

**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**

## 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.

# *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 z<sub>1</sub>, z<sub>2</sub>, z<sub>3</sub>, 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 quimioestáticos. Em resposta ao estímulo quimioestático, 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<sup>+</sup> 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 conseqüentemente 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 tetracionato 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 nalidixico, 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).

*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/](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> >.