA genômico por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos de separação das fitas de DNA a 94°C por 45 segundos, hibridação dos *primers* com temperatura específica para cada *primer* por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos, foi realizada a etapa de extensão final de 72°C por 15 minutos.

O termociclador utilizado foi o DNAEngine[®] Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad). O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1X. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (1,0 μ g/mL por 30 minutos), visualizados em transluminador de luz U.V. (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

Tabela 4 – Sequência, tamanho do *amplicon* e referência dos *primers* usados na pesquisa de genes de virulência

Genes	Sentido	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Temperatura de hibridação/°C	Tamanho do <i>Amplicon</i> (pb)	Referências
<i>InvA</i>	<i>Forward</i>	ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT	53	244	HUR <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT			
<i>sopB</i>	<i>Forward</i>	CCT CAA GAC TCA AGA TG	47	1987	HUR <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	TAC GCA GGA GTA AAT CGG TG			
<i>sopD</i>	<i>Forward</i>	ACG ACC ATT TGC GGC G	50	1291	HUR <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	GAG ACA CGC TTC TTC G			
<i>sipA</i>	<i>Forward</i>	ATGGTTACAAGTGTAAGGACTCAG	54	2055	SHAH <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	ACGCTGCATGTGCAAGCCATC			
<i>sipD</i>	<i>Forward</i>	ATGC TCCTTGCAGGAAGCTTTTG	47	1029	SHAH <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	TTAATATTCAAATTATTCCG			
<i>flgK</i>	<i>Forward</i>	ATGTCCAGCTTGATTAATCAC	47	1659	SHAH <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	GCGAATATTCAATAACGCATC			
<i>fljB</i>	<i>Forward</i>	ATGGCACAAGTCATTAATACAAAC	48	1515	SHAH <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	ACGCAGTAAAGAGAGGAC			
<i>flgL</i>	<i>Forward</i>	ATGCGTATCAGTACCCAGATG	50	951	SHAH <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	CCGGTTCAACTGGAAAAGC			
<i>ssaR</i>	<i>Forward</i>	GTT CGG ATT CAT TGC TTC GG	52	1628	HUR <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	TCT CCA GTG ACT AAC CCT AAC CAA			
<i>sifA</i>	<i>Forward</i>	ATG CCG ATT ACT ATA GGC AAT GG	49	1011	HUR <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	TTA TAA AAA ACA ACA TAA ACA GCCG			
<i>sopE2</i>	<i>Forward</i>	TAC TAC CAT CAG GAG G	44	995	HUR <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Reverse</i>	GAA TGT TTT ATG TGA CGC AG			
<i>spvB</i>	<i>Forward</i>	CGGTTATAGAAGAGCTCCTGT	50	349	RYCHLÍK <i>et al.</i> , (2008)
	<i>Reverse</i>	CCGGTATACGACTCTGTGATC			

4.5 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado de acordo com as normas de procedimento do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2014), onde as 119 linhagens de *S. Typhimurium* (Tabela 2), após crescimento em caldo BHI (Oxoid) à 37°C por 24 horas, foram semeadas em placas de Petri com ágar Müller-Hinton (Oxoid) e incubadas à 37°C por 24 horas. Posteriormente, foi feita uma suspensão de cada linhagem em solução salina 0,8% até que atingissem a escala 0,5 de MacFarland e, com o auxílio de um *swab*, as linhagens foram semeadas individualmente em toda a placa de Petri de 20x150mm com ágar Müller-Hinton (Oxoid) para a formação do “tapete bacteriano”. Os discos de antibióticos (Oxoid) foram colocados sobre as placas, e estas foram incubadas à 37°C por 24 horas seguindo-se a leitura dos halos de inibição.

Foram testados 13 antimicrobianos seguintes: cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg), cefepime (30 µg), amoxicilina-ácido clavulânico (20/10 µg), ampicilina (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), levofloxacina (5 µg), sulfametoxazol-trimetropima (23,75/1,25 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e tetraciclina (30 µg). A *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade.

4.6 PFGE

4.6.1 Preparação dos *plugs* de agarose

A técnica de PFGE foi realizada para todas as 119 linhagens de *S. Typhimurium* listadas na Tabela 2 de acordo com o protocolo do *PulseNet* para *Salmonella* (Ribot *et al.*, 2006).

As linhagens foram crescidas em caldo BHI (Oxoid) a 37°C. Depois foram semeadas em placas com ágar triptona de soja (TSA) (Himedia) e incubadas a 37°C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi adicionado a 3 mL de tampão de suspensão de células (100 mM Tris : 100 mM EDTA) até que atingisse a D.O._{610nm} de 1,0 (faixa de 0,8 a 1,0). Após o preparo da suspensão de células, as suspensões foram colocadas em gelo para cessar o crescimento bacteriano.

Foram transferidos 200 µL da suspensão de células para tubo de 2 mL e colocados em banho seco a 60°C. Foram adicionados 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 200 µL de 1%

agarose *Seakem Gold* (Lonza) em cada tubo com a suspensão de células, 70 µL dessa mistura foram transferidos para cada poço de um molde próprio para a confecção dos *plugs* e os mesmos foram levados a geladeira por cerca de 5 minutos ou até sua solidificação.

4.6.2 Lise celular e lavagem dos *plugs* de agarose

Os *plugs* de cada linhagem foram transferidos para tubos de polipropileno de fundo cônico tipo “falcon” de 15 mL com 5 mL de tampão de lise celular (50 mM Tris : 50 mM EDTA, pH 8,0 + 1% Sarcosyl) + 25µL de proteinase K (20 mg/mL) por tubo e foram incubados em banho de água a 54°C por duas horas. Após isso, os tubos foram agitados vigorosamente por 30 minutos.

O tampão de lise celular foi removido e os *plugs* foram lavados duas vezes com 10 mL de água Milli-Q pré-aquecida a 54°C por 15 minutos a cada vez. A água foi removida e os *plugs* foram lavados mais quatro vezes com 10 mL de Tampão TE pré-aquecido a 54°C por 15 minutos cada vez. Os *plugs* foram estocados em 1 mL tampão de lavagem TE (10 mM Tris : 1 mM EDTA, pH 8,0) em tubos de 2 mL a 4°C (geladeira).

4.6.3 Digestão dos *plugs*

A digestão dos *plugs* foi feita separando-se 1 *plug* em um tubo de polipropileno de fundo reto de 2,0 mL, seguido de três lavagens por uma hora com 1 mL de tampão TE pré-aquecido a 54°C por 15 minutos sob leve agitação. O tampão TE foi removido e foi adicionado 300 µL do tampão comercial da enzima (*Xba*I) 1X. Os *plugs* foram lavados por 30 minutos a temperatura ambiente sob leve agitação.

A digestão do DNA bacteriano contido nos *plugs* foi feita com 40 unidades da enzima de restrição *Xba*I (Invitrogen). Os *plugs* foram incubados a 37°C em banho de água por no mínimo 2 horas.

4.6.4 Corrida eletroforética

Foram preparados 2500 mL de tampão TBE (45 mM Tris; 45 mM ácido bórico; 1 mM EDTA, pH 8,0) 0,5X. O gel foi preparado com 150 mL do tampão TBE 0,5X e 1,5g de agarose *Seakem Gold* (Lonza). Cerca de 2 mL da agarose fundida foram separados e

colocados em banho seco a 60°C. O restante do tampão TBE foi colocado na cuba de eletroforese de campo pulsado até que atingisse uma temperatura de 14°C.

Os *plugs* foram transferidos para o gel, selados com a agarose fundida anteriormente separada e submetidos à corrida em um programa de 1 bloco no aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad) sob as seguintes condições: pulso inicial de 2,2 segundos, pulso final de 63,8 segundos, voltagem de 6 v/cm, ângulo de 120° e com tempo de corrida de 19 horas, temperatura 14°C conforme Ribot et al. (2006).

Em três poços do gel de eletroforese foi aplicado o marcador de peso molecular de 50 a 1000 Kb (*Lambda Ladder PFG Marker* – New England BioLabs). Após as corridas, os fragmentos foram corados com solução de brometo de etídeo (Invitrogen) 0,5 mg/mL por 30 minutos, descorados em água Milli-Q por 60-90 minutos, trocando a água a cada 20 minutos, observados em transluminador de luz ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico Quantity One 4.6.1 (Bio-Rad).

4.6.5 Análise do perfil de bandas gerado com os dados de PFGE

O perfil de bandas obtido foi analisado através do programa *BioNumerics* versão 7 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica). Para a técnica de PFGE, bandas acima de 48,5 Kb em tamanho foram incluídas na análise. Um padrão de peso molecular (*Lambda Ladder PFG Marker* - New England) foi incluído três vezes em cada gel com o intuito de normalizar as imagens para a validação da técnica nos diferentes géis obtidos na técnica de PFGE.

4.6.6 Construção dos dendrogramas de similaridade genotípica gerado com os dados de PFGE

A construção dos dendrogramas de similaridade genotípica foi realizada pelo *software* *BioNumerics* versão 7.0 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) utilizando-se o método UPGMA e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice DICE, com tolerância de 1,5%, segundo as instruções do manual do programa.

4.7 ERIC-PCR

4.7.1 Condições da PCR

A metodologia de ERIC-PCR foi realizada para todas as 119 linhagens citadas na Tabela 2. A PCR foi realizada utilizando reagentes para o volume final de 50 μ L. Os *primers* utilizados na reação de PCR foram: ERIC 1 (5' – ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C – 3') e ERIC 2 (5' – AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G – 3') segundo Versalovic *et al.* (1991). A Tabela 5 mostra, de forma detalhada, os reagentes utilizados para a realização da técnica de ERIC-PCR.

Tabela 5 – Descrição dos reagentes utilizados na técnica de ERIC-PCR

Componentes	Volume (μ L)
10x ExTaq Buffer	5,0
dNTP <i>mixture</i> (2,5 mM cada)	4,0
<i>Primer</i> ERIC 1 (10 pmol/ μ L)	5,0
<i>Primer</i> ERIC 2 (10 pmol/ μ L)	5,0
Takara Ex Taq™ DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0,25
DNA genômico (100-500 ng/ μ l)	1,0
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase	q.s.p.-50

O ciclo utilizado na amplificação foi o de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 2 minutos. Os produtos de amplificação de ERIC-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% a 70V por 180 minutos. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL por 20 minutos, observados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad). O marcador de peso molecular utilizado foi 1 Kb plus DNA Ladder da marca Invitrogen.

4.7.2 Análise do perfil de bandas gerado com os dados de ERIC-PCR

A análise dos dados foi feita utilizando-se o programa *BioNumerics* versão 7 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica). Somente as bandas entre 300 e 5000 pb em tamanho, foram incluídas na análise. Um padrão de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder, Invitrogen) foi incluído três vezes em cada gel com o objetivo de normalizar as imagens para validação da técnica nos diferentes géis.

4.7.3 Construção do dendrograma de similaridade genética gerado com os dados de ERIC-PCR

A construção do dendrograma de similaridade genética foi realizada pelo *software BioNumerics* versão 7 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) utilizando-se o método UPGMA e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice DICE, com tolerância de 1,5%, segundo as instruções do manual do programa.

4.8 MLVA

4.8.1 Amplificação e eletroforese capilar

A técnica de MLVA foi realizada para todas as 119 linhagens de *S. Typhimurium* listadas na Tabela 2, segundo protocolo descrito por Lindstedt *et al.* (2004), com algumas modificações. Cinco *loci* previamente selecionados foram amplificados por PCR utilizando-se *primers* específicos (Tabela 6) para cada *locus*. Os *primers forward* utilizados foram marcados na extremidade 5' com diferentes fluoróforos.

Tabela 6 – *Primers* utilizados para metodologia de MLVA específicos para *S. Typhimurium*

<i>Primers</i>	Sequência
STTR3-F	VIC-CCCCCTAAGCCCGATAATGG
STTR3-R	TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA
STTR5-F	VIC-ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT
STTR5-R	GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT
STTR6-F	6FAM-TCGGGCATGCGTTGAAA
STTR6-R	CTGGTGGGGAGAATGACTGG
STTR9-F	6FAM-AGAGGCGCTGCGATTGACGATA
STTR9-R	CATTTTCCACAGCGGCAGTTTTTC
STTR10pl-F	NED-CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG
STTR10pl-R	GAAGGGGCCGGGCAGAGACAGC

Fonte: Lindstedt *et al.* (2004) com modificações. F - *forward*; R - *reverse*.

A determinação dos VNTRs foi realizada em cinco reações de PCR cada uma com um par de *primer*. A temperatura de hibridação dos *primers* foi de 63°C. A Tabela 7 traz de forma detalhada os reagentes utilizados nas reações de PCR para a realização da técnica de MLVA.

Tabela 7 – Descrição dos reagentes utilizados na PCR de MLVA

Componentes	Volume (µL)
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix ^a	6,25
<i>Primer forward</i>	0,25
<i>Primer reverse</i>	0,25
5x Q-solution	2,5
DNA genômico (10 ng/µL)	2,0
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^b	q.s.p.-12,5

^a Produto Qiagen; ^b Produto Life Technologies

O ciclo utilizado na amplificação foi o de desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, seguido por 25 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 63°C por 90 segundos e 72°C por 90 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Após a PCR, 5 µl de PCR - STTR3 + 5 µl de PCR-STTR6 + 1 µl PCR-STTR5 + 1 µl PCR-STTR9 + 1 µl PCR-STTR10pl foram misturadas em 87,5 µL de água deionizada livre de RNase e DNase (GIBCO) para um volume final de 100 µL. Posteriormente, 1 µL da diluição foi adicionado a 1 µL do marcador de peso molecular GeneScan-1200 LIZ[®] *Size Standard* (Applied Biosystem) e 12 µL de HiDi Formamida (Applied Biosystem). Em seguida foi feita a eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500xl (Applied Biosystem) utilizando filtro G5 e matriz DS-33, de acordo com as instruções do fabricante.

4.8.2 Análise dos dados gerados a partir da eletroforese capilar

A análise dos dados foi feita utilizando-se o *software* BioNumerics versão 7 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica). Cada pico gerado foi identificado de acordo com o tamanho e a marcação utilizada. O tamanho dos fragmentos e consequentemente o número de repetições de cada *loci* VNTR foi convertido em números para a construção do dendrograma.

4.8.3 Construção dos dendrogramas de similaridade genotípica gerado com os dados de MLVA

A construção dos dendrogramas de similaridade genotípica entre as linhagens foi realizada pelo *software* BioNumerics versão 7 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) utilizando-se o método UPGMA e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice *categorical values*, segundo as instruções do manual do programa.

4.9 CRISPR-MVLST

A tipagem por CRISPR-MVLST foi feita para as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos (43) e alimentos (46) listadas na Tabela 2. A metodologia CRISPR-MVLST foi realizada baseada em dois genes de virulência (*fimH* e *sseL*) e dois *loci* CRISPR de *Salmonella*, segundo Liu *et al.* (2011) e Shariat *et al.* (2013), com algumas modificações.

4.9.1 Amplificação e sequenciamento dos genes de virulência *fimH* e *sseL*

Os *primers* referentes aos genes *fimH* e *sseL* utilizados na amplificação e no sequenciamento segundo Shariat *et al.* (2013), estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – *Primers* utilizados na amplificação e sequenciamento dos genes *fimH* e *sseL*

Gene	Sentido	Sequência de <i>primers</i>	PCR	Sequenciamento
<i>fimH</i> -1	Forward	AGGTGAACTGTTTCATCCAGTGG	✓	✓
<i>fimH</i> -2	Reverse	GCGGGCTGAACAAAACACAA	✓	✓
<i>sseL</i> -1	Forward	AAAATCAGGTCTATGCCTGATTTAATATATC	✓	✓
<i>sseL</i> -2	Reverse	GGCTCTAAGTACTCACCATTACT	✓	✓
<i>sseL</i> -3	Reverse	ACCAGGAAACAGAGCAAAATGAATATATGT		✓
<i>sseL</i> -4	Reverse	TTCTCTCGGTAAACTATCCTATTGGGC		✓

Os reagentes utilizados para a amplificação dos genes *fimH* e *sseL* estão listados na Tabela 9 com a utilização dos *primers* específicos para cada gene (Tabela 8). As condições da PCR foram feitas segundo Shariat *et al.* (2013) com desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 8 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 mg/mL) por 20 minutos, visualizados em transluminador de luz ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

Após a amplificação e verificação dos produtos amplificados, os produtos de PCR foram purificados, utilizando o *kit* de purificação *PureLink® PCR Purification* (Life Technologies), segundo recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genética Molecular, situado na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em sequenciador automático ABI 3500xl (Applied Biosystem).

Tabela 9 – Descrição dos reagentes utilizados para amplificação dos genes *fimH* e *sseL*

Componentes	Volume (µL)
10X Tampão "PCR Buffer" ^a	5
10mM "dNTP mixture" ^a	1
Primer forward (10 pmol/µL) ^a	2,5
Primer reverse (10 pmol/µL) ^a	2,5
50mM MgSO ₄ ^a	2
DNA genômico (10 ng/µL)	5
Taq DNA Polimerase High Fidelity (1 U/µL) ^a	1
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p. 50

^a Produto Life Technologies

4.9.2 Análise das sequências obtidas

As sequências dos genes *fimH* e *sseL* foram analisadas no programa *ChromasPro* versão 1.41 (Technelysium PtY LTD). A linhagem de *S. Typhimurium* LT2 foi utilizada como padrão durante o alinhamento das sequências.

4.9.3 Análise dos loci CRISPR

A análise dos loci CRISPR foi feita para as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas na Tabela 2. Como foi realizado o sequenciamento do genoma completo, que será descrito em detalhes mais adiante, as sequências foram utilizadas também para a análise dos dois loci CRISPR de *Salmonella*.

Os espaçadores foram identificados utilizando o programa *online* CRISPRfinder (<http://crispr.u-psud.fr/Server/>) a partir dos *assemblies* gerados com o sequenciamento do genoma completo. Manualmente, foi feita uma matrix binária no programa Microsoft Excel, onde a presença do espaçador é denominada de “1” e a ausência de “0”.

4.9.4 Construção do dendrograma de similaridade genotípica gerado com os dados de CRISPR-MVLST

A construção do dendrograma de similaridade genotípica entre as linhagens foi realizada pelo *software* BioNumerics versão 7 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) utilizando-se o método UPGMA e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice *categorical values*, segundo as instruções do manual do programa.

Foram gerados dois dendrogramas. Um dendrograma foi gerado utilizando-se a matriz binária dos espaçadores de CRISPR e outro dendrograma foi feito através de uma combinação da matriz binária dos espaçadores com as sequências dos genes *fimH* e *sseL*.

4.10 MLST

O MLST foi feito para as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas na Tabela 2. O sequenciamento do genoma completo também foi utilizado para a metodologia de MLST. A identificação dos sete genes *housekeeping* utilizados no esquema de MLST de *S. enterica* e o ST correspondente a sequência de alelos foi feita através do programa *Center for Genomic Epidemiology MLST online* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

4.10.1 Construção dos diagramas de similaridade genética com os dados de MLST

Foram construídos dois diagramas de similaridade genética através do programa *eBURSTv3*, disponível *online* (<http://eburst.mlst.net/>). Um diagrama foi feito baseado exclusivamente nos STs das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos estudadas, e o outro diagrama foi feito com as 92 linhagens de *S. Typhimurium* acima mencionadas mais as linhagens de *S. Typhimurium* disponíveis no banco de dados para verificar a relação genética entre as linhagens e a formação de complexos clonais, quando existentes.

4.11 Cálculo dos índices de discriminação

O cálculo do índice de discriminação foi feito para as metodologias de PFGE, ERIC-PCR, MLVA e CRISPR-MVLST segundo uma variação do índice de diversidade de Simpson

(Simpson, 1949). O índice de discriminação (D) utilizado (Hunter e Gaston, 1988) baseia-se na probabilidade de que duas linhagens não relacionadas escolhidas aleatoriamente dentro de uma população se localizarem dentro de grupos de tipagem distintos. O índice D é obtido de acordo com a seguinte fórmula:

$$D = 1 - [1/N(N-1)] \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

Na fórmula N representa o número total de linhagens estudadas, s é o número total de tipos obtidos no dendrograma e n_j é o número de amostras que pertencem ao tipo j .

4.12 Sequenciamento do genoma completo

O sequenciamento do genoma completo foi realizado para as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas na Tabela 2. Essa metodologia foi realizada no *U. S. Food and Drug Administration* (FDA), College Park, MD, USA, através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PSDE) concedido pela CAPES sob orientação do Dr. Marc Allard.

A plataforma NextSeq da Illumina foi utilizada como metodologia de NGS para o sequenciamento do genoma completo das 92 linhagens de *S. Typhimurium*. Os DNAs foram extraídos de acordo com o Item 4.3. A qualidade dos DNAs foi verificado em NanoDrop (Thermo Scientific) e a concentração foi verificado em fluorômetro Qubit (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante.

4.12.1 Diluição do DNA

Para o sequenciamento do genoma completo foi necessário utilizar 1 ng de DNA por linhagem. Portanto, após a quantificação do DNA o mesmo foi diluído para que atingisse uma concentração de 0,2 ng/ μ L uma vez que foi utilizado 5 μ L da diluição, obtendo assim 1 ng de DNA.

As etapas seguintes foram feitas utilizando-se o *Nextera XT Sample Prep Kit* (Illumina).

4.12.2 Fragmentação do DNA

Os reagentes *amplicon tagmentation mix* (ATM), *tagmentation DNA buffer* (TD buffer) e o *nextera PCR mastermix* (NPM) foram colocados em gelo. O *neutralization buffer* (NT buffer) foi mantido a temperatura ambiente. Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 10 μL TD buffer e 5 μL DNA (0,2 ng/ μL) em cada poço por amostra. Adicionou-se 5 μL ATM e homogeneizou-se com a pipeta 10 vezes. A placa foi coberta com a *Microseal B*, um tipo de fita adesiva para cobrir a placa. A placa foi centrifugada a 280 x g por 1 minuto. Após a centrifugação, a placa foi colocada em termociclador a 55°C por 5 minutos e mantida a 10°C. A *Microseal B* foi removida, foi adicionado 5 μL NT buffer em cada poço e homogeneizado com a pipeta 10 vezes. Novamente, cobriu-se a placa com *Microseal B* e centrifugou-se por 280 x g a 20°C por 1 minuto. A placa foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos.

4.12.3 Amplificação

Foi adicionado 5 μL NPM por poço e 5 μL de cada adaptador e homogeneizado com a pipeta 10 vezes. O adaptador foi utilizado para identificar cada linhagem. Novamente, cobriu-se a placa com *Microseal B* e centrifugou-se por 280 x g a 20°C por 1 minuto. A placa foi colocada em termociclador, seguindo as condições de corrida: 72°C por 3 minutos, 95°C por 30 segundos, 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, extensão final de 72°C por 5 minutos.

Após a amplificação, a placa foi centrifugada por 280 x g a 20°C por 1 minuto e os 50 μL da reação foram transferidos para uma nova placa.

4.12.4 Purificação da PCR

O *AMPure XP beads* foi retirado da geladeira e deixado a temperatura ambiente por 30 minutos. E o *resuspension buffer* (RSB) também foi deixado a temperatura ambiente. Com um aparelho tipo “Vortex”, as *beads* foram homogeneizadas por 1 minuto. Adicionou-se 35 μL *AMPure XP beads* e cobriu-se a placa com *Microseal B*. A placa foi colocada em agitador a 1800 rpm por 2 minutos, depois a placa foi centrifugada 280 x g a 20°C por 1 minuto. Colocou-se a placa sob o suporte magnético por 2 minutos ou até o sobrenadante ficar limpo. O sobrenadante foi removido e descartado. Foram adicionados 200 μL de etanol 80%. O

sobrenadante foi removido e descartado. Repetiu-se esse procedimento. Com a placa ainda sob o suporte magnético, deixou-se por 15 minutos. Retirou-se a placa do suporte magnético. Adicionou-se 52,5 μL RSB e colocou-se a placa em um agitador a 1800 rpm por 2 minutos. A placa foi centrifugada 280 x g a 20°C por 1 minuto. A placa foi colocada sob o suporte magnético por 2 minutos. Em uma nova placa transferiu-se 50 μL do sobrenadante e cobriu-se a placa com *Microseal B*.

4.12.5 Normalização da biblioteca

Os reagentes *library normalization additives 1* (LNA1), *library normalization wash 1* (LNW1), *library normalization storage buffer 1* (LNS1) e *library normalization beads 1* (LNB1) foram deixados em temperatura ambiente. Misturou-se os reagentes LNA1 e LNB1 na seguinte proporção 45,83 μL /8,33 μL por amostra. Transferiu-se 20 μL da PCR purificada para uma nova placa e adicionou-se 45 μL da mistura LNA1/LNB1. Cobriu-se a placa com *Microseal B* e agitou-se a 1800 rpm por 30 minutos. A placa foi colocada sob o suporte magnético por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e descartado. Tirou-se a placa do suporte magnético. Adicionou-se 45 μL LNW1, cobriu-se com *Microseal B* e agitou-se a 1800 rpm por 30 minutos. A placa foi colocada sob o suporte magnético por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e descartado. O processo foi repetido mais uma vez. A placa foi removida do suporte magnético e adicionou-se 30 μL NaOH a 0.1N. Cobriu-se a placa com *Microseal B* e agitou-se a 1800 rpm por 5 minutos. A placa foi colocada sob o suporte magnético por 2 minutos. Em uma nova placa, colocou-se 30 μL LNS1 e 30 μL do sobrenadante da outra placa. Homogeneizou-se a mistura e centrifugou-se a 1000 x g por 1 minuto.

4.12.6 Mistura da biblioteca

O banho seco foi ajustado para 96°C. O *reagent cartridge* foi deixado em água a temperatura ambiente. O *reagent cartridge* contém os reagentes utilizados no sequenciamento e também onde o *pool* de amostras é colocado. O *hybridization buffer* (HT1) foi deixado em a temperatura ambiente. Trinta microlitros de cada amostra foi misturado (*pool*) e transferido para um tubo tipo “Eppendorf”. Em outro tubo colocou-se 576 μL HT1 e adicionou-se 24 μL do *pool* de amostras. Essa mistura foi homogeneizada em agitador tipo “vortex”. Incubou-se a 96°C por 2 minutos. Inverteu-se o tubo 5 vezes e colocou-se em gelo com água por 5 minutos.

Colocou-se 600 µL do *pool* no *reagent cartridge* e levou-se para o sequenciador NextSeq[®] 500 (Illumina).

4.12.7 Análise dos dados gerados pelo sequenciamento

O *assembly* gerado a partir das *reads* das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas na Tabela 2 foi feito através do programa SPAdes (Nurk *et al.*, 2013).

A árvore filogenética foi gerada através do CFSAN SNP Pipeline (Davis *et al.*, 2015) baseada em uma matriz de *single nucleotide polymorphism* (SNP). O algoritmo GARLI (*Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference*) sob o critério de máxima verossimilhança foi utilizado para construir a árvore filogenética. Três linhagens foram incluídas na análise como *outgroups*: *Salmonella* Saintpaul CFSAN 000611, *Salmonella* Saintpaul CFSAN 000614 e *Salmonella* Heidelberg CFSAN000443 (Timme *et al.*, 2013).

4.12.8 Análise *in silico* de genes de resistência

Com os dados de sequenciamento do genoma completo, também foram pesquisados genes de resistência a antimicrobianos através do ResFinder *website* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (Zankari *et al.*, 2012).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Reconfirmação da pureza

As 119 linhagens listadas na Tabela 2 foram reconfirmadas como *Salmonella* spp. Todas as linhagens apresentaram os seguintes resultados nos diferentes meios:

- Ágar MacConkey: não fermentação da lactose;
- Ágar TSI: fermentação da glicose, produção de gás e H₂S;
- Ágar EPM: produção de gás e H₂S, não produção de urease, não desaminação do triptofano;
- Ágar MILi: móveis, descarboxilação da lisina, não produção de indol;
- Ágar Citrato de Simmons: metabolização do citrato.

5.2 Extração e verificação da pureza do DNA genômico

Todas as 119 linhagens de *S. Typhimurium* estudadas apresentaram pureza entre 1,70 e 1,9 e foram consideradas satisfatórias para utilização na pesquisa de genes de virulência por PCR, e nas técnicas de ERIC-PCR, MLVA, CRISPR-MVLST, MLST e sequenciamento do genoma completo.

5.3 Genes de virulência

Foram pesquisados 12 genes de virulência para as 119 linhagens de *S. Typhimurium* listadas na Tabela 2. A Tabela 10 traz de forma detalhada o resultado da presença dos genes de virulência. Todas as 119 linhagens apresentaram os genes *sipA*, *flgK*, *flgL* e *invA*. Todas as linhagens apresentaram o gene *sipD* com exceção de uma linhagem isolada de humano (STm20). Todas as linhagens apresentaram o gene *sopE2* com exceção de uma linhagem isolada de humano (STm02). Todas as linhagens apresentaram o gene *fljB* com exceção de duas linhagens, uma isolada de humano e outra isolada de alimento (STm28 e STm40). O gene *sopD* foi presente em 114 (95,8%) linhagens, o gene *sopB* em 111 (93,3%) linhagens, o gene *ssaR* em 102 (85,7%) linhagens, o gene *sifA* em 86 (72,3%) linhagens e 45 (37,8%) linhagens apresentaram o gene plasmidial *spvB*.

Tabela 10 – Frequência dos genes de virulência *sipA*, *flgK*, *flgL*, *invA*, *sipD*, *sopE2*, *fljB*, *sopD*, *sopB*, *ssaR*, *sifA*, e *spvB* em 119 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente do animal no Brasil

Genes	Número de linhagens positivas (%)				
	Total n=119	Humanos n=43	Alimentos n=49	Animais n=22	Ambiente do animal n=5
<i>sipA</i>	119 (100)	43	49	22	5
<i>flgK</i>	119 (100)	43	49	22	5
<i>flgL</i>	119 (100)	43	49	22	5
<i>invA</i>	119 (100)	43	49	22	5
<i>sipD</i>	118 (99,2)	42	49	22	5
<i>sopE2</i>	118 (99,2)	42	49	22	5
<i>fljB</i>	117 (98,3)	42	48	22	5
<i>sopD</i>	114 (95,8)	43	46	20	5
<i>sopB</i>	111 (93,3)	37	47	22	5
<i>ssaR</i>	102 (85,7)	41	40	18	3
<i>sifA</i>	86 (72,3)	43	36	6	1
<i>spvB</i>	45 (37,8)	28	16	0	1

5.4 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

De um total de 119 linhagens de *S. Typhimurium* (Tabela 2), 45 (37,8%) linhagens sendo 15 isoladas de humanos, 20 isoladas de alimentos, sete isoladas de animal e três isoladas do ambiente do animal foram susceptíveis a todos os 13 antimicrobianos testados. Setenta e quatro (62,2%) linhagens foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado (Tabela 12).

Os antimicrobianos com maior frequência de resistência nas linhagens estudadas foram a ampicilina (37,8%), o ácido nalidíxico (35,3%) e a tetraciclina (35,3%) (Tabela 11). Quarenta e cinco (37,8%) linhagens sendo 17 isoladas de humanos, 16 isoladas de alimentos, 10 isoladas de animal e duas isoladas do ambiente do animal apresentaram resistência a ampicilina. Quarenta e duas (35,3%) linhagens sendo 23 isoladas de humanos, 13 isoladas de alimentos, cinco isoladas de animal e uma isolada do ambiente do animal apresentaram resistência ao ácido nalidíxico. Ademais, 42 (35,3%) linhagens sendo quatro isoladas de humanos, 24 isoladas de alimentos, 12 isoladas de animal e duas isoladas do ambiente do animal apresentaram resistência a tetraciclina. Os resultados de resistência a cada antimicrobiano testado podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11 – Número de linhagens resistentes a cada antimicrobiano testado

Antimicrobianos	Número de linhagens resistentes (%)				
	Total n=119	Humanos n=43	Alimentos n=49	Animais n=22	Ambiente do animal n=5
AMP	45 (37,8)	17	16	10	2
NA	42 (35,3)	23	13	5	1
TET	42 (35,3)	4	24	12	2
SXT	34 (28,6)	19	7	7	1
C	29 (24,4)	14	5	9	1
CTX	3 (2,5)	0	3	0	0
FEP	3 (2,5)	0	3	0	0
AMC	2 (1,7)	2	0	0	0
LEV	2 (1,7)	0	1	1	0
CIP	2 (1,7)	0	1	1	0
ATM	2 (1,7)	0	2	0	0
FOX	0 (0)	0	0	0	0
CAZ	0 (0)	0	0	0	0

AMP = ampicilina; NA = ácido nalidíxico; TET = tetraciclina; SXT = sulfametoxazol-trimetropim; C = cloranfenicol; CTX = cefotaxima; FEP = cefepime; AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; LEV = levofloxacina; CIP = ciprofloxacina; ATM = aztreonam; FOX = cefoxitina; CAZ = ceftazidima.

Os perfis de resistência mais comuns entre as linhagens foram TET e AMP-NA-SXT-C. Dezesesseis (13,4%) linhagens apresentaram resistência somente a tetraciclina e 11 (9,2%) linhagens apresentaram resistência a AMP-NA-SXT-C. Trinta e seis (30,3%) linhagens foram multi-droga resistentes (MDR), ou seja, resistentes a três ou mais antimicrobianos de classes diferentes. Os resultados dos perfis de resistência podem ser visualizados na Tabela 12.

Tabela 12 – Perfil de resistência das 119 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente do animal

Perfil de resistência	Número de linhagens resistentes (%)				
	Total n=119	Humanos n=43	Alimentos n=49	Animais n=22	Ambiente do animal n=5
AMP-NA-LEV-SXT-C-CIP-TET	1 (0,8)	0	0	1	0
ATM-AMP-NA-LEV-SXT-CIP-TET	1 (0,8)	0	1	0	0
CTX-ATM-FEP-AMP-SXT-TET	1 (0,8)	0	1	0	0
AMC-AMP-NA-SXT-C	2 (1,7)	2	0	0	0
AMP-NA-SXT-C-TET	5 (4,2)	0	2	2	1
AMP-NA-C-TET	2 (1,7)	0	2	0	0
AMP-SXT-C-TET	2 (1,7)	0	1	1	0
AMP-NA-SXT-TET	1 (0,8)	0	1	0	0
AMP-NA-SXT-C	11 (9,2)	10	0	1	0
NA-SXT-C-TET	1 (0,8)	1	0	0	0
NA-SXT-TET	1 (0,8)	0	0	1	0
AMP-C-TET	2 (1,7)	0	0	2	0
AMP-SXT-C	1 (0,8)	0	0	1	0
AMP-NA-SXT	2 (1,7)	2	0	0	0
AMP-NA-TET	2 (1,7)	0	2	0	0
CTX-FEP-AMP	2 (1,7)	0	2	0	0
AMP-SXT-TET	1 (0,8)	0	1	0	0
NA-SXT	3 (2,5)	3	0	0	0
NA-C	1 (0,8)	1	0	0	0
AMP-NA	2 (1,7)	1	1	0	0
AMP-SXT	1 (0,8)	1	0	0	0
AMP-TET	4 (3,4)	0	2	1	1
NA-TET	2 (1,7)	0	2	0	0
AMP-C	1 (0,8)	0	0	1	0
AMP	1 (0,8)	1	0	0	0
NA	5 (4,2)	3	2	0	0
TET	16 (13,4)	3	9	4	0
Total de linhagens resistentes	74 (62,2)	28	29	15	2

Obs.: 45 (37,8%) linhagens foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. CTX = cefotaxima; FOX = cefoxitina; CAZ = ceftazidima; ATM = aztreonam; FEP = cefepime; AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; AMP = ampicilina; NA = ácido nalidíxico; LEV = levofloxacina; SXT = sulfametoxazol-trimetropim; C = cloranfenicol; CIP = ciprofloxacina; TET = tetraciclina.

5.5 PFGE – Humanos e alimentos

A Figura 1 traz um gel representativo de uma eletroforese em campo pulsado, após clivagem do DNA genômico com a enzima de restrição *Xba*I para a visualização dos fragmentos de restrição de algumas linhagens de *Salmonella* Typhimurium estudadas.

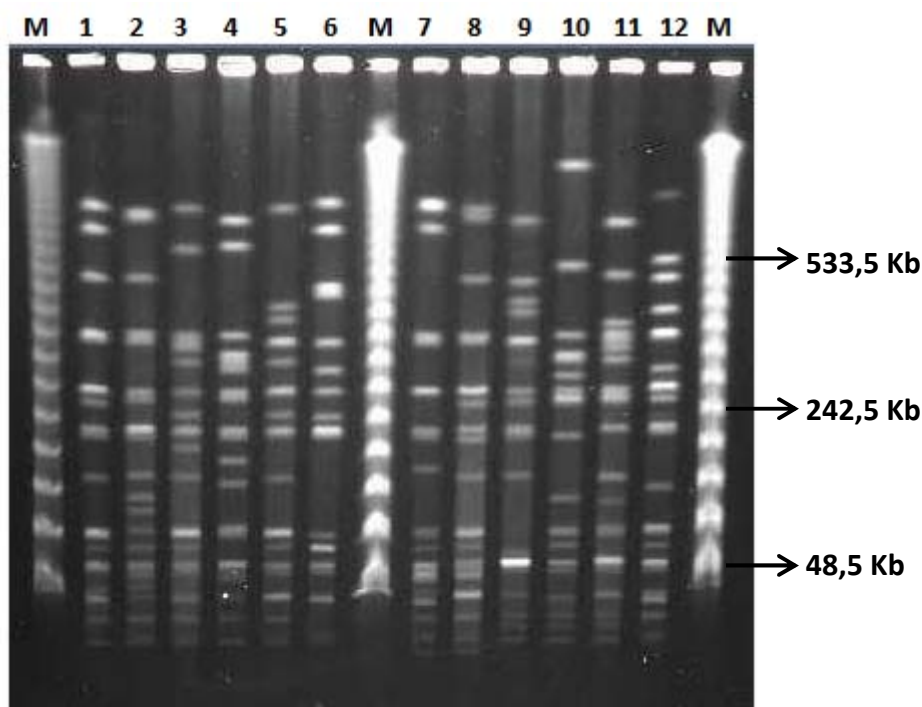


Figura 1 – Gel de agarose 1% representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de *Salmonella* Typhimurium estudadas digeridas com a enzima *Xba*I. M: marcador de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker - New England). Canaletas de 1 a 10, linhagens representativas de *Salmonella* Typhimurium estudadas: STm01 (1), STm02 (2), STm03 (3), STm04 (4), STm05 (5), STm06 (6), STm07 (7), STm08 (8), STm09 (9), STm10 (10), STm11 (11), STm12 (12).

A Figura 2 é o dendrograma de similaridade genotípica gerado pela análise do perfil de bandas resolvidas por PFGE após digestão com a enzima *Xba*I do DNA genômico de 92 linhagens de *S. Typhimurium*, sendo 43 linhagens isoladas de fezes de humanos e 49 linhagens isoladas de alimentos diversos listadas na Tabela 2. As linhagens foram agrupadas em dois grupos, denominados PFGE-A e PFGE-B, sendo esse último subdividido nos subgrupos PFGE-B1 e PFGE-B2. No grupo PFGE-A foram alocadas nove (9,8%) linhagens com similaridade acima de 62,4% entre si, destas oito foram isoladas de alimentos entre 1999 a 2009 e apenas uma linhagem isolada de fezes de humanos (STm04) em 1983. No grupo PFGE-B, ficaram agrupadas 83 (90,2%) linhagens, com similaridade acima de 60% entre si.

Especificamente, no subgrupo PFGE-B1 foram alocadas um total de 62 (67,4%) linhagens, sendo 22 isoladas de humanos, entre 1983 a 2010 e 40 (43,5%) linhagens isoladas de diversos alimentos entre 1995 e 2013, com similaridade superior a 61,2% entre si. No subgrupo PFGE-B2, foram agrupadas 21 (22,8%) linhagens isoladas de humanos entre 1983 a 1991, com similaridade superior a 61,8% entre si. Entre os grupos PFGE-A e PFGE-B a similaridade foi de 37,1%. A metodologia de PFGE diferiu as linhagens em 72 PFGE-tipos. O índice de discriminação para a metodologia PFGE, comparando os isolados de humanos e alimentos, foi de 0,993.

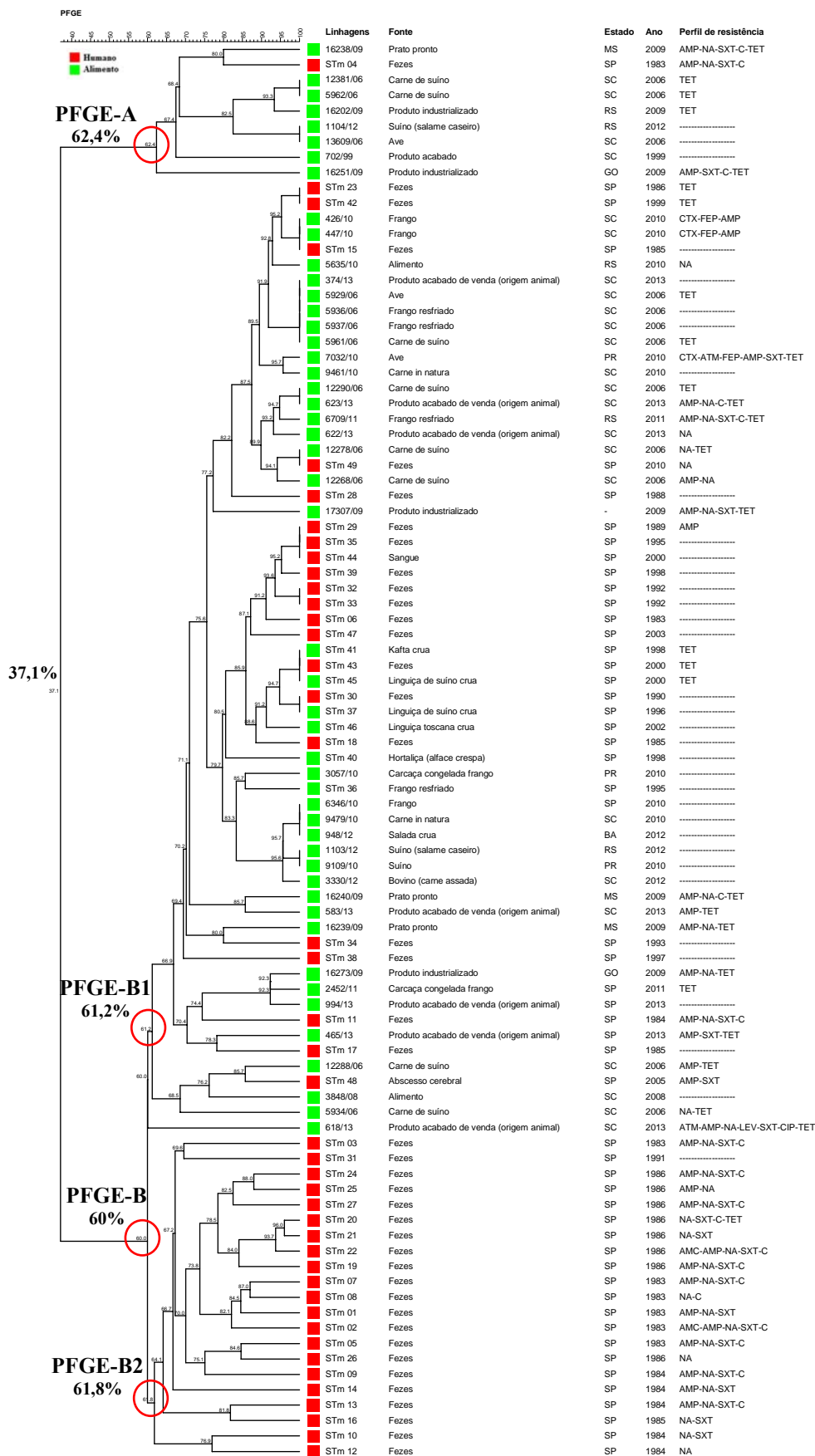


Figura 2 – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por PFGE para 92 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43) e alimentos (49).

5.6 ERIC-PCR – Humanos e alimentos

A Figura 3 traz um gel representativo de uma eletroforese em gel de agarose 1,5% para visualização dos produtos de PCR gerados pelo ensaio de ERIC-PCR para algumas das linhagens de *Salmonella* Typhimurium estudadas.

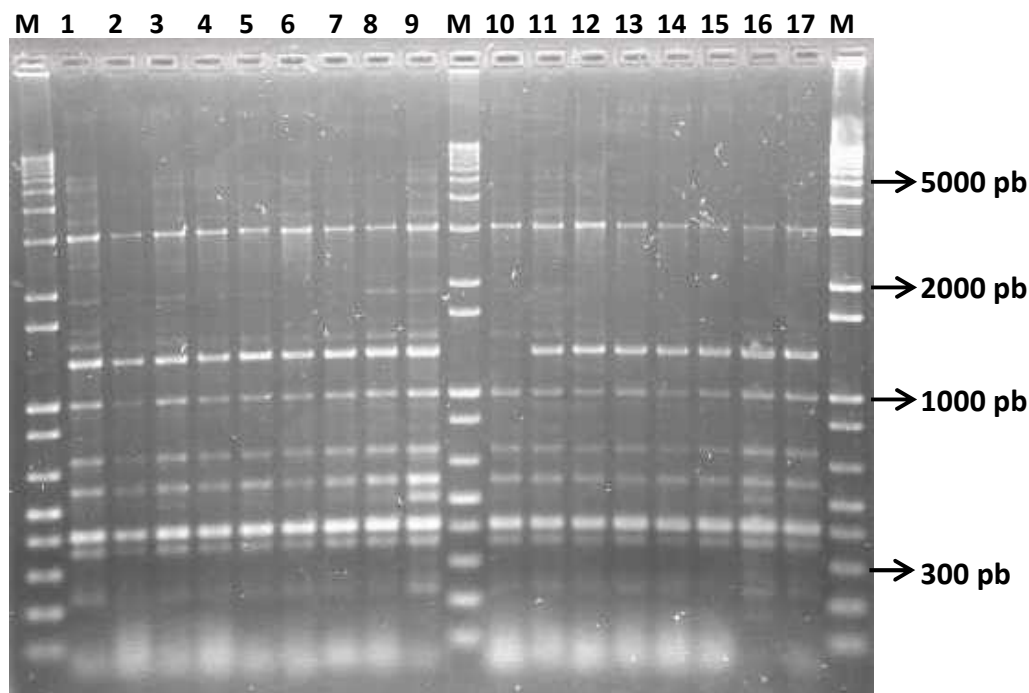


Figura 3 – Gel representativo dos produtos de amplificação das sequências ERIC seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaletas de 1 a 16, linhagens representativas de *Salmonella* Typhimurium estudadas: STm18 (1), STm19 (2), STm20 (3), STm21 (4), STm22 (5), STm23 (6), STm24 (7), STm25 (8), STm26 (9), STm27 (10), STm28 (11), STm29 (12), STm30 (13), STm31 (14), STm32 (15), STm33 (16), STm34 (17).

A Figura 4 é o dendrograma de similaridade genotípica gerado pela análise do perfil de bandas resolvidas por ERIC-PCR do DNA genômico de 92 linhagens de *S. Typhimurium*, sendo 43 linhagens isoladas de fezes de humanos e 49 linhagens isoladas de alimentos diversos listadas na Tabela 2. As linhagens foram agrupadas em dois grupos, denominados ERIC-A e ERIC-B. No grupo ERIC-A foram alocadas 78 (84,8%) linhagens com similaridade acima de 80,4% entre si, destas 33 foram isoladas de humanos entre 1983 a 2010 e 45 foram isoladas de alimentos entre 1998 a 2013. No grupo ERIC-B, ficaram agrupadas 13 (14,1%) linhagens, sendo 10 isoladas de humanos, entre 1985 a 1995 e três linhagens isoladas de alimentos diversos entre 1995 e 2006, com similaridade superior a 81,3% entre si. Entre os grupos ERIC-A e ERIC-B a similaridade foi de 71,3%. Apenas uma única linhagem

(5961/06) isolada de alimento em 2006 não se agrupou a nenhum grupo e apresentou uma similaridade superior a 57,7% em relação às outras linhagens. A metodologia de ERIC-PCR diferiu as linhagens em 63 ERIC-tipos. O índice de discriminação para a metodologia de ERIC-PCR, comparando os isolados de humanos e alimentos, foi de 0,983.

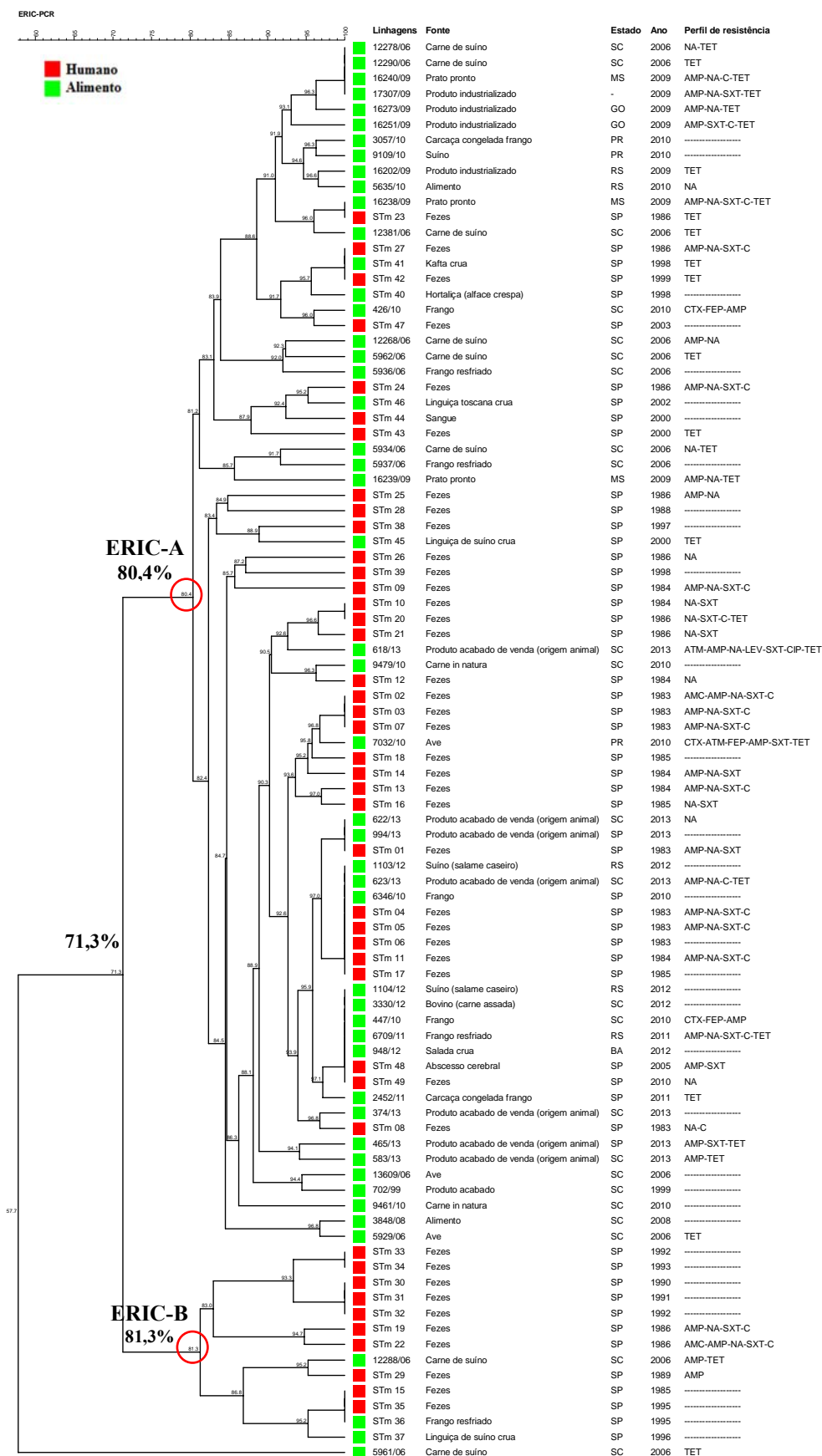


Figura 4 – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por ERIC-PCR para 92 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43) e alimentos (49).

5.7 MLVA – Humanos e alimentos

O dendrograma de similaridade genotípica agrupou as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos (Tabela 2) em dois grupos denominados MLVA-A e MLVA-B (Figura 5). No grupo MLVA-A, ficaram agrupadas 11 (12%) linhagens, sendo sete isoladas de alimentos, entre 1995 a 2012, e quatro linhagens isoladas de humanos entre 1983 a 1997 com similaridade superior a 2,9% entre si. No grupo MLVA-B, ficaram agrupadas 81 (88%) linhagens com similaridade superior a 4,8% e que foram subdivididas em MLVA-B1 e MLVA-B2. Especificamente, no subgrupo MLVA-B1 foram alocadas 41 (44,6%) linhagens, sendo 32 linhagens isoladas de humanos entre 1983 a 2003 e nove isoladas de alimentos entre 1996 a 2012, com similaridade acima de 19,7% entre si. No subgrupo MLVA-B2 foram alocadas 40 (43,4%) linhagens, sendo 33 isoladas de alimentos entre 1998 e 2013 e sete isoladas de humanos entre 1985 a 2010, exibindo uma similaridade maior que 23,6%. Entre os grupos MLVA-A e MLVA-B a similaridade foi de 1,3%. A metodologia de MLVA diferiu as linhagens em 53 MLVA-tipos. O índice de discriminação para a metodologia MLVA, comparando os isolados de humanos e alimentos, foi de 0,976.

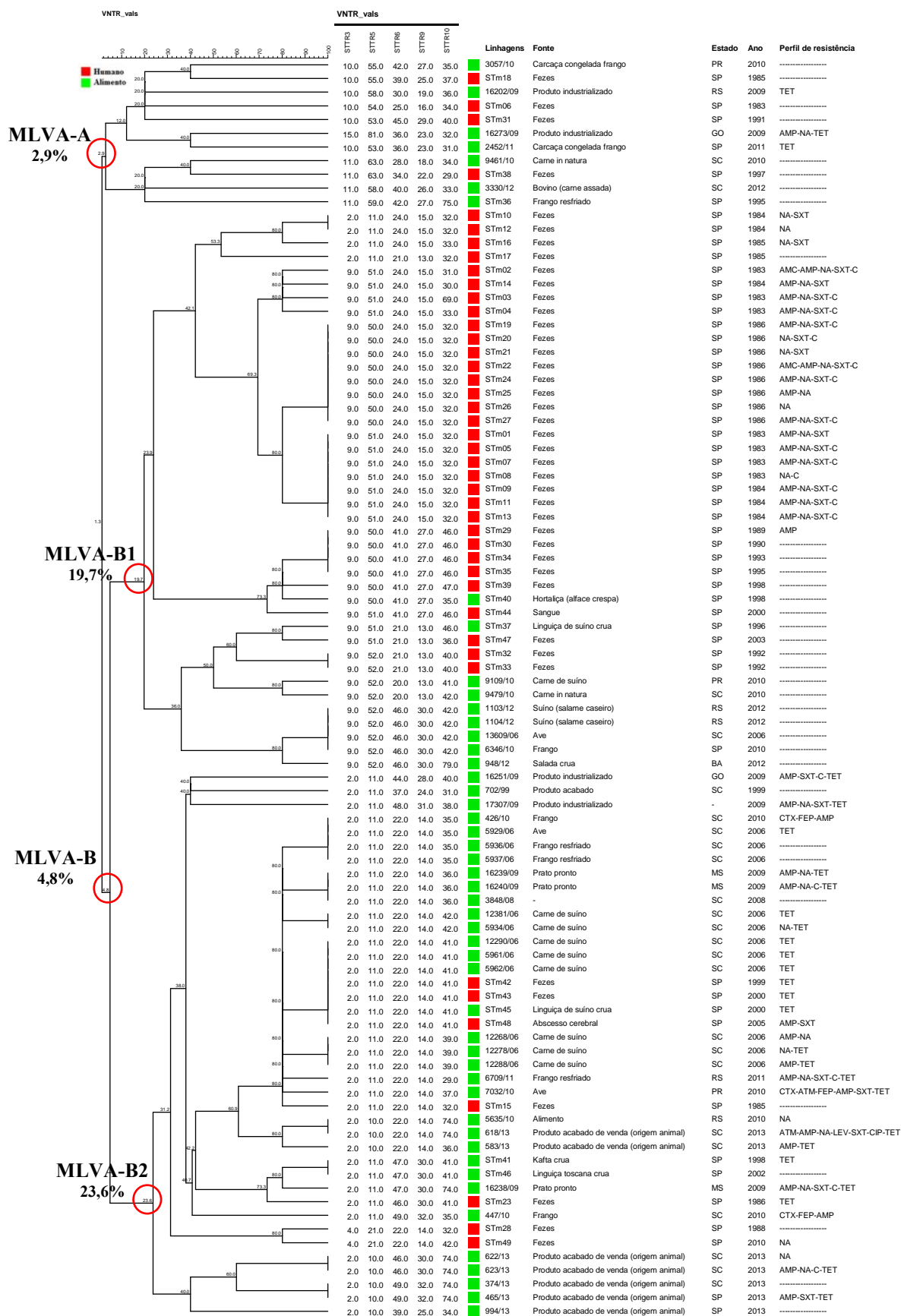


Figura 5 – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA de 92 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43) e alimentos (49).

5.8 PFGE – Humanos, animais e ambiente do animal

A Figura 6 é o dendrograma de similaridade genotípica gerado pela análise do perfil de bandas resolvidas por PFGE após digestão com a enzima *XbaI* do DNA genômico de 70 linhagens de *S. Typhimurium*, sendo 43 linhagens isoladas de fezes de humanos, 27 linhagens isoladas de suínos (22) e do ambiente de suínos (5) listadas na Tabela 2. As linhagens foram agrupadas em dois grupos, denominados PFGE-C e PFGE-D, sendo o PFGE-D subdividido nos subgrupos PFGE-D1 e PFGE-D2. No grupo PFGE-C foram alocadas nove (12,9%) linhagens com similaridade acima de 58,2% entre si, destas oito foram isoladas de suínos entre 2003 a 2012 e, apenas uma linhagem isolada de ambiente de suínos em 2011. No grupo PFGE-D, ficaram agrupadas 61 (87,1%) linhagens. Especificamente, no subgrupo PFGE-D1 foram alocadas um total de 22 (31,4%) linhagens isoladas de humanos, entre 1983 a 1986, com similaridade superior a 61,0% entre si. No subgrupo PFGE-D2, foram agrupadas 39 (55,7%) sendo 14 (20,0%) linhagens isoladas de suíno e quatro (5,7%) linhagens isoladas do ambiente de suínos entre 2000 e 2012 e 21 (30,0%) linhagens isoladas de humanos entre 1983 a 2010 e com similaridade superior a 66,8% entre si. A similaridade acima de 60,3% foi observada entre os subgrupos PFGE-D1 e PFGE-D2. A similaridade entre PFGE-C e PFGE-D foi de 55,0%. A metodologia de PFGE diferiu as linhagens em 62 PFGE-tipos. O índice de discriminação para a metodologia PFGE, comparando os isolados de humanos, animais e ambiente do animal, foi de 0,996.

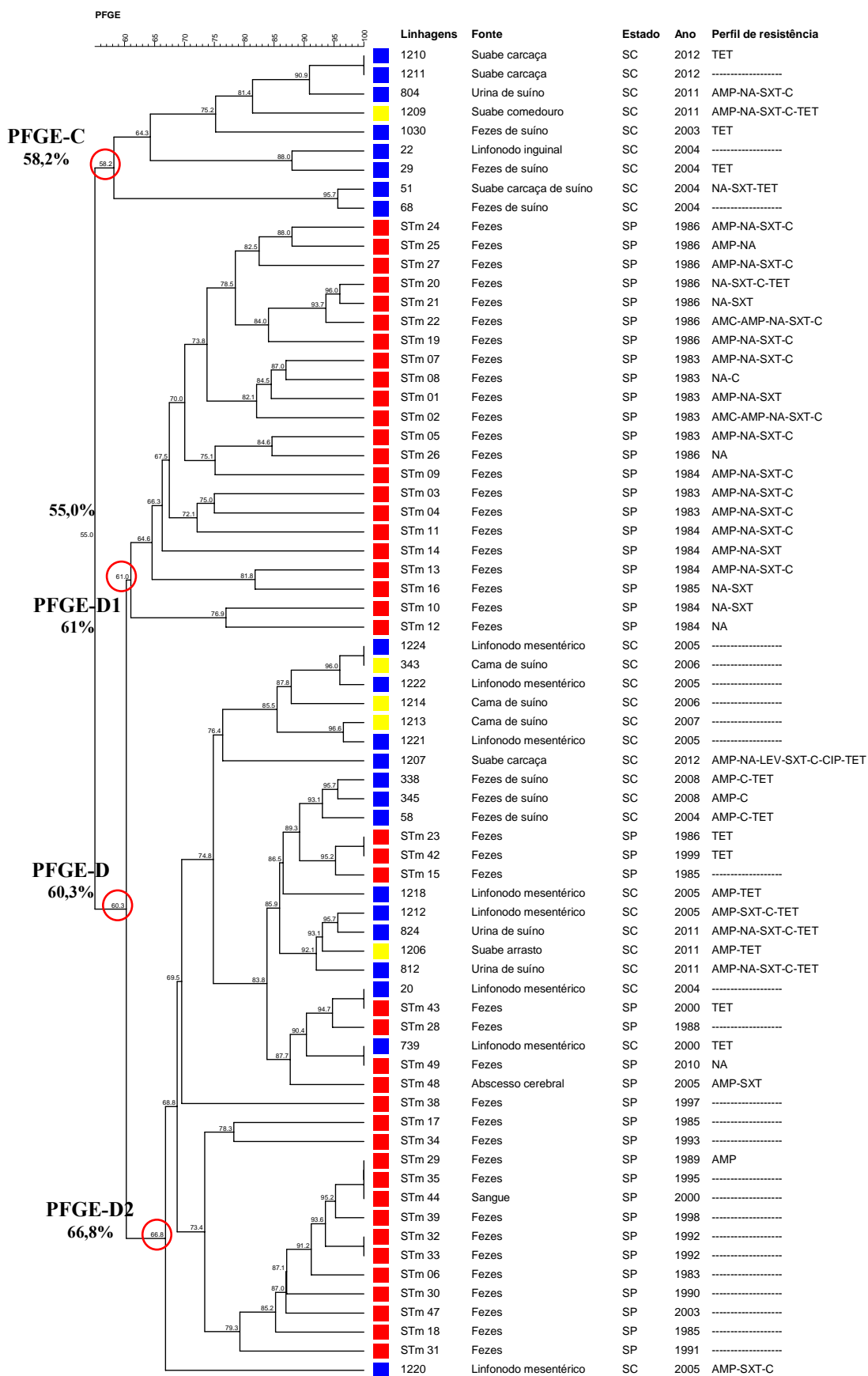


Figura 6 – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por PFGE para 70 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43), de suínos (22) e ambiente do suíno (5).

5.9 ERIC-PCR – Humanos, animais e ambiente do animal

A Figura 7 é o dendrograma de similaridade genotípica gerado pela análise do perfil de bandas resolvidas por ERIC-PCR do DNA genômico de 70 linhagens de *S. Typhimurium*, sendo 43 linhagens isoladas de fezes de humanos, 22 linhagens isoladas de suínos e cinco linhagens isoladas do ambiente de suínos listadas na Tabela 2. As linhagens foram agrupadas em dois grupos, denominados ERIC-C e ERIC-D, sendo o ERIC-C subdividido nos subgrupos ERIC-C1 e ERIC-C2. No grupo ERIC-C foram alocadas 68 (97,1%) linhagens com similaridade acima de 69,3% entre si. Especificamente, no subgrupo ERIC-C1 ficaram alocadas um total de 58 (82,9%) linhagens, sendo 20 (28,6%) linhagens isoladas de suínos, cinco (7,1%) linhagens isoladas do ambiente de suínos entre 2000 a 2012 e 33 (47,1%) linhagens isoladas de humanos entre 1983 a 2010, com similaridade superior a 72,3% entre si. No subgrupo ERIC-C2 foram agrupadas 10 (14,3%) isoladas de humanos, entre 1985 a 1995, com similaridade superior a 81,7% entre si. No grupo ERIC-D ficaram agrupadas duas (2,9%) linhagens isoladas de suínos em 2004, com similaridade superior a 76,2% entre si. A similaridade entre os grupos ERIC-C e ERIC-D foi de 60,7%. A metodologia de ERIC-PCR diferiu as linhagens em 50 ERIC-tipos. O índice de discriminação para a metodologia ERIC-PCR, comparando os isolados de humanos, animais e ambiente do animal, foi de 0,983.

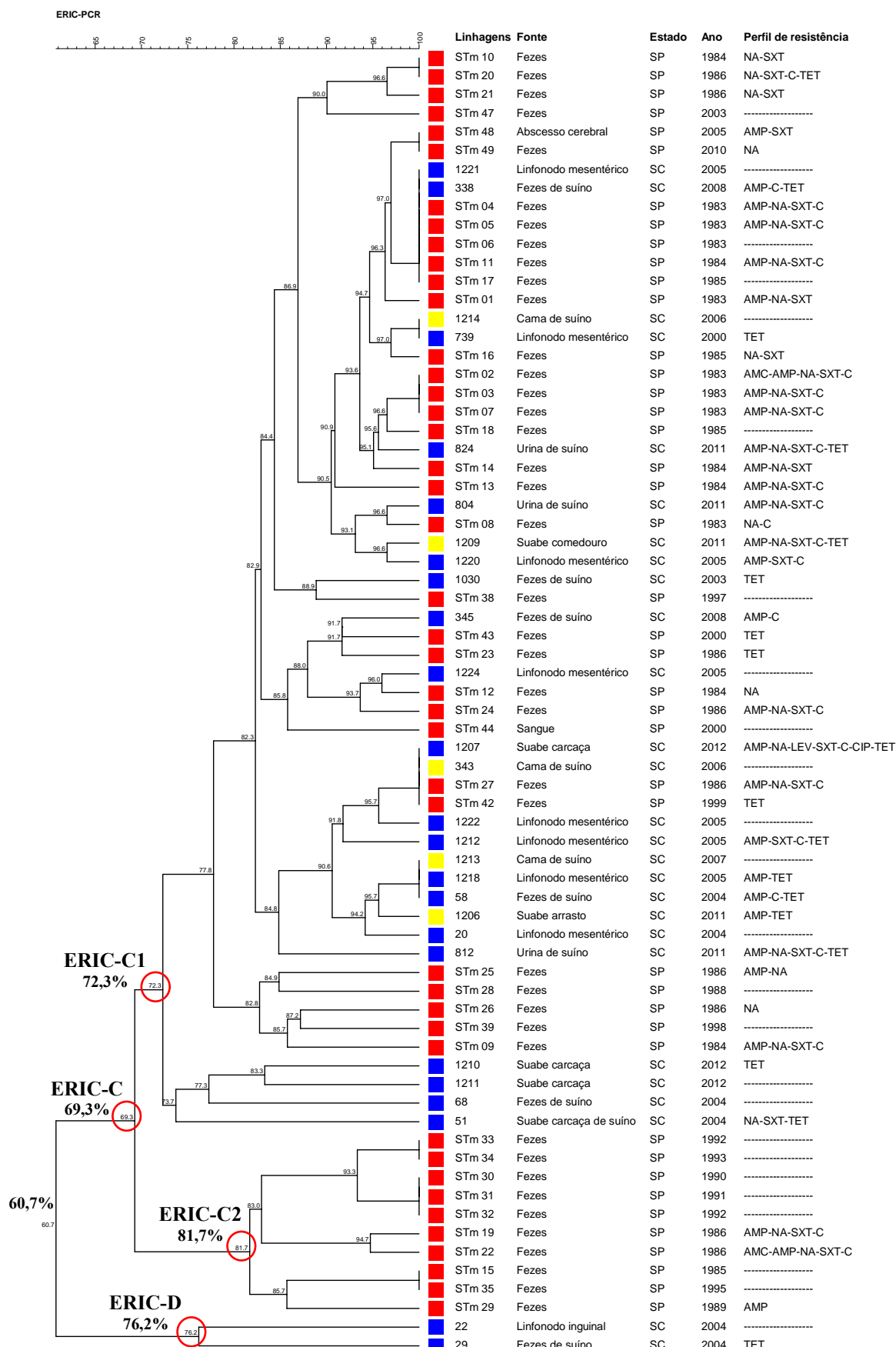


Figura 7 – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do perfil de bandas obtido por ERIC-PCR para 70 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43), de suínos (22) e ambiente do suíno (5).

5.10 MLVA – Humanos, suínos e ambiente do suíno

O dendrograma de similaridade genotípica agrupou as 70 linhagens de *S. Typhimurium*, sendo 43 linhagens isoladas de fezes de humanos, 22 linhagens isoladas de suínos e cinco linhagens isoladas do ambiente de suínos listadas na Tabela 2 em dois grupos denominados MLVA-C e MLVA-D, sendo o MLVA-C subdividido nos subgrupos MLVA-C1 e MLVA-C2 (Figura 8). No grupo MLVA-C, ficaram agrupadas 65 linhagens (92,9%), com similaridade superior a 3,7% entre si. Especificamente, no grupo MLVA-C1 foram agrupadas 37 (52,9%) linhagens, sendo 20 (28,6%) linhagens isoladas de suíno e cinco (7,1%) linhagens do ambiente de suínos entre 2000 e 2012 e 12 (17,1%) isoladas de humanos entre 1984 a 2010 e, com similaridade superior a 8,5% entre si. Já no grupo MLVA-C2 foram agrupadas 28 (40,0%) linhagens todas isoladas de humanos no período de 1983 a 2003, com similaridade superior a 23,2% entre si. No grupo MLVA-D, ficaram agrupadas quatro (5,7%) linhagens, dessas duas foram isoladas de humanos em 1983 e 1985 e duas de suínos em 2012, com similaridade superior a 6,7%. Finalmente, apenas uma linhagem (STm38) isolada de fezes humanas em 1997 não se agrupou a nenhum grupo. A metodologia de MLVA diferiu as linhagens em 36 MLVA- tipos. O índice de discriminação para a metodologia MLVA, comparando os isolados de humanos, animais e ambiente do animal foi de 0,957.

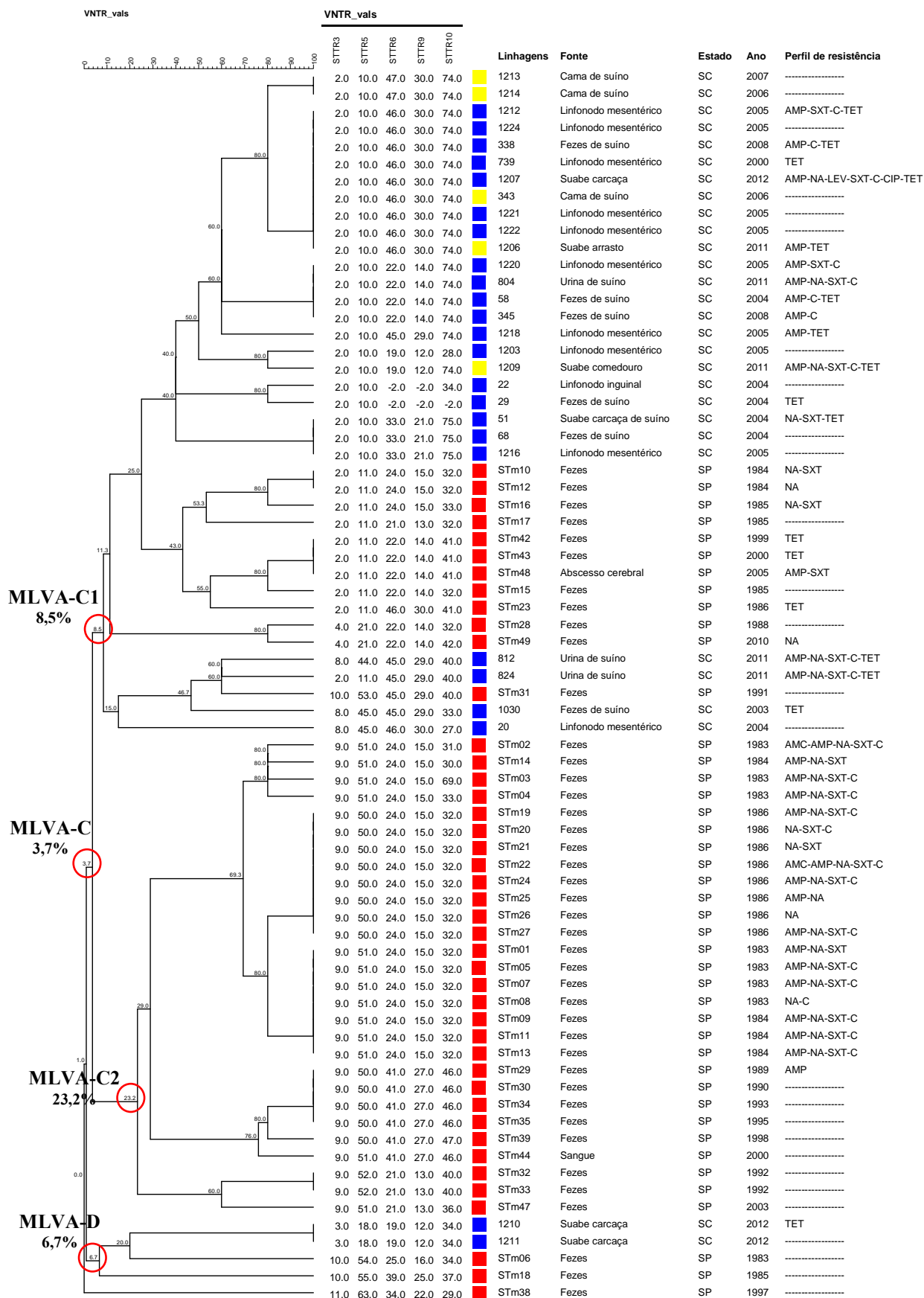


Figura 8 – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir do número de repetições dos VNTRs pela técnica de MLVA de 70 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43), suínos (22) e ambiente do suíno (5).

5.11 CRISPR-MVLST – Humanos e alimentos

5.11.1 Análise dos genes *fimH* e *sseL*

O sequenciamento dos genes *fimH* e *sseL* foi realizado para as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas da Tabela 2. Para o gene *fimH* foram encontradas apenas dois tipos de sequências nas linhagens estudadas: uma sequência 100% similar à sequência utilizada como modelo de *Salmonella Typhimurium* LT2 e outra sequência com um SNP (*single nucleotide polymorphism*), um T (tirosina) no lugar de um A (adenosina) na posição 469. Para o gene *sseL* foram encontradas três tipos de sequências nas linhagens estudadas: uma sequência 100% similar à sequência modelo de *Salmonella Typhimurium* LT2; uma sequência com um SNP, um T no lugar de um A na posição 151; e uma terceira sequência com um SNP, um G (guanina) no lugar de um A na posição 314. Importante mencionar que as linhagens que apresentaram SNP em suas sequências, apresentaram apenas um único SNP por gene/sequência.

5.11.2 Análise dos espaçadores de CRISPR

Os espaçadores dos dois *loci* CRISPR foram analisados a partir do sequenciamento do genoma completo das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas da Tabela 2.

No *locus* CRISPR1 (C1) foram encontrados 30 espaçadores diferentes. Os espaçadores variaram de tamanho de 32 a 33 pb. No *locus* C1 não houve duplicação de nenhum espaçador.

No *locus* CRISPR2 (C2) foram encontrados 37 espaçadores diferentes. Todos os espaçadores apresentaram 32 pb cada, com exceção de um espaçador de 33 pb. No *locus* C2, uma linhagem isolada de alimento (16239/09) apresentou duplicação de três espaçadores diferentes e outra linhagem também isolada de alimento (6346/10) apresentou duplicação de um espaçador.

5.11.3 Dendrogramas gerados com os dados de CRISPR-MVLST

A Figura 9 é o dendrograma de similaridade genotípica gerado pela análise dos espaçadores dos dois *loci* CRISPR das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas da Tabela 2. As 92 linhagens foram agrupadas em dois grupos denominados E e F sendo o E subdividido em E1 e E2. O grupo E apresentou similaridade

genotípica acima de 58,6% entre as linhagens. Especificamente, no subgrupo E1 ficaram agrupadas seis linhagens, sendo cinco linhagens isoladas de alimentos entre 1999 e 2013 e apenas uma linhagem isolada de humanos em 1985, com similaridade genotípica superior a 68,6%. No subgrupo E2 ficaram alocadas 35 linhagens, sendo 28 linhagens isoladas de alimentos entre 1998 e 2013 e sete linhagens isoladas de humanos entre 1985 e 2010, com similaridade genotípica superior a 79,4%. No grupo F ficaram agrupadas 57 linhagens sendo 35 linhagens isoladas de humanos entre 1983 e 2003 e 16 linhagens isoladas de alimentos entre 1995 e 2013, com similaridade genotípica superior a 62,7%. A análise baseada somente nos espaçadores de CRISPR diferiu as linhagens em 35 perfis. O índice de discriminação foi de 0,906.

A Figura 10 é o dendrograma de similaridade genotípica gerado pela análise dos espaçadores dos dois *loci* CRISPR e também das sequências dos genes *fimH* e *sseL* das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas da Tabela 2. O dendrograma dividiu as 92 linhagens em dois grupos denominados G e H, sendo que o grupo G foi subdividido em G1 e G2. O grupo G apresentou uma similaridade genotípica superior a 98,2%. Especificamente, no subgrupo G1 ficaram agrupadas cinco linhagens, sendo quatro linhagens isoladas de alimentos entre 1999 e 2013 e apenas uma linhagem isolada de humano em 1985, com similaridade genotípica superior a 98,8%. No subgrupo G2 ficaram alocadas 64 linhagens, sendo 45 linhagens isoladas de alimentos entre 1995 e 2013 e 19 linhagens isoladas de humanos entre 1985 e 2010, com similaridade genotípica superior a 98,3%. No grupo H ficaram alocadas 23 linhagens, todas isoladas de humanos entre 1983 e 1986, com similaridade genotípica superior a 98,5%. A análise baseada nos espaçadores de CRISPR com os genes *fimH* e *sseL* diferiu as linhagens em 35 perfis. O índice de discriminação foi o mesmo encontrado na análise acima, de 0,906.

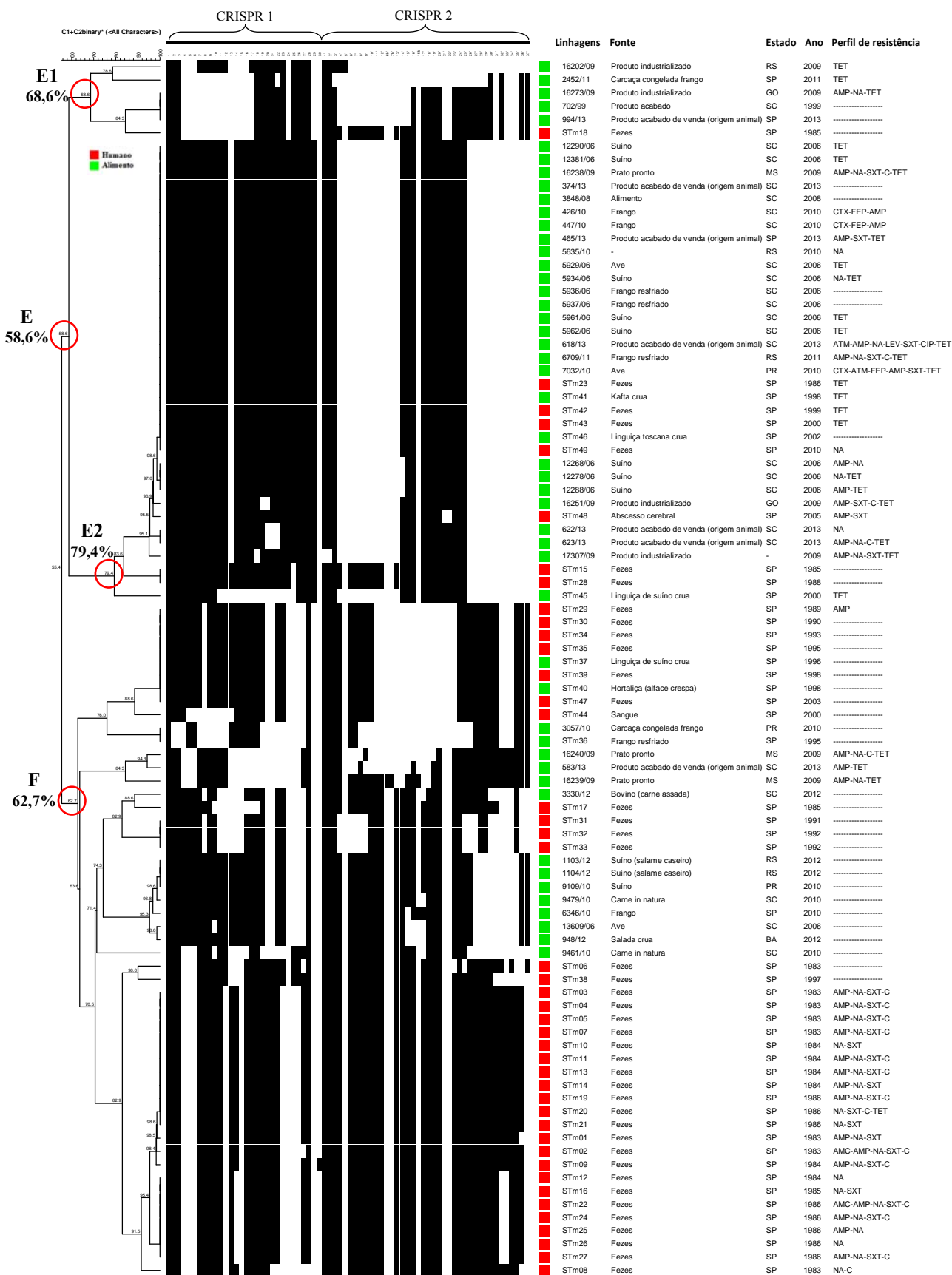


Figura 9 – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir da análise dos espaçadores de CRISPR 1 e 2 de 92 linhagens de *Salmonella Typhimurium* isoladas de humanos (43) e alimentos (49). Em preto, representa a presença dos espaçadores em cada linhagem nos CRISPR 1 e 2.

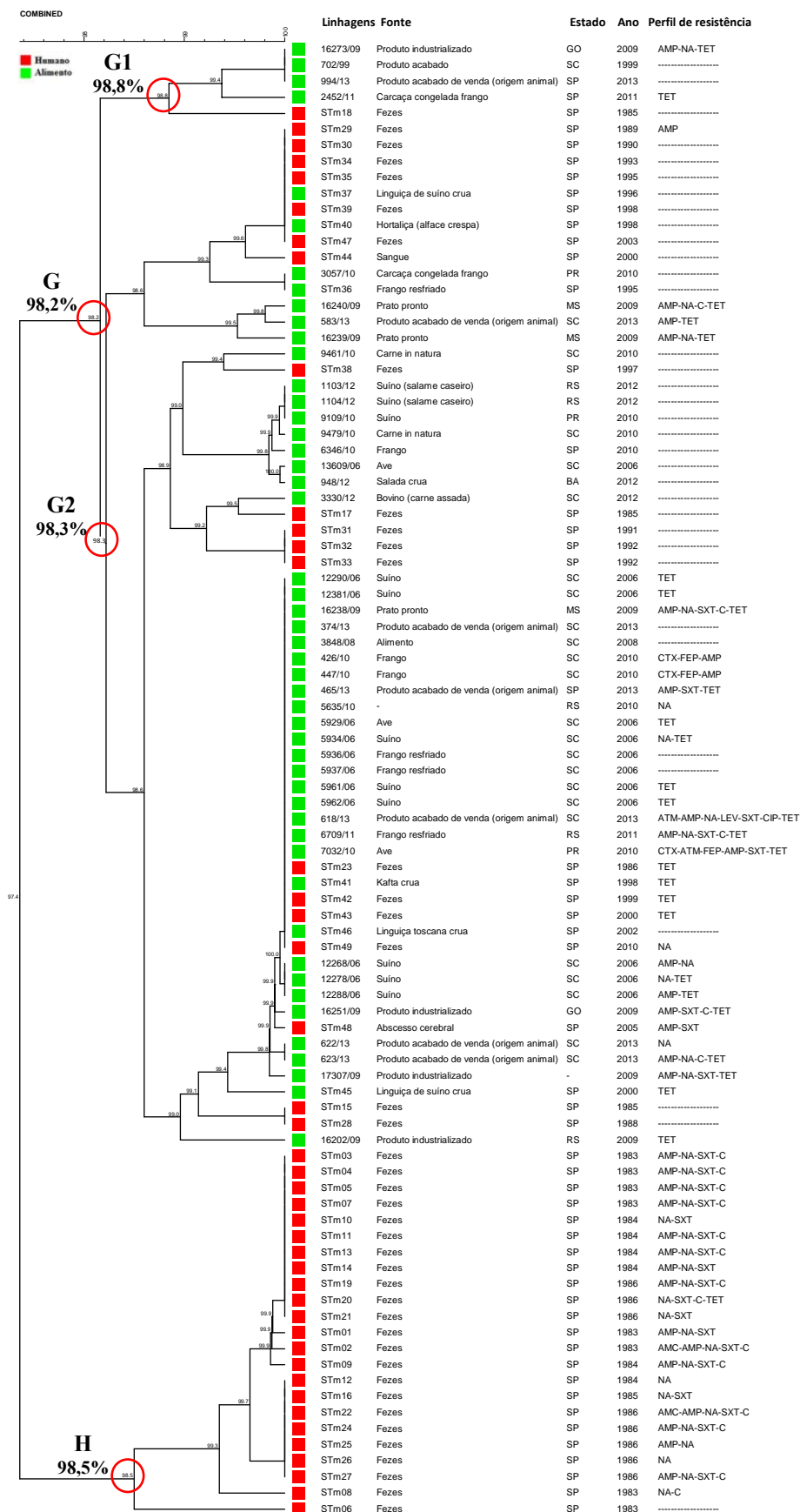


Figura 10 – Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir da análise dos espaçadores de CRISPR 1 e 2 e das sequências dos genes *fimH* e *sseL* de 92 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos (43) e alimentos (49).

5.12 MLST – Humanos e alimentos

A metodologia de MLST foi realizada para as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas na Tabela 2. Setenta e sete (83,7%) linhagens, sendo 45 isoladas de alimentos e 32 isoladas de humanos, apresentaram o ST19 (Tabela 13). Nove (9,8%) linhagens, sendo sete isoladas de humanos e duas isoladas de alimentos apresentaram o ST313. Duas (2,2%) linhagens isoladas de alimentos apresentaram o ST1921. Uma (1,1%) linhagem isolada de humano apresentou o ST1649. Finalmente, três (3,3%) linhagens apresentaram o ST desconhecido ou ainda não identificado. O ST19 foi o ST mais prevalente entre as linhagens. Os STs 313, 1921 e 1649 apresentaram apenas um alelo diferente em relação ao ST19 (Tabela 13).

A Figura 11 é o diagrama de similaridade genética gerado com os STs das 89 linhagens de *S. Typhimurium* desse estudo tipadas e 1240 linhagens de *S. Typhimurium* cadastradas no banco de dados de MLST *S. enterica*, até Dezembro de 2015. O ST19 é o ST central do complexo clonal, que contém o maior número de linhagens, possui 33 STs *single locus variant* (SLV), sendo o ST34 e o ST313 considerados subgrupos centrais. O ST34 é o segundo de maior prevalência e o ST313 é o terceiro de maior prevalência entre as linhagens de *S. Typhimurium*. O ST36 também apresenta uma grande prevalência entre as linhagens de *S. Typhimurium*, entretanto ainda não possui nenhuma relação filogenética com o complexo clonal 19, o que também foi observado para o ST513. Há 14 STs que ainda não apresentam qualquer relação filogenética com os demais, são os STs isolados na Figura 11.

Tabela 13 – STs e alelos encontrados para as 92 linhagens de *S. Typhimurium* estudadas por MLST

ST	MLST							Número de linhagens (%)		
	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>	Total n=92	Humanos n=43	Alimentos n=46
19	10	7	12	9	5	9	2	77 (83,7)	32	45
313	10	7	12	9	112	9	2	9 (9,8)	7	2
1921	10	432	12	9	5	9	2	2 (2,2)	0	2
1649	10	7	12	518	5	9	2	1 (1,1)	1	0
-	-	7	12	9	5	9	2	1 (1,1)	1	0
-	10	7	12	-	5	9	2	2 (2,2)	2	0

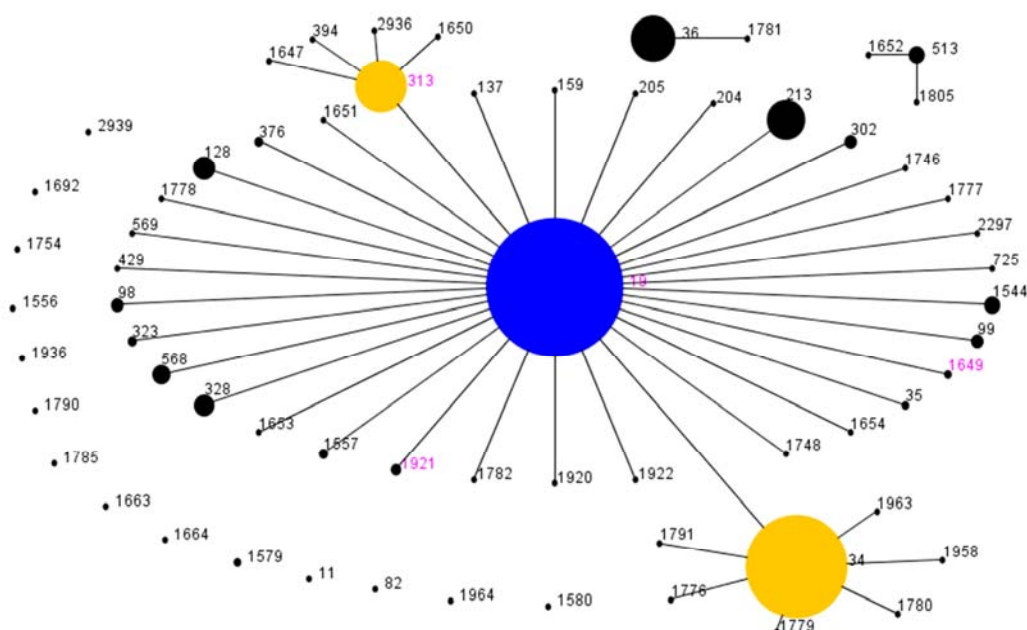


Figura 11 – Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com os dados de 89 linhagens de *S. Typhimurium* estudadas e 1240 linhagens de *S. Typhimurium* disponíveis no banco de dados. Em rosa, ST encontrado nas linhagens de *S. Typhimurium* estudadas e disponíveis no banco de dados; azul, STs centrais de complexos clonais; amarelo, são subgrupos centrais; preto, demais linhagens de *S. Typhimurium*. O tamanho das esferas é proporcional à quantidade de linhagens.

5.13 Sequenciamento do genoma completo – Humanos e alimentos

Foram sequenciadas 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas na Tabela 2. O tamanho do genoma variou de 4,6 Mb a 5,2 Mb. A média do conteúdo de C+G mol% foi de 52,05%. O número de *contigs* por *assembly* para cada linhagem variou de 47 a 286.

Os *assemblies* foram utilizados para a pesquisa *in silico* dos genes de resistência. As classes dos antimicrobianos que apresentaram resistência estão apresentados na Figura 12.

A Figura 12 é árvore filogenética baseada na análise dos SNPs encontrados nos genomas das 92 linhagens de *S. Typhimurium* e três outras linhagens, uma linhagem de *S. Heidelberg* e duas linhagens de *S. Saintpaul*, que foram incluídas na análise como *outgroup*. Os números sob os ramos indicam os valores de *bootstrap*. A árvore foi dividida em dois grupos, denominados de I e J. No grupo I ficaram agrupadas 35 (38%) linhagens, sendo 28 linhagens isoladas de alimentos entre 1998 a 2013 e sete linhagens isoladas de humanos entre 1985 a 2010. No grupo J ficaram agrupadas 57 (62%) linhagens, sendo 36 linhagens isoladas de humanos entre 1983 e 2003 e 21 linhagens isoladas de alimentos entre 1995 a 2013.



Figura 12 – Árvore filogenética baseada na análise dos SNPs encontrados nos genomas das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos (43) e alimentos (49) correlacionado com a resistência a antimicrobianos. AMG: aminoglicosídeo; BETA: beta-lactâmico; FLU: fluoroquinolona; PHE: fenicol; SUL: sulfonamida; TET: tetraciclina; TRI: trimetoprima; MLS: macrolídeo.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A *Salmonella* é um dos principais agentes bacterianos causador de doenças de origem alimentar no Brasil e em diversos locais do mundo (Hendriksen *et al.*, 2011; CDC, 2015a; EFSA, 2015). Especificamente, a sorovariedade Typhimurium foi reportada como a segunda sorovariedade de *Salmonella* mais isolada no país (Tavechio *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2006; SVS, 2015).

No Brasil, há poucos trabalhos publicados em que metodologias moleculares foram utilizadas para tipar linhagens de *S. Typhimurium*. (Ghilardi, Tavechio e Fernandes, 2006; Bessa *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2009; Tavechio *et al.*, 2009; Kich *et al.*, 2011; Palhares *et al.*, 2014). Alguns trabalhos relataram o perfil de resistência a antimicrobianos de linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de diversas fontes no Brasil (Bessa *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2009; Dos Reis *et al.*, 2011; Kich *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013; Palhares *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2015). Em relação ao perfil de genes de virulência em *S. Typhimurium* isoladas no país, poucos trabalhos são encontrados na literatura (Rowlands *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2015).

Até o momento, pouco se sabe sobre a diversidade genotípica, potencial patogênico e resistência a antimicrobianos de linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de fontes diversas durante três década em diferentes Estados do Brasil (Almeida *et al.*, 2015).

Genes de virulência

Neste trabalho avaliou-se a presença de 12 genes de virulência nas linhagens de *S. Typhimurium*. Todas as 119 linhagens apresentaram os genes *sipA*, *flgK*, *flgL* e *invA* (Tabela 10). Os genes *sipA* e *invA* estão associado a invasão e os genes *flgK* e *flgL* são responsáveis pela produção de flagelo. O gene *sipD* que codifica proteína de montagem e o gene *sopE2* que codifica proteína efetora do T3SS, foram detectados em 99,2% das linhagens. O gene *fljB* também responsável pela produção de flagelo foi detectado em 98,3% das linhagens. O gene *sopD* que codifica uma proteína efetora do T3SS foi detectado em 95,8% das linhagens e o gene *sopB* que também codifica uma proteína efetora do T3SS foi detectado em 93,3% das linhagens. Os genes *ssaR* e *sifA* codificam proteínas que estão associadas com a sobrevivência e replicação dentro de células hospedeiras e esses foram detectados em 85,7% e 72,3% das linhagens, respectivamente. Finalmente, o gene plasmidial *spvB* que codifica uma proteína efetora, envolvida no estágio intracelular da bactéria, foi detectado em 37,8% das linhagens (Tabela 10).

Todos os 12 genes de virulência pesquisados foram encontrados em mais de 72,3% das linhagens com exceção do gene plasmidial *spvB* (Tabela 10). Uma possível explicação para a baixa frequência desse gene plasmidial pode ser devido à estocagem das linhagens em ágar, à temperatura ambiente e com alguns subcultivos que podem promover a perda de plasmídeos em bactérias.

Os resultados de genes de virulência obtidos reforçam o potencial das *Salmonella* Typhimurium estudadas causarem doenças em humanos, bem como, os riscos de sua presença em alimentos, animais para o consumo humano e ambiente.

No Brasil, Almeida *et al.* (2015) relatou a presença de vários genes de virulência em linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos e alimentos, de 1983 a 2013, em diferentes Estados do país.

Rowlands e colaboradores (2014) pesquisaram apenas quatro genes de virulência, *pefA*, *invA*, *sefA* e *spvC* em 237 linhagens de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos entre 1983 e 2007 no Brasil. O gene *invA* foi detectado em todas as linhagens. Os genes *spvC*, *sefA* e *pefA* foram observados em 48,1%, 31,6% e 44,3% das linhagens, respectivamente.

Hur e colaboradores (2011) pesquisaram os genes *invA*, *sipA*, *sopA*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *ssaR*, *sifA* e *spvC* em 42 linhagens de *S. Typhimurium*, isoladas de leitões, em dois períodos, 2000 a 2001 e 2005 a 2006, na Coreia. Acima de 90% das linhagens carregavam todos os genes de virulência, com exceção do *spvC*, que foi encontrado em apenas seis (14%) linhagens. A alta frequência dos genes de virulência corrobora com nossos resultados.

Em Tamang e colaboradores (2014), foram pesquisados os genes *spvB*, *spiA*, *pagC*, *cdtB*, *msgA*, *invA*, *sipB*, *prgH*, *spaN*, *orgA*, *tolC*, *sitC*, *ipfC*, *sifA*, *sopB*, *pefA*, e *iroN* em 456 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de porcos saudáveis (238) e doentes (218) entre 1998 e 2011, na Coreia. Mais de 96% dos isoladas apresentaram os genes *invA*, *spiA*, *msgA*, *sipB*, *prgH*, *spaN*, *tolC*, *ipfC*, *sifA*, *sitC*, e *sopB*. A prevalência dos genes *orgA*, *pagC*, e *iroN* foi de 50,2, 74,1, e 91,0%, respectivamente. E os genes *cdtB* (1,5%), *pefA* (7,0%), e *spvB* (14,9%) apresentaram uma baixa frequência entre as linhagens. A alta frequência dos genes de virulência *invA*, *sipA*, *sopB* e *sifA* e a baixa frequência do gene *spvB*, observados em Tamang *et al.* (2014) corroboram com os nossos resultados.

Perfil de resistência

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado para as 119 linhagens de *S. Typhimurium*. De um total de 119 linhagens de *S. Typhimurium*, 74 (62,2%) linhagens foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado (Tabela 12).

Dentre os antimicrobianos recomendados para terapia de infecções por *Salmonella* estão a ampicilina, cefalosporinas, sulfametoxazol-trimetropima e as fluoroquinolonas, tais como ciprofloxacina e levofloxacina (Fábrega e Vila, 2013). No presente estudo, os antimicrobianos com maior frequência de resistência entre as linhagens foram a ampicilina (37,8%), o ácido nalidíxico (35,3%) e a tetraciclina (35,3%) (Tabela 11). O antimicrobiano sulfametoxazol-trimetropima também apresentou uma frequência considerável entre as linhagens, de 28,6%. A relativa alta frequência de resistência frente a ampicilina e sulfametoxazol-trimetropima pode ser explicada justamente pelo fato de serem drogas de escolha na terapia com antimicrobianos em infecções por *Salmonella*.

A tetraciclina é muito utilizada na suinocultura (Kich *et al.*, 2011) e os nossos resultados mostram uma relativa alta frequência de resistência a TET (35,5%) em linhagens isoladas de alimentos, animal e do ambiente do animal, alertando para o risco do uso de antibióticos na medicina veterinária.

Os perfis de resistência mais frequentes entre as linhagens foram TET e AMP-NA-SXT-C. Especificamente, Dezesesseis (13,4%) linhagens apresentaram resistência somente a tetraciclina e 11 (9,2) linhagens apresentaram resistência a AMP-NA-SXT-C (Tabela 12). Trinta e seis (30,3%) linhagens foram multi-droga resistentes (MDR), ou seja, resistentes a três ou mais antimicrobianos de classes diferentes (Tabela 12).

No Brasil, dos Reis e colaboradores (2011) avaliaram o perfil de resistência de 553 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos entre 1970 a 2008. Do total de 553 linhagens, 52% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado. Ademais, 20,9% apresentaram MDR com resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina. Comparativamente, a frequência de linhagens MDR do nosso estudo (30,3%, Tabela 12) foi um pouco maior do que a encontrada por dos Reis *et al.* (2011).

Ghilardi e colaboradores (2006) avaliaram o perfil de resistência de 283 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de fontes humanas (187) e não humanas (96) entre 1990 a 2001, no Estado de São Paulo, Brasil. Cento e oito (38%) linhagens foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado. A maior frequência de resistência foi observada para tetraciclina

(37,5%). Quarenta e três (15%) linhagens foram MDR, das quais 35 foram isoladas de humanos e oito de não humanos. Novamente, uma maior frequência de linhagens MDR foi encontrada em nosso estudo (30,3%, Tabela 12).

No estudo realizado por Sun e colaboradores (2014), de 294 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de pacientes doentes, de 2007 a 2011, na China, 268 (91,16%) foram MDR. Um grande número de resistência foi encontrado para ampicilina (87,75%), ácido nalidixico (82,65%), sulfametoxazol (89,79%), trimetoprim (71,43%), tetraciclina (89,12%), gentamicina (65,31%), estreptomicina (78,57%) e cloranfenicol (74,49%). Dessa forma, uma frequência muito maior de linhagens MDR foi encontrado por Sun *et al.* (2014) em comparação ao nosso estudo (30,3%, Tabela 12).

Tamang e colaboradores (2014) pesquisaram o perfil de resistência das linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de porcos saudáveis e doentes, na Coreia. Das 456 linhagens estudadas, 93,4% das linhagens apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado. Os isolados foram mais frequentemente resistentes a tetraciclina (85,7%), estreptomicina (83,6%), ácido nalidixico (67,3%), ampicilina (49,3%), cloranfenicol (42,8%) e gentamicina (37,1%). A MDR foi observada em 69,1% das linhagens, portanto, uma frequência muito maior de linhagens MDR em comparação ao nosso estudo (30,3%, Tabela 12).

As linhagens MDR desse estudo apresentaram maior frequência do que de outros estudos realizados no país (Ghilardi, Tavechio e Fernandes, 2006; Dos Reis *et al.*, 2011) e menor frequência do que o observado na China e na Coreia (Sun *et al.*, 2014; Tamang *et al.*, 2014). Entretanto, a presença de linhagens MDR ou com resistência a um ou mais antimicrobiano é preocupante, pois isso pode levar a falha terapêutica e disseminação de genes de resistência à linhagens de *S. Typhimurium* de fontes clínicas e não clínicas, até então sensíveis a antimicrobianos.

A ocorrência de *S. Typhimurium* multi-droga resistentes isoladas de alimentos diversos e de suínos para consumo é um alerta para o possível risco de humanos ingerirem alimentos contaminados por tais linhagens.

Genotipagem das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos por PFGE, ERIC-PCR e MLVA

Na comparação das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos, a metodologia de PFGE agrupou as linhagens em dois grupos, denominados PFGE-A e

PFGE-B, sendo esse último subdividido em PFGE-B1 e PFGE-B2 (Fig. 2). No grupo PFGE-A, foi alocada apenas uma linhagem isolada de fezes de humanos em 1983 no Estado de São Paulo (SP) e oito linhagens isoladas de alimentos entre 1999 a 2009 nos Estados de Mato Grosso do Sul (MS), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) e Goiás (GO). Especificamente, no subgrupo PFGE-B1 foram alocadas 62 (67,4%) linhagens com similaridade superior a 61,2% entre si, sendo 22 linhagens isoladas de humanos, entre 1983 a 2010 no Estado de SP e, 40 linhagens isoladas de diversos alimentos entre 1995 e 2013 nos Estados de SP, MS, SC, RS, GO, Paraná (PR) e Bahia (BA). No subgrupo PFGE-B2, foram agrupadas 21 (22,8%) linhagens com similaridade superior a 61,8% entre si, isoladas de humanos entre 1983 a 1991 no Estado de SP. O índice de discriminação de PFGE para as linhagens isoladas de humanos e alimentos foi de 0,993, demonstrando o alto poder de discriminação dessa metodologia.

Os resultados de PFGE sugerem que as linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos eram geneticamente mais diversificadas antes de meados de 1990, pois estão presentes nos grupos PFGE-A, PFGE-B1 e PFGE-B2 (Fig. 2) em comparação aos isolados após esse período presentes apenas no subgrupo PFGE-B1, o que pode sugerir a seleção de um subtipo de *S. Typhimurium* mais adaptado depois que *S. Enteritidis* tornou-se a sorovariedade de maior ocorrência após meados da década de 90 no Brasil (Almeida *et al.*, 2015).

Interessante mencionar que no subgrupo PFGE-B2, 13 (61,9%) das 21 linhagens isoladas de humanos foram multi-droga resistentes (MDR) (Fig. 2) e que todas as linhagens desse subgrupo foram isoladas antes de meados da década de 1990. Vale ressaltar que todas as linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos após 1993-1994 foram alocadas no subgrupo PFGE-B1 e que tanto essas quanto as linhagens isoladas anteriormente a esse período foram em sua maioria susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Tais dados mostram que o PFGE foi capaz de agrupar as linhagens isoladas de humanos de acordo com seu perfil de resistência (Fig. 2 – subgrupos PFGE-B1 e PFGE-B2), sugerindo que após a pandemia de *S. Enteritidis*, que ocorreu em meados da década de 90, foi selecionado um subtipo de *S. Typhimurium* mais adaptado, mais sensível a antimicrobianos (Fig. 2 – PFGE-B1) e talvez, hipoteticamente mais patogênico do que linhagens de origem humana MDR isoladas antes de meados da década de 90 (Fig. 2 – PFGE-B2).

A hipótese mencionada acima é corroborada por alguns trabalhos. Wang e colaboradores (2009) demonstraram que linhagens de *Salmonella* de algumas sorovariedades,

dentre as quais Typhimurium, resistentes a quinolonas apresentaram decréscimo na expressão dos genes de virulência *invA* e *avrA* da ilha SPI-1, bem como decréscimo na invasão à células epiteliais e na replicação intracelular em células epiteliais e macrófagos. Resultados similares foram observados com linhagens de *Campylobacter jejuni* resistentes a eritromicina por Almofti *et al.* (2011).

Das 49 linhagens isoladas de alimentos, 11 linhagens apresentaram perfil de MDR (Fig. 2 – PFGE-A e PFGE-B1), o que é um alerta do possível risco de humanos ingerirem alimentos contaminados por *S. Typhimurium* multi-droga resistentes. Ademais, os resultados de PFGE sugerem que durante o período estudado houve a circulação de mais de um subtipo prevalente no país com relação às linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de alimentos (Fig. 2 – PFGE-A e PFGE-B1) (Almeida *et al.*, 2015).

Como todas as 43 linhagens isoladas de humanos foram isoladas no Estado de SP e as 49 linhagens de alimentos foram isoladas dos Estados de SP, SC, PR e RS pode-se dizer que se observou uma alta similaridade genotípica entre as linhagens de humanos do Estado de SP com as linhagens de alimentos isoladas nos três Estados do Sul do país e também no Estado de SP (Fig. 2 – PFGE-B1). Com relação aos outros Estados, não se pode fazer maiores inferências devido ao baixo número de linhagens isoladas no MS (3), GO (2) e BA (1).

No Brasil, Ghilardi e colaboradores (2006) tiparam 56 linhagens de *S. Typhimurium*, multidroga resistentes e algumas sensíveis, isoladas de fonte humanas e não humanas, entre 1990 e 2001, por PFGE. Similar aos nossos resultados, as linhagens foram bastante diversificadas, apresentando similaridade genotípica de 40% entre si e em nosso estudo essa similaridade foi de 37,1% (Fig. 2).

Resultados contrários aos nossos também foram encontrados em estudos com linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de outros locais do mundo e também no Brasil. Ngoi e colaboradores (2013) tiparam por PFGE 84 linhagens de *S. Typhimurium*, isoladas de humanos, animais e alimentos na Malásia, entre 1970 e 2009. A maioria das linhagens apresentou similaridade genotípica acima de 80%. Essa mesma similaridade genotípica foi encontrada entre 42 linhagens de *S. Typhimurium*, isoladas de leitões, em dois períodos, 2000 a 2001 e 2005 a 2006, na Coreia, no estudo realizado por Hur e colaboradores (2011).

No Brasil, Fernandes e colaboradores (2009) tiparam 10 linhagens de *S. Typhimurium*, isoladas de crianças e de aves, entre 2003 e 2004, produtoras de CTX-M-2, por PFGE e apresentaram similaridade genotípica acima de 89%. Em concordância, Bessa *et al.* (2007)

tiparam por PFGE 66 linhagens de *S. Typhimurium*, isoladas de suínos no Rio Grande do Sul, entre 1999 e 2000 e observou-se que essas apresentaram similaridade genotípica acima de 74,2%.

O ERIC-PCR dividiu as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos em dois grupos, denominados ERIC-A e ERIC-B (Fig. 4). No grupo ERIC-A ficaram alocadas 78 (84,8%) linhagens com similaridade acima de 80,4% entre si, destas 33 foram isoladas de humanos entre 1983 a 2010 e 45 foram isoladas de alimentos entre 1998 a 2013. No grupo ERIC-B ficaram agrupadas 13 (14,1%) linhagens, sendo 10 isoladas de humanos, entre 1985 a 1995 e três linhagens isoladas de alimentos diversos entre 1995 e 2006, com similaridade superior a 81,3% entre si. O índice de discriminação para a metodologia de ERIC-PCR, comparando os isolados de humanos e alimentos, foi de 0,983, o que comprova a eficiência dessa metodologia em discriminar as linhagens de *S. Typhimurium*.

Similarmente ao PFGE, os resultados de ERIC-PCR sugerem que as linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos eram geneticamente mais diversificadas antes de meados de 1990, pois foram alocadas nos grupos ERIC-A e ERIC-B (Fig. 4) em comparação aos isolados após esse período presentes apenas no grupo ERIC-A, o que pode sugerir a seleção de um subtipo de *S. Typhimurium* mais adaptado depois que *S. Enteritidis* tornou-se a sorovariedade de maior ocorrência após meados da década de 90 no Brasil (Almeida *et al.*, 2015).

Com relação às linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de alimentos, os resultados de ERIC-PCR sugerem que durante o período estudado houve a circulação de mais de um subtipo prevalente no país, assim como o PFGE (Fig. 4 – ERIC-A e ERIC-B) (Almeida *et al.*, 2015).

Bessa e colaboradores (2007) tiparam 66 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de porcos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil por ERIC-PCR. Em contraste aos nossos resultados, o ERIC-PCR não foi capaz de discriminar as linhagens e encontrou apenas um único perfil para todas as linhagens.

Turki e colaboradores (2014) estudaram 48 linhagens de *Salmonella* de várias sorovariedades, dentre elas *Typhimurium*, isoladas de humanos, alimentos, animais e água, no período de 2006 a 2008, na Tunísia, África, e essas, foram caracterizadas por ERIC-PCR,

detecção de genes de virulência, teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Por ERIC-PCR, as 48 linhagens foram diferenciadas em apenas 12 subtipos.

No presente estudo, o MLVA diferenciou as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de fezes de humanos (43) e de diversos alimentos (49) em 53 MLVA-tipos e agrupou-as em dois grupos, MLVA-A e MLVA-B, sendo que o MLVA-B foi subdividido em MLVA-B1 e MLVA-B2 (Fig. 5). No grupo MLVA-A foram alocadas 11 (12%) linhagens, sendo sete isoladas de alimentos entre 1995 e 2012 e quatro linhagens isoladas de humanos entre 1983 e 1997. Especificamente, no subgrupo MLVA-B1 foram alocadas 41 (44,6%) linhagens, sendo 32 linhagens isoladas de humanos entre 1983 a 2003 e nove isoladas de alimentos entre 1996 a 2012. No subgrupo MLVA-B2 foram alocadas 40 (43,4%) linhagens, sendo 33 isoladas de alimentos entre 1998 a 2013 e sete isoladas de humanos entre 1985 a 2010. O grupo MLVA-A foi muito semelhante ao grupo PFGE-A (Fig. 2), pois agrupou apenas algumas linhagens isoladas de humanos e essas foram isoladas antes de 1997. O índice de discriminação do MLVA para as linhagens isoladas de humanos e alimentos foi de 0,976, semelhante ao de PFGE e de ERIC-PCR.

Similarmente aos resultados de PFGE e ERIC-PCR, os resultados de MLVA sugerem que as linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos eram geneticamente mais diversificadas antes de meados de 1990, pois foram alocadas nos grupos MLVA-A, MLVA-B1 e MLVA-B2 (Fig. 5) em comparação aos isolados após esse período presentes nos subgrupos MLVA-B1 e MLVA-B2, o que pode sugerir a seleção de um subtipo de *S. Typhimurium* mais adaptado depois que *S. Enteritidis* tornou-se a sorovariedade de maior ocorrência após meados da década de 90 no Brasil (Almeida *et al.*, 2015).

Com relação às linhagens isoladas de alimentos, os resultados de MLVA sugerem que durante o período estudado houve a circulação de mais de um subtipo prevalente, similarmente aos resultados de PFGE e ERIC-PCR (Fig. 5 – MLVA-A, MLVA-B1 e MLVA-B2) (Almeida *et al.*, 2015).

Muitos estudos demonstraram que o MLVA tem um alto poder discriminatório (Best *et al.*, 2007; Prendergast *et al.*, 2011; Wuyts *et al.*, 2013). Prendergast *et al.* (2011), caracterizaram 301 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de suínos, entre 2006 e 2009 por MLVA, fagotipagem, e testes de susceptibilidade a antimicrobianos. A técnica MLVA foi altamente discriminatória, subtipando as linhagens em 154 MLVA-tipos em contraste com 19 fagotipos e 38 perfis de resistência antimicrobiana. Além disso, o MLVA discriminou linhagens do mesmo fagotipo.

Ngoi *et al.* (2013) tiparam 84 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos, alimentos e animais na Malásia entre 1970 e 2009, utilizando PFGE e MLVA e verificaram que o PFGE foi mais discriminatório que o MLVA, o que foi também observado no presente estudo.

Em uma comparação dos resultados de PFGE, MLVA e ERIC-PCR com os isolados de humanos e alimentos, o PFGE-A foi muito semelhante ao MLVA-A, pois agrupou principalmente as linhagens isoladas de alimentos e algumas linhagens isoladas de humanos antes de 1994, exceto para uma linhagem isolada de humano em 1997 alocada no MLVA-A (Fig. 2 e 5). Não foi observado um grupo similar no ERIC-PCR (Fig. 4). Todas as linhagens isoladas de humanos após meados dos anos 90 foram agrupadas no PFGE-B1 (Fig. 2), ERIC-A (Fig. 4), MLVA-B1 e MLVA-B2 (Fig. 5) sugerindo que após este período as linhagens *S. Typhimurium* sofreram um processo de seleção e um subtipo prevalente que sofreu poucas alterações genéticas contaminou os humanos.

Em contraste, não foi observado grupos semelhantes ao PFGE-B1 e PFGE-B2 no MLVA e ERIC-PCR em relação às linhagens de origem humana quanto ao seu perfil de resistência a antimicrobianos (Fig. 2, 4 e 5). No subgrupo PFGE-B1, ficaram alocadas linhagens isoladas de humanos entre 1983 e 2010, que eram em sua maioria susceptível a todos os antimicrobianos testados. No subgrupo PFGE-B2, ficaram alocadas linhagens isoladas exclusivamente antes de meados dos anos 1990 com 61,9% das linhagens sendo MDR (Fig. 2). Nos grupos MLVA-B1, ERIC-A e ERIC-B ficaram alocadas linhagens MDR e sensíveis isolados de humanos (Fig. 4 e 5).

As linhagens MDR isoladas de alimentos foram agrupadas no PFGE-A, PFGE-B1, ERIC-A, MLVA-B1 e MLVA-B2 (Fig. 2, 4 e 5). Estes grupos também incluíram linhagens isoladas de humanos susceptíveis a todos os agentes antimicrobianos, indicando o possível risco de linhagens MDR isoladas de alimentos contaminarem humanos e/ou disseminarem genes de resistência aos antibióticos para linhagens susceptíveis de origem clínica e não clínica. Essa propagação de genes de resistência a antimicrobianos poderia ocorrer por transferência horizontal de genes via plasmídeo, por exemplo.

Além disso, vale ressaltar que linhagens isoladas de alimentos de diferentes regiões e Estados foram agrupadas nos mesmos subgrupos e, portanto, não foram agrupados de acordo com sua região geográfica. Por exemplo, no PFGE-A ficaram alocadas linhagens isoladas de alimentos na região Sul dos Estados de SC e RS, bem como da região Centro-Oeste em GO e MS (Fig. 2). Da mesma forma, no PFGE-B1 ficaram alocadas linhagens isoladas de alimentos

na região Sul dos Estados de SC, PR e RS, bem como da região Centro-Oeste em GO e MS. Finalmente, linhagens isoladas na região Nordeste no Estado da BA e linhagens isoladas na região Sudeste do Estado de SP tiveram similaridades. Isto também foi observado nos grupos ERIC-A, ERIC-B, MLVA-A, MLVA-B1 e MLVA-B2 (Fig. 4 e 5).

A partir dos nossos resultados, podemos concluir que o uso do PFGE é altamente recomendado para tipagem de *S. Typhimurium*, uma vez que apresentou um alto poder discriminatório e forneceu uma informação epidemiológica consistente e adicional em comparação ao MLVA e ERIC-PCR, por ter agrupado linhagens isoladas de humanos de acordo com seu perfil de resistência.

Genotipagem das 70 linhagens isoladas de humanos, de suínos e ambientes de suínos por PFGE, ERIC-PCR e MLVA

Comparando as 70 linhagens isoladas de humanos, de suínos e ambientes de suínos, por PFGE as linhagens foram agrupadas em dois grupos, denominados PFGE-C e PFGE-D, sendo o PFGE-D subdividido em PFGE-D1 e PFGE-D2 (Fig. 6). A similaridade entre os grupos PFGE-C e PFGE-D foi de 55%. No grupo PFGE-C foram alocadas nove (12,9%) linhagens sendo oito isoladas de suínos entre 2003 a 2012 e, apenas uma linhagem isolada de ambiente de suínos em 2011. Três linhagens desse grupo foram MDR. No subgrupo PFGE-D1 foram alocadas 22 (31,4%) linhagens isoladas de humanos, entre 1983 a 1986 e dessas 15 linhagens foram MDR. No subgrupo PFGE-D2, foram agrupadas 39 (55,7%) sendo 14 (20%) linhagens isoladas de suíno e quatro (5,7%) linhagens isoladas do ambiente de suínos entre 2000 e 2012 e 21 (30%) linhagens isoladas de humanos entre 1983 a 2010 sugerindo que algumas linhagens de suínos e humanos descendem de um subtipo comum (Fig. 6). Ainda no subgrupo PFGE-D2, 11 linhagens isoladas de suínos e do ambiente de suíno foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado e sete delas foram MDR. Em relação às linhagens isoladas de humanos no subgrupo PFGE-D2, as mesmas apresentaram uma baixa frequência de resistência sendo apenas seis linhagens resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado e nenhuma MDR. A ocorrência de linhagens de *S. Typhimurium* MDR isoladas de suínos é um alerta para o possível risco de porcos que são usados para consumo contaminarem humanos.

O índice de discriminação para a metodologia PFGE, comparando os isolados de humanos, animais e ambiente do animal, foi de 0,996, demonstrando o alto poder de discriminação dessa metodologia.

As linhagens isoladas de humanos MDR ficaram alocadas apenas no subgrupo PFGE-D1 (Fig. 6). Tais dados mostram que o PFGE foi capaz de agrupar as linhagens isoladas de humanos de acordo com seu perfil de resistência, similarmente aos resultados encontrados no PFGE comparando os isolados de humanos e alimentos (Fig. 2 – PFGE-B2).

Similarmente aos nossos resultados, no Brasil, Ghilardi e colaboradores (2006) tiparam 56 linhagens de *S. Typhimurium* MDR e algumas susceptíveis isoladas de humanos e não-humanos, entre 1990-2001. Por PFGE, as linhagens mostraram ser muito diversas, com similaridade genotípica $\geq 40\%$. No estudo de Benacer *et al.* (2010), feito na Malásia, 47 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e animais, entre 1969 e 2006, foram tipadas por PFGE e mostraram alta diversidade genotípica, uma vez que o PFGE subtipou as 47 linhagens em 39 perfis e a similaridade foi de 45% entre tais linhagens.

Em contraste aos nossos resultados, no Brasil, Kich e colaboradores (2011) caracterizaram linhagens de *S. Typhimurium* e outras sorovariedades isoladas de suínos em 2007, em Santa Catarina por PFGE e observaram que as linhagens de *S. Typhimurium* foram muito similares, com mais de 90% de similaridade. Fernandes *et al.* (2009) caracterizaram 10 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de fontes clínicas e de frangos em São Paulo, entre 2003 e 2004, por PFGE e a similaridade genotípica entre as linhagens foi de 89%.

Uma alta similaridade genotípica também foi encontrada em estudos de outros países. Na Malásia, Ngoi *et al.* (2013) caracterizaram 84 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos, animais e alimentos, entre 1970 a 2009 por PFGE. A maioria das linhagens mostrou similaridade genotípica acima de 80%.

Comparando as 70 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos, suínos e ambiente do suíno, a metodologia de ERIC-PCR agrupou as linhagens em dois grupos, denominados ERIC-C e ERIC-D, sendo o ERIC-C subdividido nos subgrupos ERIC-C1 e ERIC-C2 (Fig. 7). No grupo ERIC-C foram alocadas 68 (97,1%) linhagens com similaridade acima de 69,3% entre si. Especificamente, no subgrupo ERIC-C1 ficaram alocadas um total de 58 (82,9%) linhagens, sendo 20 (28,6%) linhagens isoladas de suínos, cinco (7,1%) linhagens isoladas do ambiente de suínos entre 2000 a 2012 e 33 (47,1%) linhagens isoladas de humanos entre 1983 a 2010, com similaridade superior a 72,3% entre si. No subgrupo ERIC-C2 foram agrupadas 10 (14,3%) isoladas de humanos, entre 1985 a 1995, com similaridade superior a 81,7% entre si, sendo duas linhagens MDR. No grupo ERIC-D

ficaram agrupadas duas (2,9%) linhagens isoladas de suínos em 2004, com similaridade superior a 76,2% entre si, sendo que apenas uma linhagem apresentou resistência à TET.

O índice de discriminação para a metodologia ERIC-PCR, comparando os isolados de humanos, animais e ambiente do animal, foi de 0,983, demonstrando o alto poder de discriminação dessa metodologia.

Considerando as 25 linhagens isoladas de suínos e ambiente do suíno do subgrupo ERIC-C1, 16 linhagens foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado e 10 foram MDR. Em relação às 33 linhagens de humanos, 25 linhagens foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado e dessas, 13 foram MDR (Fig. 7). A similaridade superior a 77,8% entre as linhagens MDR do subgrupo ERIC-C1 isoladas tanto de humanos quanto de suínos sugere e alerta para o possível risco de porcos usados para consumo e que carregam linhagens de *S. Typhimurium* MDR contaminarem humanos e o ambiente (Fig. 7 – ERIC-C1).

No presente estudo, resultados similares ao PFGE foram encontrados por MLVA. No grupo MLVA-C1 foram agrupadas 37 (52,9%) linhagens, sendo 20 (28,6%) linhagens isoladas de suíno e cinco (7,1%) linhagens do ambiente de suínos entre 2000 e 2012 e 12 (17,1%) isoladas de humanos entre 1984 a 2010 (Fig. 8). Das 25 linhagens isoladas de suíno e ambiente de suínos, do subgrupo MLVA-C1, 16 linhagens foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado e dessas 10 foram MDR. As 12 linhagens isoladas de humanos do MLVA-C1, oito foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado e nenhuma foi MDR. No subgrupo MLVA-C2, foram agrupadas 28 (40,0%) linhagens todas isoladas de humanos no período de 1983 a 2003, sendo 20 linhagens resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado e 15 dessas foram MDR. No grupo MLVA-D, ficaram agrupadas quatro (5,7%) linhagens, dessas duas foram isoladas de humanos em 1983 e 1985 e duas de suínos em 2012, e apenas uma linhagem de origem humana foi resistente a um antimicrobiano testado (Fig. 8). Os resultados de MLVA sugerem que algumas linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos descendem de um mesmo subtipo que algumas linhagens isoladas de suínos e do ambiente de suínos (MLVA-C1 e MLVA-D) e alerta para o possível risco de humanos serem contaminados por linhagens de *S. Typhimurium* MDR sendo os porcos reservatórios (MLVA-C1).

Em conjunto, os resultados de genotipagem por PFGE, ERIC-PCR e MLVA (Fig. 6, 7 e 8) sugerem que algumas linhagens isoladas de suínos e humanos podem descender de um subtipo comum. As linhagens MDR isoladas de suínos saudáveis e do ambiente de suínos alertam para o possível risco de porcos usados para consumo contaminarem humanos, o

ambiente e outros porcos. Esse estudo também alerta para o risco da presença de linhagens de *S. Typhimurium* MDR isoladas de suínos uma vez que o Brasil é o quarto país produtor de carne suína no mundo (Viott *et al.*, 2013).

Genotipagem das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos por CRISPR-MVLST

A análise de CRISPR-MVLST foi feita para as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos. Duas diferentes análises foram feitas, uma análise foi feita baseada apenas nos espaçadores dos dois *loci* CRISPR, e outra análise baseada nos espaçadores juntamente com dois genes, *fimH* e *sseL*.

Considerando a análise baseada apenas nos espaçadores, as 92 linhagens de *S. Typhimurium* foram agrupadas em dois grupos denominados E e F sendo o E subdividido em E1 e E2 (Fig. 9). Especificamente, no subgrupo E1 ficaram agrupadas seis linhagens, sendo cinco linhagens isoladas de alimentos entre 1999 e 2013, dos Estados RS, SP, GO e SC. Três dessas linhagens apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado e uma foi MDR. Ainda no subgrupo E1, foi alocada também apenas uma linhagem isolada de humano, em 1985, susceptível a todos os antimicrobianos testados. No subgrupo E2 ficaram alocadas 35 linhagens, sendo 28 linhagens isoladas de alimentos entre 1998 e 2013 e sete linhagens isoladas de humanos entre 1985 e 2010, nos Estados de SP, SC, RS, GO, MS e PR. Das 35 linhagens do subgrupo E2, 23 linhagens isoladas de alimento e cinco isoladas de humanos apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado, sendo que oito linhagens isoladas de alimentos foram MDR e nenhuma linhagem isolada de humano apresentou multi-droga resistência. No grupo F ficaram agrupadas 57 linhagens sendo 35 linhagens isoladas de humanos entre 1983 e 2003 e 16 linhagens isoladas de alimentos entre 1995 e 2013, nos Estados de SP, SC, PR, MS, e BA. Das 57 linhagens do grupo F, 26 linhagens apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado, sendo 23 linhagens isoladas de humanos e três isoladas de alimentos, 15 linhagens isoladas de humanos e duas isoladas de alimentos foram MDR.

Considerando a segunda análise de CRISPR-MVLST, baseada nos espaçadores e nos dois genes, *fimH* e *sseL*, as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos foram divididas em dois grupos denominados G e H, sendo que o grupo G foi subdividido em G1 e G2 (Fig. 10). Especificamente, no subgrupo G1 ficaram agrupadas cinco linhagens, sendo quatro linhagens isoladas de alimentos entre 1999 e 2013, duas delas apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado e uma foi MDR, e apenas uma linhagem

isolada de humano em 1985, que apresentou susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados. Essas linhagens foram isoladas nos Estados de SC, GO e SP. No subgrupo G2 ficaram alocadas 64 linhagens, sendo 45 linhagens isoladas de alimentos entre 1995 e 2013 e 19 linhagens isoladas de humanos entre 1985 e 2010, nos Estados de SP, PR, MS, RS, BA e GO. Das 64 linhagens do subgrupo G2, 26 linhagens isoladas de alimentos e seis linhagens isoladas de humanos apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado, sendo que 10 linhagens isoladas de alimentos foram MDR, e nenhuma linhagem isolada de humano deste subgrupo foi MDR. No grupo H ficaram alocadas 23 linhagens, todas isoladas de humanos entre 1983 e 1986. Das 23 linhagens presentes no grupo H, 22 linhagens apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado e dessas 15 linhagens foram MDR.

Os resultados de CRISPR-MVLST sugerem que as linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos eram geneticamente mais diversificadas antes de meados de 1990, pois estão presentes nos grupos G1, G2 e H (Fig. 10) em comparação aos isolados após esse período presentes apenas no subgrupo G2, o que pode sugerir a seleção de um subtipo de *S. Typhimurium* mais adaptado depois que *S. Enteritidis* tornou-se a sorovariedade de maior ocorrência após meados da década de 90 no Brasil.

Com relação às linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de alimentos, os resultados de CRISPR-MVLST sugerem que durante o período estudado houve a circulação de mais de um subtipo prevalente no país (Fig. 10 – subgrupos G1 e G2).

As duas diferentes análises feitas através da metodologia CRISPR-MVLST forneceram resultados similares (Fig. 9 e Fig. 10). Entretanto, a análise feita contemplando a combinação dos espaçadores de CRISPR e dos genes *fimH* e *sseL* (Fig. 10) foi muito similar ao PFGE (Fig. 2) utilizado na comparação dessas mesmas linhagens. Adicionalmente, a inclusão dos genes *fimH* e *sseL* à análise, forneceu uma informação epidemiológica mais consistente, o que sugere que a adição dos dois genes são importantes e úteis na análise de CRISPR.

Interessante mencionar que no grupo H, das 23 linhagens, 15 linhagens foram MDR (Fig. 10) e que todas as linhagens desse subgrupo foram isoladas antes de meados da década de 1990. Vale ressaltar que todas as linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos após meados da década de 1990 foram alocadas no subgrupo G2 e que em sua maioria foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Tais dados mostram que o CRISPR-MVLST foi capaz de agrupar as linhagens isoladas de humanos de acordo com seu perfil de resistência

(Fig. 10 – grupo H), assim como o PFGE (Fig. 2), sugerindo que após a pandemia de *S. Enteritidis* foi selecionado um subtipo de *S. Typhimurium* mais adaptado, mais sensível a antimicrobianos e talvez, hipoteticamente mais patogênico do que linhagens de origem humana multi-droga resistentes isoladas antes de meados da década de 90.

Estudos demonstraram que a metodologia CRISPR-MVLST tem sido utilizada com sucesso para subtipar linhagens de *S. enterica* (Liu *et al.*, 2011; Fabre *et al.*, 2012; Dimarzio *et al.*, 2013; Shariat, Dimarzio, *et al.*, 2013; Shariat, Kirchner, *et al.*, 2013; Shariat, Sandt, *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2015).

Shariat e colaboradores (2013) avaliaram a capacidade do CRISPR-MVLST em tipar linhagens de *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* isoladas de surtos. Os resultados mostraram que no caso de *S. Typhimurium*, a metodologia de tipagem forneceu um alto poder discriminatório e uma excelente concordância epidemiológica. Para *S. Heidelberg*, o CRISPR-MVLST foi capaz de separar perfis de PFGE, fornecendo um poder discriminatório maior que o de PFGE.

Pelo nosso conhecimento, não há nenhum trabalho publicado que utilizou a metodologia de CRISPR-MVLST para subtipar linhagens de *Salmonella* no Brasil até o presente momento. Dessa forma, o presente trabalho contribui para um melhor entendimento sobre a epidemiologia de linhagens de *Salmonella Typhimurium* isoladas no Brasil, bem como, comprovou a adequação da metodologia para tipagem de tal sorovariedade.

Genotipagem das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos por MLST

A metodologia de MLST foi realizada para as 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos listadas da Tabela 2. Das 92 linhagens estudadas, 89 linhagens tiveram seus STs identificados de acordo com o banco de dados de *S. enterica* (Tabela 13). Das 92 linhagens de *S. Typhimurium* estudadas, 77 (83,7%) linhagens, sendo 45 isoladas de alimentos e 32 isoladas de humanos, apresentaram o ST19. Das 77 linhagens que apresentaram o ST19, 27 linhagens isoladas de alimentos e 26 linhagens isoladas de humanos apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado, sendo que dessas, 10 linhagens isoladas de alimentos e 14 linhagens de humanos foram MDR. Nove (9,8%) linhagens, sendo sete isoladas de humanos e duas isoladas de alimentos apresentaram o ST313 e apenas uma linhagem isolada de humano apresentou resistência a um antimicrobiano testado. Duas (2,2%) linhagens isoladas de alimentos apresentaram o ST1921 e foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado, sendo que uma linhagem foi MDR.

Finalmente, uma (1,1%) linhagem isolada de humano apresentou o ST1649 e foi susceptível a todos os antimicrobianos testados (Tabela 13).

A partir do diagrama de MLST gerado com os dados das 89 linhagens de *S. Typhimurium* do presente estudo, que tiveram seu ST identificado, e todas as linhagens de *S. Typhimurium* disponíveis no banco de dados de MLST *S. enterica*, até Dezembro de 2015, foi possível observar os STs mais representativos dessa sorovariedade (Fig. 11). O ST19 é o ST mais comum entre as linhagens de *S. Typhimurium* do banco de dados isoladas em diferentes locais do mundo e também entre as linhagens do presente estudo, o que sugere que tais linhagens tenham uma origem filogenética comum.

O ST19 é o ST central do complexo clonal, que contém o maior número de linhagens, possui 33 STs *single locus variant* (SLV), sendo o ST34 e o ST313 considerados subgrupos centrais (Fig. 11). O ST34 é o segundo de maior prevalência e o ST313 é o terceiro de maior prevalência entre as linhagens de *S. Typhimurium*. O ST36 também apresenta uma grande prevalência entre as linhagens de *S. Typhimurium*, entretanto ainda não possui nenhuma relação filogenética com o complexo clonal 19. Há 14 STs que ainda não apresentam qualquer relação filogenética com os demais, são os STs isolados na Figura 11.

As linhagens disponíveis no banco de dados com o ST19 foram isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente, de todos os continentes do mundo, Ásia, Europa, América do Norte, África, Oceania e América do Sul. Até a inclusão das linhagens desse estudo, havia apenas duas linhagens com o ST19 no banco de dados isoladas no Brasil e essas foram isoladas de esgoto.

O ST313 de *S. Typhimurium* foi relatado como sendo quase que exclusivo de isolados da África Subsariana, apresentaram uma alta taxa de resistência a antimicrobianos, associados a infecções invasivas e com taxa de mortalidade maior que 25% e, muito relacionado a pacientes HIV positivos, tanto em crianças quanto em adultos (Feasey *et al.*, 2014; Ley *et al.*, 2014). Este ST apresenta um único SNP no gene *purE* em relação ao ST19. Diante dos resultados encontrados neste estudo, conclui-se que o ST313 não é exclusivo da África Subsariana, e aqui no Brasil, ele tem um perfil diferente das linhagens isoladas na África, como não ter alta taxa de resistência a antimicrobianos e não estar associado a infecções invasivas, lembrando que das nove linhagens do presente estudo que apresentaram o ST313, apenas uma linhagem isolada de humano apresentou resistência a apenas um antimicrobiano.

Sun e colaboradores (2014) caracterizaram 294 linhagens de *S. Typhimurium*, isoladas de pacientes doentes, de 2007 a 2011, na China, por MLST e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. O ST mais prevalente foi o ST34. Das 294 linhagens de *S. Typhimurium*, 209 (71,1%) apresentaram o ST34 e 69 (23,5%) apresentaram o ST19. Um total de 13 STs foram caracterizados entre as 294 linhagens, sendo que dez STs de 11 linhagens foram novos STs. Os isolados com o ST34 apresentaram maior nível de resistência a todos os antimicrobianos testados (exceto ciprofloxacina) do que os isoladas com o ST19. Das 294 linhagens de *S. Typhimurium*, 268 (91,16%) foram MDR, sendo que dessas MDR, 206 (76,9%) linhagens pertencem ao ST34, e apenas 49 (18,3%) linhagens pertencem ao ST19.

Sequenciamento do genoma completo das 92 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos

A análise dos SNPs gerada através do sequenciamento do genoma completo das 92 linhagens de *S. Typhimurium* dividiu as linhagens em dois grupos, denominados de I e J (Fig. 12). No grupo I ficaram agrupadas 35 (38%) linhagens, sendo 28 linhagens isoladas de alimentos entre 1998 a 2013 e sete linhagens isoladas de humanos entre 1985 a 2010. As linhagens alocadas no grupo I foram isoladas nos Estados de São Paulo, Goiás, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. No grupo J ficaram agrupadas 57 (62%) linhagens, sendo 36 linhagens isoladas de humanos entre 1983 e 2003 e 21 linhagens isoladas de alimentos entre 1995 a 2013. As linhagens alocadas no grupo J foram isoladas nos Estados de São Paulo, Goiás, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Bahia e Paraná.

Todas as 92 linhagens apresentaram resistência a pelo menos uma classe de antimicrobiano, os aminoglicosídeos, tais como estreptomicina, gentamicina e/ou amicacina. Especificamente, no grupo I, das 28 linhagens isoladas de alimentos, 15 linhagens foram MDR; e das sete linhagens isoladas de humanos, apenas uma linhagem, isolada de abscesso cerebral em 2005, foi MDR. No grupo J, das 36 linhagens isoladas de humanos, 18 foram MDR; e das 21 linhagens isoladas de alimentos, cinco linhagens foram MDR.

Os resultados obtidos a partir do sequenciamento do genoma completo sugerem que as linhagens isoladas de humanos antes de meados de 1990 são mais resistentes a antimicrobianos do que as isoladas após esse período e foram alocadas em um mesmo grupo (Fig. 12 – grupo J). Assim como o PFGE (Fig. 2), as linhagens isoladas de humanos MDR foram muito similares (Fig. 12 – grupo J).

Similarmente ao PFGE (Fig. 2), os dados do sequenciamento do genoma completo sugerem que em relação às linhagens isoladas de alimentos haja mais de um subtipo circulante no país. Também alerta para o possível risco de linhagens MDR isoladas de alimentos contaminarem humanos e/ou disseminarem genes de resistência a antibióticos para linhagens de origem clínica e não clínica (Fig. 12 – grupos I e J).

Diferentemente do PFGE (Fig. 2), os dados do sequenciamento do genoma completo sugerem que em relação às linhagens isoladas de humanos, também possa haver mais de um subtipo predominante circulante no país (Fig. 12).

Ashton e colaboradores (2015) utilizaram o sequenciamento do genoma completo para investigar um surto de *Salmonella* Typhimurium DT8 ocorrido no verão de 2013, no Estado de Jersey (uma ilha pertencente ao Reino Unido). Um total de 21 casos humanos foram confirmados e as investigações epidemiológicas relacionaram o surto devido a maionese. Os dados mostraram que os isolados, incluindo os de origem alimentar, foram alocados em um grupo monofilético. Os autores concluem que o sequenciamento do genoma completo pode ser muito útil na confirmação do agente causador de surtos quando os isolados de origem clínica e alimentar estão disponíveis.

Mohammed & Cormican (2015) utilizaram o sequenciamento do genoma completo para caracterizar as diferenças na susceptibilidade a fagos de dois fagotipos de *S. Typhimurium*, DT8 e DT30. No esquema de fagotipagem são utilizados 30 fagos. O fagotipo DT8 é susceptível a 11 fagos e o fagotipo DT30 é resistente a todos os fagos utilizados no esquema de fagotipagem exceto a um fago. Ambos fagotipos foram associados a um único surto de origem alimentar na Irlanda entre 2009 e 2011. O fagotipo DT8 carrega um genoma acessório representado por um plasmídeo de virulência, esse plasmídeo não foi detectado na DT30. Por outro lado, a DT30 carrega uma ilha genômica única similar ao elemento conjugativo integrativo (ECI) de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) e codifica um sistema de secreção do tipo IV. Essa ilha não foi detectada na DT8. Os autores sugerem que a diferença dos fagotipos possa estar associada a aquisição do ECI na DT30 e a perda do plasmídeo que pode estar associado a resistência a quase todos os fagos utilizados no esquema de fagotipagem.

Dessa forma, o sequenciamento do genoma completo pôde fornecer importantes informações genéticas e epidemiológicas de linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de surtos e casos esporádicos.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- A grande prevalência de genes de virulência nas linhagens de *S. Typhimurium* estudadas reforça o potencial das mesmas causarem doenças em humanos, bem como, os riscos de sua presença em alimentos, animais para consumo humano e ambiente;
- A ocorrência de *S. Typhimurium* multi-droga resistentes isoladas de alimentos diversos e de suínos para consumo é um alerta para o possível risco de humanos ingerirem alimentos contaminados por tais linhagens;
- Na comparação das linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos, os resultados de PFGE, ERIC-PCR, MLVA e CRISPR-MVLST sugerem que as linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos eram geneticamente mais diversificadas antes de 1990 em comparação aos isolados após esse período, o que pode sugerir a seleção de um subtipo de *S. Typhimurium* mais adaptado depois que *S. Enteritidis* tornou-se a sorovariedade de maior ocorrência após meados da década de 90 no Brasil;
- Os resultados de PFGE, MLVA, ERIC-PCR e CRISPR-MVLST sugerem que, em relação às linhagens isoladas de alimentos, ocorreu a circulação de mais de um subtipo prevalente no Brasil. Ademais, as linhagens MDR isoladas de alimentos são um alerta do possível risco de humanos ingerirem alimentos contaminados por tais linhagens;
- Na comparação das linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos, as metodologias de PFGE e CRISPR-MVLST foram capazes de agrupar as linhagens isoladas de humanos de acordo com seu perfil de resistência e, portanto forneceram informações epidemiológicas adicionais em comparação ao ERIC-PCR e MLVA;
- Na comparação das linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos, suínos e ambiente do suíno, os resultados de genotipagem por PFGE, ERIC-PCR e MLVA sugerem que algumas linhagens isoladas de suínos e humanos podem descender de um subtipo comum. As linhagens MDR isoladas de suínos saudáveis e do ambiente de

suínos alertam para o possível risco de porcos usados para consumo contaminarem humanos, o ambiente e outros porcos;

- Os resultados de MLST sugerem que a maioria das linhagens estudadas de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e alimentos no Brasil possuem uma origem filogenética em comum com as linhagens da mesma sorovariedade isoladas de diversas fontes em diferentes locais do mundo;
- Os resultados obtidos a partir do sequenciamento do genoma completo sugerem que as linhagens isoladas de humanos antes de meados de 1990 eram mais resistentes a antimicrobianos do que as isoladas após esse período. Também alerta para o possível risco de linhagens MDR isoladas de alimentos contaminarem humanos e/ou disseminarem genes de resistência a antibióticos para linhagens de origens clínicas e não clínicas;
- Os dados do sequenciamento do genoma completo sugerem que em relação às linhagens isoladas de humanos e alimentos houve a circulação de mais de um subtipo prevalente no país.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTMAN, M. et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 6, p. e1002776, 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22737074> >.

ALLARD, M. W. et al. High resolution clustering of *Salmonella enterica* serovar Montevideo strains using a next-generation sequencing approach. **BMC Genomics**, v. 13, p. 32, 2012. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260654> >.

ALMEIDA, F. et al. Genotypic diversity, pathogenic potential and the resistance profile of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983-2013 in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 64, p. 1395-1407, Aug 2015. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26307078> >.

ALMEIDA, F. et al. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 19, p. 145-51, Oct 2013. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23860124> >.

ALMOFTI, Y. A. et al. Impact of erythromycin resistance on the virulence properties and fitness of *Campylobacter jejuni*. **Microb Pathog**, v. 50, n. 6, p. 336-42, Jun 2011. ISSN 1096-1208. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377522> >.

ARBEIT, R. D. et al. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. **J Infect Dis**, v. 161, n. 2, p. 230-5, Feb 1990. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967621> >.

ASHTON, P. M. et al. Whole Genome Sequencing for the Retrospective Investigation of an Outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 8. **PLoS Curr**, v. 7, 2015. ISSN 2157-3999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713745> >.

AĞIN, H. et al. The evaluation of clusters of hospital infections due to multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the neonatal unit: a two-year experience. **Turk J Pediatr**, v. 53, n. 5, p. 517-21, 2011 Sep-Oct 2011. ISSN 0041-4301. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22272451> >.

BACHMANN, N. L. et al. Genome analysis and CRISPR typing of *Salmonella enterica* serovar Virchow. **BMC Genomics**, v. 15, p. 389, 2014. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24885207> >.

BESSA, M. C. et al. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. **Res Vet Sci**, v. 83, n. 3, p. 302-10, Dec 2007. ISSN 0034-5288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17336354> >.

BEST, E. L. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium: comparison of isolates from pigs, poultry and cases of human gastroenteritis. **J Appl Microbiol**, v. 103, n. 3, p. 565-72, Sep 2007. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714389> >.

BLONDEL, C. J. et al. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. **BMC Genomics**, v. 10, p. 354, 2009. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19653904> >.

CAMPIONI, F. et al. MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among *S. Enteritidis* strains isolated from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American strains. **Int J Food Microbiol**, v. 162, n. 2, p. 174-81, Mar 2013. ISSN 1879-3460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416553> >.

CAMPIONI, F.; FALCÃO, J. P. Genotyping of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains from clinical and nonclinical origins by pulsed-field gel electrophoresis. **Can J Microbiol**, v. 60, n. 6, p. 419-24, Jun 2014. ISSN 1480-3275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24869470> >.

CAMPIONI, F.; MORATTO BERGAMINI, A. 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 Microbiol**, v. 32, n. 2, p. 254-64, Dec 2012. ISSN 1095-9998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986188> >.

CAMPIONI, F. et al. Comparison of four molecular methods to type *Salmonella* Enteritidis strains. **APMIS**, v. 123, n. 5, p. 422-6, May 2015. ISSN 1600-0463. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703542> >.

CAMPIONI, F.; ZOLDAN, M. M.; FALCÃO, J. P. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. **Epidemiol Infect**, p. 1-8, Mar 2014. ISSN 1469-4409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625654> >.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, p. 319 – 328, 2005.

CAO, G. et al. Phylogenetics and differentiation of *Salmonella* Newport lineages by whole genome sequencing. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55687, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23409020> >.

CDC a. Chicago, GA. 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>.

CDC b. Chicago, GA. 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/index.html>.

CDC c. Chicago, GA. 2015. Disponível em: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid_fever/.

COSTA, R. G. et al. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. **J Food Prot**, v. 76, n. 12, p. 2011-7, Dec 2013. ISSN 1944-9097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24290674> >.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

DAVIS, S. et al. CFSAN SNP Pipeline: an automated method for constructing SNP matrices from next-generation sequence data **Peer J Computer Science**, v. 1, n. e20, p. 1-11, 2015.

DENG, X. et al. Comparative analysis of subtyping methods against a whole-genome-sequencing standard for *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 212-8, Jan 2015. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378576> >.

DIMARZIO, M. et al. Antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium associates with CRISPR sequence type. **Antimicrob Agents Chemother**, Jun 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796925> >.

DOS REIS, E. M. et al. Prevalence of R-type ACSSuT in strains of *Salmonella* serovar Typhimurium DT193 isolated from human infections in Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 29, n. 6, p. 387-92, Jun 2011. ISSN 1680-5348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829960> >.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **The EFSA Journal**. 13 (1), 2015.

FABRE, L. et al. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36995, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22623967> >.

FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K.; LOGUE, C. M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 5, p. 2215-9, May 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15872244> >.

FEASEY, N. A. et al. Drug resistance in *Salmonella enterica* ser. Typhimurium bloodstream infection, Malawi. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 11, p. 1957-9, Nov 2014. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25340988> >.

FERNANDES, S. A. et al. CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 15, n. 4, p. 317-21, Dec 2009. ISSN 1931-8448. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857139> >.

FERNANDES et al. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-84, 2006 Jul-Aug 2006. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17119671> >.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 2, p. 308-41, Apr 2013. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554419> >.

GARDY, J. L. et al. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. **N Engl J Med**, v. 364, n. 8, p. 730-9, Feb 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345102> >.

GHILARDI, A. C.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulse types of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 281-6, May 2006. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862323> >.

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 7, p. 866-75, Oct 2010. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20692376> >.

HARRIS, S. R. et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. **Science**, v. 327, n. 5964, p. 469-74, Jan 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093474> >.

HEIR, E. et al. Molecular epidemiology of *Salmonella* Typhimurium isolates from human sporadic and outbreak cases. **Epidemiol Infect**, v. 128, n. 3, p. 373-82, Jun 2002. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12113480> >.

HENDRIKSEN, R. S. et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 8, p. 887-900, Aug 2011. ISSN 1556-7125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21492021> >.

HOFER, E.; DOS REIS, E. M. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 36, n. 1, p. 7-9, 1994 Jan-Feb 1994. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7997777> >.

HOFFMANN, M. et al. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. **Genome Biol Evol**, v. 6, n. 5, p. 1046-68, May 2014. ISSN 1759-6653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24732280> >.

HOLT, K. E. et al. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. **Nat Genet**, v. 40, n. 8, p. 987-93, Aug 2008. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18660809> >.

HOPKINS, K. L. et al. Stability of multiple-locus variable-number tandem repeats in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 9, p. 3058-61, Sep 2007. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609320> >.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**, v. 327, n. 5962, p. 167-70, Jan 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056882> >.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 11, p. 2465-6, Nov 1988. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3069867> >.

HUR, J. et al. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. **Can J Vet Res**, v. 75, n. 1, p. 49-56, Jan 2011. ISSN 0830-9000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21461195> >.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol**, v. 165, n. 7, p. 526-30, Sep 2014. ISSN 1769-7123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25049166> >.

KICH, J. D. et al. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **Int J Food Microbiol**, v. 151, n. 3, p. 307-13, Dec 2011. ISSN 1879-3460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024043> >.

KIDGELL, C. et al. *Salmonella* Typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. **Infect Genet Evol**, v. 2, n. 1, p. 39-45, Oct 2002. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12797999> >.

KOTETISHVILI, M. et al. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 5, p. 1626-35, May 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980932> >.

KRAWIEC, M. et al. Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. **BMC Vet Res**, v. 11, p. 15, 2015. ISSN 1746-6148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25636375> >.

KRUY, S. L.; VAN CUYCK, H.; KOECK, J. L. Multilocus variable number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 4, p. 465-73, Apr 2011. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153561> >.

LARSSON, J. T. et al. Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). **Euro Surveill**, v. 14, n. 15, 2009. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19371515> >.

LEEKITCHAROENPHON, P. et al. Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87991, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24505344> >.

LEY, B. et al. Invasive *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections, Democratic Republic of the Congo, 2007-2011. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 4, p. 701-4, Apr 2014. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655438> >.

LINDSTEDT, B. A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. **Electrophoresis**, v. 26, n. 13, p. 2567-82, Jun 2005. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937984> >.

LINDSTEDT, B. A. et al. DNA fingerprinting of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA). **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 2, p. 12, Dec 2003. ISSN 1476-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14664722> >.

LINDSTEDT, B. A. et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. **J Microbiol Methods**, v. 59, n. 2, p. 163-72, Nov 2004. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15369852> >.

LIU, F. et al. Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 6, p. 1946-56, Mar 2011. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278266> >.

LOPES, G. V. et al. Resistance Phenotypes and Genotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Isolates from Feed, Pigs, and Carcasses in Brazil. **J Food Prot**, v. 78, n. 2, p. 407-13, Feb 2015. ISSN 1944-9097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25710159> >.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **J Bacteriol**, v. 174, n. 14, p. 4525-9, Jul 1992. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1624445> >.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 6, p. 3140-5, Mar 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501229> >.

MAJOWICZ, S. E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 6, p. 882-9, Mar 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20158401> >.

MARCUS, S. L. et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes Infect**, v. 2, n. 2, p. 145-56, Feb 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742687> >.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-80, Sep 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056220> >.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 2, p. 560-4, Feb 1977. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/265521> >.

MOHAMMED, M.; CORMICAN, M. Whole genome sequencing provides possible explanations for the difference in phage susceptibility among two *Salmonella* Typhimurium phage types (DT8 and DT30) associated with a single foodborne outbreak. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 728, 2015. ISSN 1756-0500. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26613761> >.

NADON, C. A. et al. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. **Euro Surveill**, v. 18, n. 35, p. 20565, 2013. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008231> >.

NAIR, A. et al. Biofilm formation and genetic diversity of *Salmonella* isolates recovered from clinical, food, poultry and environmental sources. **Infect Genet Evol**, v. 36, p. 424-33, Dec 2015. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26292170> >.

NATARO, J. P. et al. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9 ed. Washington: ASM Press, 2007. V. 1, Cap. 43, p. 670-687.

NGOI, S. T. et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from human, food, and animal sources in Malaysia. **Jpn J Infect Dis**, v. 66, n. 3, p. 180-8, 2013. ISSN 1884-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23698477> >.

NURK, S. et al. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. **J Comput Biol**, v. 20, n. 10, p. 714-37, Oct 2013. ISSN 1557-8666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24093227> >.

OKORO, C. K. et al. Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. **Nat Genet**, v. 44, n. 11, p. 1215-21, Nov 2012. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023330> >.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1661-9, Jun 1999. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10325304> >.

OLSEN, S. J. et al. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infection from milk contaminated after pasteurization. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 5, p. 932-5, May 2004. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15200835> >.

PALHARES, J. C. et al. *Salmonella* and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. **Sci Total Environ**, v. 472, p. 654-61, Feb 2014. ISSN 1879-1026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24317171> >.

PEREIRA, C. S. et al. Phage typing and multidrug resistance profile in *S. Typhimurium* isolated from different sources in Brazil from 1999 to 2004. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 385-390, 2007.

PRENDERGAST, D. M. et al. Application of multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA), phage typing and antimicrobial susceptibility testing to subtype *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pig farms, pork slaughterhouses and meat producing plants in Ireland. **Food Microbiol**, v. 28, n. 5, p. 1087-94, Aug 2011. ISSN 1095-9998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569956> >.

RAFFATELLU, M. et al. Clinical pathogenesis of typhoid fever. **J Infect Dev Ctries**, v. 2, n. 4, p. 260-6, 2008. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19741286> >.

REEVES, P. Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. **Trends Genet**, v. 9, n. 1, p. 17-22, Jan 1993. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8434412> >.

RIBOT, E. M. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog Dis**, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006. ISSN 1535-3141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16602980> >.

ROWLANDS, R. E. et al. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 56, n. 6, p. 461-7, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25351537> >.

RYCHLIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. **Vet Microbiol**, v. 112, n. 1, p. 1-10, Jan 2006. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16303262> >.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968> >.

SANTOS, R. L. et al. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 1, p. 3-12, Jan 2003. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12532221> >.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 7-15, Jan 2011. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192848> >.

SCHLOSS, J. A. How to get genomes at one ten-thousandth the cost. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 10, p. 1113-5, Oct 2008. ISSN 1546-1696. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846084> >.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, May 1984. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6373014> >.

SHAH, D. H. et al. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 5, p. 1428-45, May 2011. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292746> >.

SHARIAT, N. et al. The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. **Food Microbiol**, v. 34, n. 1, p. 164-73, May 2013. ISSN 1095-9998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498194> >.

SHARIAT, N. et al. Subtyping of *Salmonella enterica* serovar Newport outbreak isolates by CRISPR-MVLST and determination of the relationship between CRISPR-MVLST and PFGE results. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 7, p. 2328-36, Jul 2013. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23678062> >.

SHARIAT, N. et al. CRISPR-MVLST subtyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Heidelberg and application in identifying outbreak isolates. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 254, 2013. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24219629> >.

SHARIAT, N. et al. Characterization and evolution of *Salmonella* CRISPR-Cas systems. **Microbiology**, v. 161, n. Pt 2, p. 374-86, Feb 2015. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25479838> >.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, p. 688, 1949.

SOREK, R.; KUNIN, V.; HUGENHOLTZ, P. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 3, p. 181-6, Mar 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18157154> >.

SOREK, R.; LAWRENCE, C. M.; WIEDENHEFT, B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. **Annu Rev Biochem**, v. 82, p. 237-66, 2013. ISSN 1545-4509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23495939> >.

SU, L. H.; CHIU, C. H. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Med J**, v. 30, n. 3, p. 210-9, 2007 May-Jun 2007. ISSN 2072-0939. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17760271> >.

SUN, J. et al. The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella* Typhimurium in guangdong, china, 2007-2011. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113145, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25380053> >.

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta-o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>, 2015.

TAMANG, M. D. et al. Antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from healthy and diseased pigs in Korea. **J Food Prot**, v. 77, n. 9, p. 1481-6, Sep 2014. ISSN 1944-9097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25198838> >.

TAUNAY, A. E. et al. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 2, p. 119-27, 1996 Mar-Apr 1996. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9071031> >.

TAVECHIO, A. T. et al. Tracing lineage by phenotypic and genotypic markers in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 1,4,[5],12:i:- and *Salmonella* Typhimurium isolated in state of São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1042-6, Nov 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027476> >.

TAVECHIO, A. T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 5, p. 315-22, 1996 Sep-Oct 1996. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293072> >.

TAVECHIO, A. T. et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **J Food Prot**, v. 65, n. 6, p. 1041-4, Jun 2002. ISSN 0362-028X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12092719> >.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2233-9, Sep 1995. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7494007> >.

TIMME, R. E. et al. Phylogenetic diversity of the enteric pathogen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inferred from genome-wide reference-free SNP characters. **Genome Biol Evol**, v. 5, n. 11, p. 2109-23, 2013. ISSN 1759-6653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24158624> >.

TINDALL, B. J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 55, n. Pt 1, p. 521-4, Jan 2005. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653930> >.

TORPDAHL, M. et al. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. **J Microbiol Methods**, v. 63, n. 2, p. 173-84, Nov 2005. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226640> >.

TOUCHON, M.; ROCHA, E. P. The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11126, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559554> >.

TURKI, Y. et al. Molecular typing, antibiotic resistance, virulence gene and biofilm formation of different *Salmonella enterica* serotypes. **J Gen Appl Microbiol**, v. 60, n. 4, p. 123-30, 2014. ISSN 1349-8037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25273985> >.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 10, p. 479-87, Oct 2003. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557031> >.

VAN BELKUM, A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 22-7, Feb 2007. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266711> >.

VAN DIJK, E. L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends Genet**, v. 30, n. 9, p. 418-26, Sep 2014. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108476> >.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 24, p. 6823-31, Dec 1991. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1762913> >.

VIOTT, A. M. et al. The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. **Braz J Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 145-51, 2013. ISSN 1517-8382. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24159297> >.

WANG, Y. P. et al. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA*, growth and intracellular invasion and survival. **Vet Microbiol**, v. 133, n. 4, p. 328-34, Feb 2009. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762392> >.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 6, p. 1156-68, Jun 2006. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533821> >.

WUYTS, V. et al. MLVA as a tool for public health surveillance of human *Salmonella* Typhimurium: prospective study in Belgium and evaluation of MLVA loci stability. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84055, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24391880> >.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2640-4, Nov 2012. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782487> >.