

**Caracterização molecular e fenotípica de linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:-  
isoladas predominantemente no Estado de São Paulo entre 1983 e 2020**

Giovana do Nascimento Pereira

Ribeirão Preto  
2023

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Caracterização molecular e fenotípica de linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:-  
isoladas predominantemente no Estado de São Paulo entre 1983 e 2020**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

**Orientada:** Giovana do Nascimento Pereira

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Pfrimer Falcão

Ribeirão Preto  
2023

<b>PEREIRA, G.N.</b>	<b>Caracterização molecular e fenotípica de linhagens de <i>Salmonella</i> 1,4, [5], 12:i:- isoladas predominantemente no Estado de São Paulo entre 1983 e 2020</b>		MESTRADO FCFRPUSP 2023
--------------------------	---	--	------------------------------

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

**Pereira, Giovana do Nascimento**

Caracterização molecular e fenotípica de linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- isoladas predominantemente no Estado de São Paulo entre 1983 e 2020. Ribeirão Preto, 2023.

114 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia aplicados à Farmácia

Orientador: **Falcão, Juliana Pfrimer**

1. *Salmonella* monofásica. 2. Potencial patogênico. 3. Diversidade genotípica. 4. Resistência a antimicrobianos.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Giovana do Nascimento Pereira

Caracterização molecular e fenotípica de linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- isoladas predominantemente no Estado de São Paulo entre 1983 e 2020

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia aplicados à Farmácia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Juliana Pfrimer Falcão

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho a todos os professores que me influenciaram durante a minha trajetória. Em especial à minha professora de português Paula Vanessa Nunes Gonçalves (in memoriam), que sempre será uma das minhas maiores inspirações na docência.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar e iluminar o meu caminho durante todo o desenvolvimento deste trabalho, onde sempre houve esperança, amor e fé no meu coração.

À minha família, em especial aos meus pais, Jaime e Liromar, por todo amor e carinho, por sempre me apoiarem, por me permitirem seguir meus sonhos, por me incentivarem e por entenderem a minha ausência em muitos momentos. Vocês são tudo para mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão, por ter sido tão acolhedora desde o primeiro contato, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelo carinho e pela confiança no meu trabalho. Sou muito grata por ser sua aluna.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP: Carolina Nogueira Gomes, Fábio Campioni, Felipe Pinheiro Vilela, Júlia Cunha Gonzales e Melina da Cruz Antunes Miranda, muito obrigada pelo aprendizado, pela ajuda com os experimentos, pelas sugestões, pelas discussões científicas, pela paciência e por sempre me ouvirem no laboratório.

À minha amiga e colega de profissão, Amanda Seribelli, por me ajudar com este trabalho desde o início, pelos conselhos, pelas colaborações, pelos ensinamentos e pelos bons momentos juntas.

À Miliane Rodrigues Frazão, por todo apoio e proteção, pelos momentos de diversão e por ter sido minha melhor companhia no início do mestrado.

Aos meus afilhados Thaís e Gabriel e ao meu sobrinho Miguel, pelos melhores abraços, pelo carinho e por tantos momentos repletos de amor. Vocês são os amores da minha vida.

Aos meus amigos, por todo apoio e companheirismo, em especial aos que estiveram comigo durante o decorrer do mestrado, Micaela Ramos, Rafael Rosa e Thaís Milan. Obrigada por serem âncoras que me salvaram durante essa etapa da minha vida.

À Marcela Siqueira Gonçalves e a Eliane Pereira Figueiredo, pelo apoio técnico no decorrer deste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Regina Von Zeska Kress e a Ludmila Tonani, pela colaboração com a análise da virulência em *Galleria mellonella*.

À Priscila Souza, por toda ajuda com as apresentações em inglês no decorrer do mestrado e pelos momentos de descontração juntas.

À Dra. Marta Inês Cazentini Medeiros do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, à Dra. Monique Ribeiro Tiba Casas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e à Dra. Dália dos Prazeres

Rodrigues da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, pela concessão das linhagens estudadas neste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues pelo uso do sequenciador no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP, pelos esforços em oferecer sempre as melhores oportunidades científicas e acadêmicas.

Aos funcionários da FCFRP-USP, em especial aos funcionários da pós-graduação, Ana Lúcia Turatti, Henrique Theodoro e às funcionárias de limpeza do bloco S.

Às servidoras técnicas Maraísa Palhão Verri e Sônia Aparecida Carvalho Dreossi, por toda ajuda, uso de equipamentos, pelo carinho e pelos bons momentos nos corredores do bloco S.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro. Processos n° 2019/19338-8 e n° 2022/07013-0.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Finalmente agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

*“O mundo está nas mãos daqueles que tem a coragem de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos”*

**Paulo Coelho**

## RESUMO

PEREIRA, G. N. **Caracterização molecular e fenotípica de linhagens de *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- isoladas predominantemente no Estado de São Paulo entre 1983 e 2020.** 2023. 114f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A salmonelose é uma das principais doenças diarreio gênicas transmitidas por alimentos contaminados. *Salmonella* 1,4,[5],12:i:-, uma variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium tem sido associada a casos de gastroenterite em humanos e animais em diferentes países. No Brasil, *S.* 1,4,[5],12:i:- foi identificada como uma das principais sorovariedades isoladas no Estado de São Paulo. Entretanto, há poucos estudos que analisaram o potencial patogênico, o perfil de resistência a antimicrobianos e a diversidade genotípica de tal variante no país. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar molecularmente e fenotipicamente linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- isoladas predominantemente no Estado de São Paulo, Brasil. Para isso, foram analisadas 113 linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- isoladas de humanos (n=99), animais (n=7), alimentos (n=5) e ambiente (n=2) no período de 1983 a 2020. A frequência de 11 genes de virulência foi pesquisada por PCR e o teste de susceptibilidade frente a 13 antimicrobianos foi realizado por disco difusão para todas as linhagens. Em linhagens fenotipicamente resistentes às fluoroquinolonas foram pesquisados genes de resistência plasmidiais e mutações em regiões determinantes de resistência as quinolonas. A tipagem molecular foi realizada por PFGE e ERIC-PCR para todas as linhagens. Além disso, 40 linhagens isoladas de humanos (n=26) e de fonte não humana (n=14) foram tipadas por MLST e caracterizadas fenotipicamente quanto à sobrevivência ao *stress* ácido e oxidativo. A análise de virulência em *Galleria mellonella* foi realizada para 20 linhagens selecionadas e os resultados obtidos dos ensaios de sobrevivência em condições de *stress*, assim como os de virulência em *G. mellonella* foram comparados com dados de linhagens de *S.* Typhimurium isoladas no país. Todos os genes associados à virulência analisados foram detectados em mais de 91% das linhagens estudadas, sendo os de maior ocorrência *invA* (100%), *flgK* (99,11%), *sipD* e *sopB* (98,23%). Das 113 linhagens estudadas, 54,87% foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. As maiores taxas de resistência observadas foram frente à ampicilina (51,33%), ácido nalidíxico (39,82%) e tetraciclina (38,05%). Ademais, 39 (34,51%) linhagens apresentaram um perfil Multidroga Resistente (MDR). As nove linhagens resistentes as fluoroquinolonas apresentaram mutação no gene *gyrA* e a presença do gene *qnrB*. O dendrograma de similaridade genética do PFGE agrupou as linhagens em quatro *clusters* denominados PFGE-A a PFGE-D. O *cluster* que agrupou o maior número de linhagens foi o PFGE-A, onde foram alocadas 86 (76,1%) linhagens isoladas de humanos, alimentos, animais e ambiente entre 1983 e 2020 com  $\geq 79,5\%$  de similaridade genética. O dendrograma de similaridade genética do ERIC-PCR agrupou as linhagens em dois *clusters* nomeados ERIC-A e ERIC-B. O principal *cluster* foi o ERIC-A que agrupou 104 (92%) linhagens isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente com  $\geq 80,1\%$  de similaridade genética entre si. Todas as 40 linhagens isoladas de humanos e de fonte não humana tipadas por MLST foram pertencentes ao ST19 e sobreviveram ao *stress* ácido após 10 minutos e 1 hora de exposição. No *stress* oxidativo, todas as 40 linhagens sobreviveram após 10 minutos e 36 sobreviveram após 1 hora de exposição. Adicionalmente, na análise de virulência em *G. mellonella*, nove linhagens isoladas de fonte não humana e seis linhagens isoladas de humanos demonstraram perfis de alta virulência a virulência intermediária. Em conclusão, o potencial patogênico das linhagens estudadas foi evidenciado pela alta frequência de todos os genes associados à virulência pesquisados. Linhagens MDR foram detectadas e são preocupantes e alertam para a importância de

um monitoramento constante da resistência. Os resultados do PFGE e ERIC-PCR sugeriram que a maioria das linhagens estudadas pertencem a um *cluster* prevalente ao longo de décadas no Estado de São Paulo e a circulação dessa sorovariedade entre fontes clínicas e não clínicas. Todas as linhagens estudadas descendem de um precursor comum pertencente ao ST19, sugerindo uma relação filogenética mais próxima a *S. Typhimurium* do que linhagens de *Salmonella* monofásica do ST34 isoladas em outros países. As linhagens de S.1,4, [5],12:i:- isoladas de humanos e de fonte não humana sobreviveram com sucesso em condições desfavoráveis presentes no trato gastrointestinal dos hospedeiros e apresentaram taxa de sobrevivência semelhante a *S. Typhimurium*. Finalmente, linhagens isoladas de fontes não humanas apresentaram maior proporção de isolados com perfil de virulência alto a intermediária em *G. mellonella* comparado a isolados de humanos, diferindo dos resultados encontrados em *S. Typhimurium* e sugerindo uma possível diferença entre essas sorovariedades geneticamente relacionadas.

**Palavras-chaves:** *Salmonella* monofásica, potencial patogênico, diversidade genotípica, resistência a antimicrobianos.

## ABSTRACT

PEREIRA, G. N. **Molecular and phenotypic characterization of *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- strains predominantly isolated in the State of São Paulo between 1983 and 2020.** 2023. 114f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Salmonellosis is one of the main diarrheagenic diseases transmitted by contaminated food. *Salmonella* 1,4, [5],12:i:-, a monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium has been associated with gastroenteritis cases in humans and animals in different countries. In Brazil, *S.* 1,4,[5],12:i:- was identified as one of the most prevalent serovars isolated in the State of São Paulo. However, there are few studies that analyzed the pathogenic potential, the antimicrobial resistance profile and the genotypic diversity of this variant in this country. Therefore, this study aimed to characterize molecularly and phenotypically *S.* 1,4, [5],12:i:- strains predominantly isolated in the State of São Paulo, Brazil. For this, 113 *S.* 1,4, [5],12:i:- strains isolated from humans (n=99), animals (n=7), food (n=5) and the environment (n= 2) from 1983 to 2020 were analyzed. The frequency of 11 virulence genes was investigated by PCR and the susceptibility testing against 13 antimicrobials was performed by the disk diffusion method for all strains. In phenotypically fluoroquinolone resistant strains, plasmidial resistance genes and mutations in quinolone resistance-determining regions were searched. Molecular typing was performed by PFGE and ERIC-PCR for all strains. In addition, 40 strains isolated from humans (n=26) and non-human sources (n=14) were MLST typed and phenotypically characterized for survival to acid and oxidative stress. The virulence analysis in *Galleria mellonella* was performed for 20 selected strains and the results obtained from the survival assays under stress conditions, as well as those of virulence in *G. mellonella* were compared to data of *S.* Typhimurium strains isolated in this country. All virulence genes searched were detected in more than 91% of the strains studied, being the most frequent ones *invA* (100%), *flgK* (99,11%), and *sipD* and *sopB* (98,23%). Of the total of 113 strains studied, 54.87% strains were resistant to at least one tested antimicrobial. The highest resistance rates found were against ampicillin (51.33%), nalidixic acid (39.82%) and tetracycline (38.05%). Moreover, 39 (34.51%) strains were classified as Multi Drug Resistant (MDR). The nine fluoroquinolones resistant strains showed the *gyrA* mutation and the *qnrB* gene presence. The PFGE dendrogram allocated the strains in four clusters named PFGE-A to PFGE-D. The cluster that grouped the highest number of strains was PFGE-A, where 86 (76.1%) strains isolated from humans, food, animals, and the environment from 1983 to 2020 were allocated with  $\geq 79.5\%$  of genetic similarity. The ERIC-PCR dendrogram allocated the strains in two clusters named ERIC-A and ERIC-B. The main cluster was ERIC-A which grouped 104 (92%) strains isolated from humans, animal, food and the environmental with  $\geq 80.1\%$  of genetic similarity. All 40 strains isolated from humans and non-human sources were typed as ST19 by MLST and survived to acid stress after 10 minutes and 1 hour of exposure. In oxidative stress, all 40 strains survived after 10 minutes and 36 survived after 1 hour of exposure. Additionally, in the virulence analysis in *G. mellonella*, nine isolates from non-human sources and six strains isolated from humans showed high virulence to intermediate virulence profiles. In conclusion, the pathogenic potential of the strains studied was corroborated by the high frequency of all virulence related genes searched. MDR strains were detected and are worrying being an alert for the importance of constant monitoring of resistance. The PFGE and ERIC-PCR results suggested that most of the strains studied belong to a prevalent cluster over decades in the State of São Paulo and the circulation of this serovar between clinical and non-clinical sources. All strains studied descend from a common precursor belonging to ST19, suggesting a closer phylogenetic relationship to *S.* Typhimurium than with monophasic *Salmonella* ST34 strains isolated in other countries. The *S.* 1,4, [5],12:i:- strains isolated from humans and non-

human sources successfully survived to the unfavorable conditions found in the human gastrointestinal tract and presented a survival rate similar to *S. Typhimurium*. Finally, strains isolated from non-human sources showed a higher proportion of isolates with a high to intermediate virulence profile in *G. mellonella* compared to human isolates, differing from the results found for *S. Typhimurium* and suggesting a possible difference between these genetically related serovars.

**Keywords:** Monophasic *Salmonella*, pathogenic potential, genotypic diversity, antimicrobial resistance.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo para o mecanismo do controle genético da variação de fase flagelar em *Salmonella* (adaptado de Yamamoto e Kutsukake, 2006) ..... 05
- Figura 2.** Gel representativo dos produtos da extração dos DNAs genômicos seguido de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 18, linhagens representativas de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:-: STMo 4977 (1); STMo 5043 (2); STMo 5129 (3); STMo 5459 (4); STMo 5566 (5); STMo 5692 (6); STMo 5697 (7); STMo 5725 (8); STMo 5727 (9); STMo 5729 (10); STMo 5857 (11); STMo 5882 (12); STMo 5913 (13); STMo 6032 (14); STMo 6050 (15); STMo 6054 (16); STMo 6078 (17); STMo 6102 (18)..... 44
- Figura 3.** Gel de agarose 1% representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- estudadas, digeridas com a enzima *Xba*I. M: Marcador de peso molecular (*Salmonella* Braenderup H9812 digerida com a enzima *Xba*I). Canaletas 1 a 12: Linhagens representativas de *S.* 1,4, [5],12:i:-: STMo 8142 (2); STMo 8162 (3); STMo 8384 (4); STMo 8412 (5); STMo 8431 (6); STMo 8431 (8); STMo 3079 (9); STMo 312 (10); STMo 374 (11); STMo 2444 (12) ..... 49
- Figura 4.** Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPMGA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de fragmentos obtido por PFGE para as 113 linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- estudadas. AMP = ampicilina; TET = tetraciclina; C = cloranfenicol; CTZ = ceftazidima; CTX = cefotaxima; FEP = cefepime; STX = sulfametoxazol-trimetropima; CIP = ciprofloxacina; IMP = imipenem; CN = gentamicina; NA = ácido nalidíxico; AMC = amoxicilina + ácido clavulânico..... 51
- Figura 5.** Gel de agarose 1,5% representativo do ensaio de ERIC-PCR de algumas linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- estudadas. M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 16: Linhagens representativas de *S.* 1,4, [5],12:i:- em duplicata: STMo 8142 (2); STMo 8162 (3); STMo 8384 (4); STMo 8412 (5); STMo 8431 (6); STMo 8431 (8); STMo 3079 (9); STMo 312 (10); STMo 374 (11); STMo 2444 (12) ..... 53
- Figura 6.** Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPMGA e coeficiente de similaridade DICE a partir do perfil de bandas obtido pela técnica de ERIC-PCR para as 113 linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- estudadas. AMP = ampicilina; TET = tetraciclina; C = cloranfenicol; CTZ = ceftazidima; CTX = cefotaxima; FEP = cefepime; STX = sulfametoxazol-trimetropima; CIP = ciprofloxacina; IMP = imipenem; CN = gentamicina; NA = ácido nalidíxico; AMC = amoxicilina + ácido clavulânico..... 54
- Figura 7.** Alinhamento e análise de sequências do gene *hemD* de uma das linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- estudada (STMo 2444) e da sequência padrão, pelo programa *ChromasPro*. Os retângulos cinzas indicam mutações pontuais..... 56

- Figura 8. Figura 8.** Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *GrapeTree* com os dados de 3674 *S. 1,4, [5],12:i:-* disponíveis no banco de dados até 24/01/2023 e com as 40 linhagens de *S. 1,4, [5],12:i:-* do Brasil tipadas no presente estudo de ST19 (amarelo)..... 57
- Figura 9.** Porcentagem de sobrevivência das 26 linhagens de *S. 1,4, [5], 12:i:-* isoladas de humanos e da linhagem controle *S. Typhimurium* ATCC 14028 após 10 minutos de *stress* ácido. \* $p < 0,05$ , calculado pelo teste t de Student..... 59
- Figura 10.** Porcentagem de sobrevivência das 26 linhagens de *S. 1,4, [5], 12:i:-* isoladas de humanos e da linhagem controle *S. Typhimurium* ATCC 14028 após 1 hora de *stress* ácido. \* $p < 0,05$ , calculado pelo teste t de Student..... 59
- Figura 11.** Porcentagem de sobrevivência das 14 linhagens de *S. 1,4, [5], 12:i:-* isoladas de fonte não humana e da linhagem controle *S. Typhimurium* ATCC 14028 após 10 minutos de *stress* ácido. \* $p < 0,05$ , calculado pelo teste t de Student..... 60
- Figura 12.** Porcentagem de sobrevivência das 14 linhagens de *S. 1,4, [5], 12:i:-* isoladas de fonte não humana e da linhagem controle *S. Typhimurium* ATCC 14028 após 1 hora de *stress* ácido. \* $p < 0,05$ , calculado pelo teste t de Student..... 61
- Figura 13.** Porcentagem de sobrevivência das 40 linhagens de *S. 1,4, [5], 12:i:-* isoladas de fonte humana e não humana e da linhagem controle *S. Typhimurium* ATCC 14028 após 10 minutos de *stress* oxidativo. \* $p < 0,05$ , calculado pelo teste t de Student..... 62
- Figura 14.** Porcentagem de sobrevivência das 40 linhagens de *S. 1,4, [5], 12:i:-* isoladas de fonte humana e não humana e da linhagem controle ATCC 14028 após 1 hora de *stress* oxidativo. \* $p < 0,05$ , calculado pelo teste t de Student..... 62
- Figura 15.** Porcentagem de sobrevivência de larvas de *Galleria Mellonella* infectadas com 10 linhagens de *Salmonella* 1,4, [5], 12:i:- isoladas de humanos e controles (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Typhimurium SL13440) após sete dias de experimento. Em vermelho: linhagens virulentas; em laranja: linhagens com virulência intermediária; em verde: linhagens com baixa virulência; em cinza: linhagens avirulentas..... 63
- Figura 16.** Porcentagem de sobrevivência de larvas de *Galleria Mellonella* infectadas com 10 linhagens de *Salmonella* 1,4, [5], 12:i:- isoladas de fonte não humana e controles (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Typhimurium SL13440) após sete dias de experimento. Em preto: linhagens com alta virulência; em vermelho: linhagens virulentas; em laranja: linhagens com virulência intermediária; em cinza: linhagens avirulentas..... 64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Número de sorovarietades identificadas em cada espécie e subespécie de <i>Salmonella</i> .....	03
<b>Tabela 2</b> – Informações sobre ano de isolamento, origem, material analisado e local de isolamento das 113 linhagens de S.1,4, [5],12:i:- estudadas, listadas em ordem cronológica.....	22
<b>Tabela 3</b> – <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para amplificação do fragmento intergênico <i>fliB-fliA</i> (1 Kb) e do gene <i>fljB</i> (1389 pb) .....	27
<b>Tabela 4</b> – Descrição dos reagentes utilizados na reconfirmação da sorovarietade por PCR e na pesquisa de genes de virulência.....	27
<b>Tabela 5</b> – <i>Primers</i> utilizados na pesquisa de genes de virulência por PCR, tamanho dos fragmentos amplificados e temperatura de hibridação.....	28
<b>Tabela 6</b> – Descrição dos <i>primers</i> , tamanhos dos <i>amplicons</i> , temperatura de hibridação e referências dos genes de resistência às fluoroquinolonas pesquisados.....	30
<b>Tabela 7</b> – Descrição dos <i>primers</i> , tamanhos dos <i>amplicons</i> , temperatura de hibridação e referências dos genes de resistência à $\beta$ -lactâmicos pesquisados.....	31
<b>Tabela 8</b> – Descrição dos <i>primers</i> , tamanhos dos <i>amplicons</i> , temperatura de hibridação e referências dos genes determinantes de resistência a quinolonas.....	32
<b>Tabela 9</b> – Descrição dos reagentes e concentrações utilizados nas reações de ERIC-PCR para as 113 linhagens de S. 1,4, [5],12:i:-.....	36
<b>Tabela 10</b> – Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes <i>housekeeping</i> utilizados na técnica de MLST.....	37
<b>Tabela 11</b> – Descrição dos reagentes e concentrações utilizados nas reações de PCR dos sete genes <i>housekeeping</i> na técnica de MLST.....	38
<b>Tabela 12</b> – Frequência dos 11 genes de virulência pesquisados nas 113 linhagens de <i>Salmonella</i> 1,4, [5],12:i:- estudadas.....	45
<b>Tabela 13</b> – Número de linhagens resistentes a cada um dos 13 antimicrobianos testados.....	46
<b>Tabela 14</b> – Perfil de resistência das 113 linhagens de S. 1,4, [5],12:i:- estudadas.....	47
<b>Tabela 15</b> – Frequência dos genes de resistência à fluoroquinolonas pesquisados nas nove linhagens de <i>Salmonella</i> 1,4, [5],12:i:- resistentes a ciprofloxacina e levofloxacina.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AMC</b>	Amoxicilina + ácido clavulânico
<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>ATCC</b>	Do ingles, <i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	Do ingles, <i>Brain Heart Infusion</i>
<b>C</b>	Cloranfenicol
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CDC</b>	Do ingles, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CLSI</b>	Do inglês, <i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
<b>CN</b>	Gentamicina
<b>CTZ</b>	Cefotaxima
<b>CTZ</b>	Cefotaxima
<b>D</b>	Índice de discriminação
<b>DLV</b>	Do ingles, <i>Double locus variant</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídeos trifosfatados
<b>D.O.</b>	Densidade óptica
<b>DTA</b>	Doença Transmitida por Alimento
<b>ECDC</b>	Do inglês, <i>European Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EFSA</b>	Do ingles, <i>European Food Safety Authority</i>
<b>ESBL</b>	Do inglês, <i>Extended Spectrum Beta-Lactamase</i>
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>FCFRP</b>	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
<b>FEP</b>	Cefepime
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>ERIC</b>	Do ingles, <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
<b>g</b>	Força de aceleração g
<b>h</b>	Hora

<b>IMP</b>	Imipenem
<b>IOC</b>	Instituto Oswaldo Cruz
<b>IRU</b>	Do inglês, <i>Intergenic Repeat Units</i>
<b>LB</b>	Do inglês, <i>Luria Bertani</i>
<b>MDR</b>	Multidroga resistente
<b>MH</b>	Mueller Hinton
<b>min</b>	Minutos
<b>MLST</b>	Do inglês, <i>Multilocus sequence typing</i>
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NA</b>	Ácido Nalidíxico
<b>NCBI</b>	Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCR</b>	Do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PMQR</b>	Do inglês, <i>Plasmid-mediated quinolone resistance</i>
<b>PFGE</b>	Do inglês, <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>QRDR</b>	Do inglês, <i>Quinolone resistance determining region</i>
<b>q.s.p.</b>	Quantidade suficiente para
<b>RNA</b>	Do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
<b>ROS</b>	Do inglês, Reactive oxygen species
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SLV</b>	Do inglês, <i>Single locus variant</i>
<b>SPI</b>	Do inglês, <i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
<b>spp.</b>	Espécies
<b>SST</b>	Sistema de Secreção Tipo
<b>ST</b>	<i>Sequence type</i>
<b>STMo</b>	<i>Salmonella</i> Typhimurium Monofásica
<b>STX</b>	Sulfametoxazol-trimetropima
<b>TAE</b>	Tris Acetato EDTA
<b>TBE</b>	Tris Borato EDTA
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TE</b>	Tris EDTA

<b>TET</b>	Tetraciclina
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>TSA</b>	Do ingles, <i>Tryptone Soya Agar</i>
<b>TSI</b>	Do ingles, <i>Triple Sugar Iron</i>
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UPGMA</b>	Do inglês, <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>WGS</b>	Do inglês, <i>whole-genome sequencing</i> , ou sequenciamento de genoma completo

**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
cm	Centímetro
%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
$\lambda$	Lambda
$\Sigma$	Somatório
$\geq$	Maior ou igual à
$\leq$	Menor ou igual à
-	Negativo
+	Positivo
$\mu\text{g}$	Micrograma (s)
$\mu\text{L}$	Microlitro (s)
HCl	Ácido clorídrico
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
Kb	Quilobase (s)
KDa	Quilodalton (s)
log	Logaritmo
mg	Miligrama (s)
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma (s)
nm	Nanômetro (s)
pH	Potencial hidrogeniônico
V	Volt (s)
X	Veze

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1. Gênero <i>Salmonella</i> .....	02
1.1.2. Classificação sorológica.....	03
1.1.3. Variação de fase flagelar.....	04
1.1.4. Transmissão, manifestações clínicas e patogênese.....	06
1.1.5. Tolerância a condições desfavoráveis.....	06
1.1.6. <i>Salmonella</i> 1,4, [5],12:i:- .....	07
1.2. Genes de virulência.....	09
1.3. Resistência aos antimicrobianos.....	10
1.4. Mecanismos de resistência.....	11
1.5. Métodos de tipagem bacteriana.....	12
1.5.1. <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	13
1.5.2. <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i> (ERIC).....	14
1.5.3. <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	14
1.6. <i>Galleria mellonella</i> .....	15
1.7. Relevância do estudo.....	16
<b>2. CONCLUSÕES.....</b>	<b>19</b>
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Gênero *Salmonella*

A salmonelose é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTAs) mais comuns e um grande problema de saúde pública (QAMAR; HUSSAIN; QURESHI, 2022). Na Europa, a *Salmonella* permanece como principal patógeno associado a surtos de origem alimentar e a salmonelose como segunda doença zoonótica mais comum, aquém apenas de casos de campilobacteriose, segundo dados da *European Food Safety Authority* (EFSA, 2022) e *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC, 2022) (PINEDO et al., 2022).

Nos Estados Unidos, segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) são estimados cerca de 1,35 milhões de infecções, 26.500 hospitalizações e 420 mortes por *Salmonella* anualmente (CDC, 2022). Já no Brasil, essa bactéria foi o agente etiológico mais identificado em casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) entre 2000 e 2021, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN-NET), disponibilizados no site do Ministério da Saúde (MARQUES; TRINDADE, 2022). Entretanto, considerando apenas a distribuição dos agentes etiológicos mais identificados nos surtos de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) no Brasil entre 2012 e 2021, *Salmonella* spp. foi o terceiro microrganismo mais isolado, responsável por 11,2% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, intracelulares facultativos, fermentadores de glicose, mesófilos, oxidase negativa e não formadores de esporos (ANDINO; HANNING, 2015; GUT et al., 2018; JANDA; ABBOTT, 2021). A denominação de tal gênero foi proposta em 1900 por Lignières, em homenagem ao bacteriologista norte-americano Daniel Elmer Salmon, o qual em 1884 isolou o microrganismo *Salmonella choleraesuis*, inicialmente denominado de *Bacillus choleraesuis*, pela primeira vez do intestino de um suíno (ELMI et al., 2021; KAZMI, 2022).

A nomenclatura e taxonomia de *Salmonella* são complexas e já sofreram diversas alterações. Atualmente, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) pode-se dividir o gênero em duas espécies denominadas *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é subdividida 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* (Tabela 1) (ENG et al., 2015; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014; JAJERE, 2019; OLUDAIRO et al., 2022).

*Salmonella* apresenta mais de 2.600 sorovariedades, as quais mais de 1.500 destas pertencem a *S. enterica* subsp. *enterica* e são predominantemente isoladas de mamíferos e associadas à 99% das infecções desse gênero em humanos e animais de sangue quente. Por outro lado, as demais subespécies de *S. enterica*, assim como a espécie *S. bongori* são geralmente isoladas de animais de sangue frio e ambiente (ENG *et al.*, 2015; ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014; JAJERE, 2019; OLUDAIRO *et al.*, 2022).

**Tabela 1** - Número de sorovariedades identificadas em cada espécie e subespécie de *Salmonella*.

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

Fonte: ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014

Entre as sorovariedades mais importantes como causadoras de doenças em humanos podem-se citar as sorovariedades *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (JAJERE, 2019; OLUDAIRO *et al.*, 2022; QAMAR; HUSSAIN; QURESHI, 2022). *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi* (A, B e C) são denominadas de sorovariedades tifoides e causam a febre entérica, uma infecção sistêmica em humanos. Por outro lado, as sorovariedades de *Salmonella* não-tifoides são responsáveis geralmente por causar casos de gastroenterites autolimitadas, associados a inflamação intestinal e diarreia, entretanto podem causar infecções extra intestinais (JAJERE, 2019; OLUDAIRO *et al.*, 2022; QAMAR; HUSSAIN; QURESHI, 2022).

### 1.1.1. Classificação sorológica

A classificação sorológica de *Salmonella* é realizada pelo esquema de Kaufmann e White, decorrente da sorotipagem do antígeno somático (O), do antígeno flagelar (H) e do antígeno capsular (Vi), esse último quando presente (BRENNER *et al.*, 2000). Entretanto,

essa classificação foi adotada apenas em 1966, assim rotineiramente, as sorovariedades mais isoladas não são identificadas por sua fórmula antigênica, mas por nomes que podem indicar onde foram primeiramente isoladas, como *S. Minnesota*, seu hospedeiro, como *S. Gallinarum* ou a síndrome que causam, como *S. Typhi*. As sorovariedades são escritas com primeira letra maiúscula e não em itálico (BRENNER *et al.*, 2000; CAMPOS, 2015, KADHIM, 2019).

Nas fórmulas antigênicas das sorovariedades de *Salmonella* obtidas a partir do esquema Kaufmann e White, os antígenos O são representados por números arábicos e responsáveis pela identificação dos sorogrupos desse gênero (CAMPOS, 2015; KADHIM, 2019). O antígeno Vi é encontrado apenas nas sorovariedades *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin* e apresenta apenas um tipo sorológico (ENG *et al.*, 2015; CAMPOS, 2015; KADHIM, 2019). Ademais, o antígeno H tem duas formas de expressão alternadas e são representadas por letras minúsculas do alfabeto e números arábicos, respectivamente (ENG *et al.*, 2015; CAMPOS, 2015; KADHIM, 2019).

### 1.1.2. Variação de fase flagelar

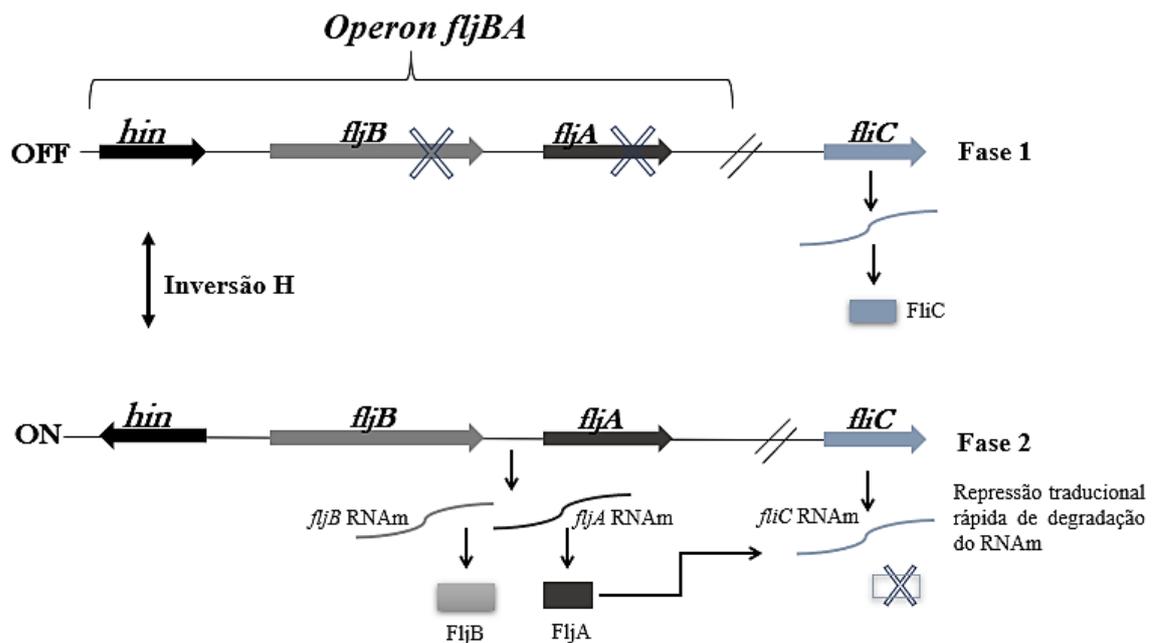
A variação de fase flagelar é a habilidade que algumas sorovariedades de *Salmonella* possuem em mudar o tipo de flagelina expresso e apresentam assim duas formas de expressão alternadas do antígeno H denominadas de fases, onde as proteínas flagelares antigênicas são identificadas como flagelina de fase 1, codificada pelo gene *fliC* e flagelina de fase 2 codificada pelo gene *fljB* (BANERJI *et al.*, 2020; EL-LATTIEF *et al.*, 2020; KHALTABADI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2022).

O tipo de flagelina expresso está sob controle de um sistema de variação de fase e é descrito didaticamente como um interruptor “on” e “off”. O gene *hin* é o responsável por guiar o mecanismo de inversão de fase a partir da codificação de uma invertase de sítio específica (*Hin*) (BANERJI *et al.*, 2020; HENDERSON; OWEN; NATARO, 1999; KHALTABADI *et al.*, 2019). Tal gene está presente no Operon *fljBA*, juntamente com os genes *fljB* e *fljA* no cromossomo de *Salmonella* spp. (KHALTABADI *et al.*, 2019).

Os genes *fljB* e *fljA* estão dispostos como uma unidade transcricional de maneira que ambos os genes são transcritos de um promotor localizado no fragmento *hin*. Assim, como há a possibilidade de duas orientações para o fragmento *hin*, tal evento determina o tipo de flagelina a ser expresso durante a divisão celular (HENDERSON; OWEN; NATARO, 1999; KHALTABADI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2022).

Na posição “off” a direção do promotor não permite que ocorra a expressão dos genes *fljB* e *fljA*, sendo que este último gene é responsável por reprimir a expressão do gene *fliC*.

Assim, sem o inibidor, o gene *fliC* é expresso e o antígeno de fase 1 é produzido. Enquanto, na posição “on”, o promotor está direcionado para a transcrição de *fljB* e *fljA*, o que reflete na inibição pós-transcricional do RNAm de *fliC* e expressão da flagelina de fase 2 pelo gene *fljB* (Figura 1) (BOLAND *et al.*, 2015; HENDERSON; OWEN; NATARO, 1999; KHALTABADI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2022)



**Figura 1** - Modelo para o mecanismo do controle genético da variação de fase flagelar em *Salmonella* (adaptado de Yamamoto e Kutsukake, 2006).

Assim sendo, há variantes de sorovariedades de *Salmonella* classificadas como monofásicas, pois são bactérias que apresentam ausência dos mecanismos de mudança de variação de fase, devido a deleções ou mutações totais ou parciais do gene *fljB*, podendo ser acompanhadas pela ausência ou mutações dos genes *fljA* e *hin* (BURNENS *et al.*, 1996; ECHEITA; HERRERA; USERA, 2001; MURASE *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2020a).

A função biológica da variação de fase flagelar não está completamente elucidada. Alguns estudos sugerem uma função de escape do sistema imunológico por aumentar o repertório de antígenos expressos pela *Salmonella*. Entretanto, Ikeda *et al.* (2001) demonstraram que linhagens de *Salmonella* Typhimurium que expressam apenas o antígeno flagelar de fase 1 apresentam virulência similar a variantes bifásicas, enquanto mutantes que expressam apenas o antígeno flagelar de fase 2 são atenuados (GARCÍA-PASTOR; PUERTA-FERNÁNDEZ; CASADESÚS, 2019; IKEDA *et al.*, 2001).

### 1.1.3. Transmissão, patogênese e manifestações clínicas

A infecção causada por *Salmonella* spp. inicia-se a partir da ingestão de água e/ou alimentos contaminados, como aves, carne suína e derivados e ovos crus ou malcozidos. Após a ingestão, a bactéria é capaz de sobreviver à acidez estomacal e após isso, atingirá o seu órgão alvo que é o intestino (HU *et al.*, 2018; KURTZ; GOGGINS; MCLACHLAN, 2017).

Além de aderir à superfície apical do epitélio intestinal, esse microrganismo apresenta a capacidade de invadir os enterócitos e células M e modificar a via de sinalização dessas células epiteliais, promovendo assim a internalização da bactéria. Após o processo de endocitose, *Salmonella* irá persistir e proliferar exacerbadamente no endossoma nas células hospedeiras (GOGOI; SHREENIVAS; CHAKRAVORTTY, 2019; LOU *et al.*, 2019).

Em razão da atividade de proteínas excretadas por essa bactéria, ocorre o aumento da expressão dos fatores quimiostáticos e conseqüentemente uma infiltração de neutrófilos na lâmina própria. Após um período, essa bactéria atingirá a porção basal do epitélio e será fagocitada por macrófagos e neutrófilos, porém tal bactéria é capaz de sobreviver nessas células, além de ocasionar a sua morte com conseqüente aumento do processo inflamatório do hospedeiro (FÀBREGA; VILA, 2013; GOGOI; SHREENIVAS; CHAKRAVORTTY, 2019; KHAN, 2014).

Em conseqüência da intensa reação inflamatória no local, poderá ocorrer o distanciamento das células epiteliais a partir da membrana basal, resultando assim na secreção de fluídos no lúmen intestinal e diarreia (FÀBREGA; VILA, 2013; GOGOI; SHREENIVAS; CHAKRAVORTTY, 2019; KHAN, 2014).

As manifestações clínicas associadas à infecção por *Salmonella* incluem febre, dor abdominal, dor de cabeça, náuseas e vômito, com período de duração inferior a 10 dias. Apesar das infecções por essa variante serem geralmente autolimitantes, em alguns casos pode ocorrer uma evolução desse quadro, resultando em uma infecção sistêmica devido a capacidade dessa bactéria invadir, sobreviver e se multiplicar em células do sistema retículo endotelial, podendo assim atingir diferentes órgãos e tecidos no organismo hospedeiro (GOGOI; SHREENIVAS; CHAKRAVORTTY, 2019; KURTZ; GOGGINS; MCLACHLAN, 2017).

### 1.1.4. Tolerância a condições desfavoráveis

*Salmonella* spp. é resistente a fatores ambientais desfavoráveis e necessita sobreviver em situações de *stress* para estabelecimento da infecção (MS, 2011). A exposição de células

bacterianas a ambientes de *stress*, pode alterar a expressão de fatores de virulência, uma vez que microrganismos adaptados a condições de *stress* têm sido reportados como mais virulentos em comparação àqueles que não sofreram *stress* (LENZ; HEW FERSTL; VOGEL, 2010; SIRSAT *et al.*, 2011).

Em humanos, por exemplo, após a ingestão da bactéria, *Salmonella* necessita sobreviver ao *stress* ácido do estômago e ao muco intestinal (CAMPIONI *et al.*, 2021). Entretanto, esse microrganismo apresenta uma adaptabilidade fisiológica, onde apesar de seu pH ótimo de crescimento ser entre 7.0 e 7.5, esse patógeno tolera extremos de 3.8 e 9.5 (MS, 2011). Além disso, *Salmonella* spp. ainda é capaz de se multiplicar em temperaturas entre 35 °C a 43 °C (extremos 5 °C a 46 °C) e sobreviver por longos períodos em alimentos secos, como o chocolate, o cacau em pó, especiarias ou leite em pó, e em produtos congelados, como sorvetes (MS, 2011).

Ademais, *Salmonella* spp. é um microrganismo intracelular facultativo que apresenta a capacidade de sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos, dentro de um compartimento conhecido como “vacúolo contendo *Salmonella*” (SCV) (RHEN, 2019; WEMYSS; PEARSON, 2019). Os macrófagos por sua vez, utilizam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como um mecanismo essencial para proteger o hospedeiro. Assim, a sobrevivência a esse mecanismo da resposta imune é caracterizada como uma condição de *stress* oxidativo, a qual *Salmonella* necessita resistir para persistência da infecção (RHEN, 2019).

#### 1.1.5. *Salmonella* 1,4, [5],12:i:-

*Salmonella* 1,4, [5],12:i:- é uma variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium que não possui o antígeno flagelar de fase 2 codificada pelo gene *fljB* (SUN *et al.*, 2020a). Desde seu primeiro relato na década de 1980 a partir de isolados de aves de capoeira em Portugal, *S.* 1,4, [5],12:i:- passou a ser frequentemente isolada em diferentes países, incluindo Estados Unidos, Itália, Reino Unido e França (QIN *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2020a).

Diferentes protocolos de PCR foram desenvolvidos para identificação de linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- a partir da ausência e/ou mutações no gene de fase flagelar 2 (SUN *et al.*, 2020a). Tennant e colaboradores (2010) descreveram um método de PCR que objetiva a análise de dois fragmentos de DNA, o gene *fljB* que codifica a fase flagelar 2 (ausente) e a presença de um elemento de inserção “IS200” na região intergênica entre *fliB*-*fliA*. Este protocolo é recomendado pela *European Food Safety Authority* (SUN *et al.*, 2020a TENNANT *et al.*, 2010).

Desde que foi confirmado como um patógeno emergente, esta variante passou a ser considerada uma das sorovariedades de *Salmonella* mais frequentemente isoladas de infecções em humanos e em animais em diferentes países, principalmente em países e regiões onde os casos são predominantemente associados ao consumo de carne suína (QIN *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2020a).

Em fevereiro de 2022 um surto envolvendo chocolates contaminados por *S.* 1,4, [5],12:i:- ST34 foi relatado no Reino Unido. Até abril deste mesmo ano, 150 casos foram identificados em nove países da Europa (ECDC, 2022; LUND *et al.*, 2022). A maioria dos acometidos foram crianças menores de 10 anos (89%) e apenas em 21 casos foi possível investigação sobre sintomas e gravidade, onde 57% relataram diarreia com a presença de sangue e taxa de hospitalização foi de 43%. Não foram registrados casos de óbito relacionado ao surto (ECDC, 2022; LARKIN *et al.*, 2022; LUND *et al.*, 2022).

Vários surtos de origem alimentar têm sido relatados em todo o mundo causados por *S.* 1,4, [5],12:i:- devido à contaminação de suínos e, conseqüentemente, de carne de porco e embutidos (QIN *et al.*, 2022). Esta sorovariedade está fortemente associada à cadeia alimentar suína especialmente na Europa, visto que era raramente identificada antes da década de 1990, entretanto seu isolamento em animais e humanos aumentou nos últimos 20 anos, tornando *S.* 1,4, [5],12:i:- a sorovariedade mais isolada de humanos, porcos e derivados de carne suína nos países Europeus (D'INCAU *et al.*, 2021; QIN *et al.*, 2022).

Na Colômbia foi a quarta sorovariedade mais isolada de material clínico pelos dados do sistema de vigilância do Instituto Nacional de Saúde do País em 2019 (CUENCA-ARIAS *et al.*, 2020). Já nos Estados Unidos está entre as cinco sorovariedades mais associadas a infecções por *Salmonella* (CDC, 2022; SUN *et al.*, 2020a; XIE *et al.*, 2020).

No Brasil, em relação às sorovariedades associadas aos casos de gastroenterite, *S.* 1,4, [5],12:i:- foi identificada como a terceira sorovariedade mais associada a infecções em humanos, assim como uma das principais sorovariedades isoladas de fontes não humanas, especialmente de animais, no Estado de São Paulo, Brasil entre 2004 e 2020 (FERNANDES *et al.*, 2022). Assim, *S.* 1,4, [5],12:i:- é uma das principais sorovariedades de *Salmonella* circulantes no país, entretanto poucos estudos buscaram caracterizar fenotipicamente e molecularmente linhagens dessa sorovariedade isolada ao longo dos anos (CASAS *et al.*, 2016; DE QUADROS *et al.*, 2020; FERNANDES *et al.*, 2006, 2022; MOURA *et al.*, 2018; POSSEBON *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2019; TAVECHIO *et al.*, 2009; TAVECHIO; GHILARDI; FERNANDES, 2004).

## 1.2. Genes de virulência

A patogenicidade de *Salmonella* é decorrente da expressão de genes de virulência que podem estar localizados no cromossomo e/ou em plasmídeos (KHAN; SHAMIM, 2022). É importante ressaltar que grande parte desses genes responsáveis pela invasão, sobrevivência e disseminação extra intestinal estão localizados em regiões cromossômicas conservadas denominadas de Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPIs), onde esses genes estão agrupados e são responsáveis por conferir um fenótipo de virulência específico (ANDESFA et al., 2019). Atualmente, já foram descritas 23 Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella*, sendo que as mais estudadas são a SPI-1 e SPI-2 (FOOKES et al., 2011; HAYWARD et al., 2014; SUEZ et al., 2013; ZHAO et al., 2020).

A SPI-1 é extremamente importante na interação entre a bactéria e as células hospedeiras, pois permite a invasão de *Salmonella* nas células epiteliais a partir do rearranjo do citoesqueleto (LOU et al., 2019; SÁNCHEZ-ROMERO; CASADESÚS, 2018). Tal mecanismo é possível devido à ação de proteínas efetoras que são injetadas nas células hospedeiras por meio do Sistema de Secreção Tipo III (TSS3), visto que esse complexo proteico é codificado por genes presentes na SPI-1 (LERMINIAUX; MACKENZIE; CAMERON, 2020; LOU et al., 2019; SÁNCHEZ-ROMERO; CASADESÚS, 2018).

Há muitos genes importantes na virulência de *Salmonella* localizados em SPI-1, incluindo os genes *invA* e *sipA* que codificam proteínas associadas a invasão, o gene *sipD* codifica uma proteína montadora de translocons e os genes *sop* (A-E) que codificam proteínas efetoras do TSS3 (ALMEIDA et al., 2013; HUR et al., 2011; SHAH et al., 2011).

A SPI-2 apresenta mais de 40 genes, assim como um TSS3 estruturalmente e funcionalmente distinto do TSS3 codificado pela SPI-1 (BAO et al., 2020). Alguns genes importantes localizados nessa ilha de patogenicidade são os genes *ssaR* e *sifA* que codificam proteínas associadas com a sobrevivência e replicação de *Salmonella* dentro das células hospedeiras (ALMEIDA et al., 2013; HUR et al., 2011; SHAH et al., 2011).

A produção de flagelos é outro fator de virulência importante na patogênese de *Salmonella*, visto que conferem motilidade à célula bacteriana no meio que se encontra. Os flagelos são codificados por genes cromossômicos como *flgK*, *flgL* e *fljB* (ALMEIDA et al., 2013; HUR et al., 2011; SHAH et al., 2011).

Ademais, algumas sorovariedades de *Salmonella* carregam plasmídeo de virulência sorovariedade-específico. O plasmídeo de virulência específico de *Salmonella* Typhimurium e *S.* 1,4, [5],12:i:- é denominado pSLT, é um plasmídeo de 94 Kb que pertence ao grupo de incompatibilidade incFII. Tal plasmídeo apresenta uma região que codifica os genes

*spv*RABCD e que quando expressos contribuem na sobrevivência e crescimento intracelular desse microrganismo em macrófagos (ALMEIDA *et al.*, 2013; HILEY; GRAHAM; JENNISON, 2019; SERIBELLI *et al.*, 2020).

### 1.3. Resistência aos antimicrobianos

Normalmente, infecções causadas por *Salmonella* não tifoide são autolimitantes e não necessitam da utilização de antimicrobianos, porém em casos de infecção grave, invasiva ou que acometa idosos e crianças ou pacientes com comorbidades a antibioticoterapia é recomendada (GUT *et al.*, 2018; MCDERMOTT; ZHAO; TATE, 2018; MEDALLA *et al.*, 2017). Nesses casos, os antimicrobianos com atividade contra esse microrganismo incluem fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, cefalosporinas de terceira geração, como a ceftriaxona, trimetropim/sulfametoxazol ou amoxicilina (MCDERMOTT; ZHAO; TATE, 2018; WEN; BEST; NOURSE, 2017).

A resistência a um determinado antimicrobiano resulta na ineficácia do tratamento da salmonelose, sendo principalmente problemática em infecções sistêmicas, onde a antibioticoterapia pode salvar a vida do paciente (MCDERMOTT; ZHAO; TATE, 2018). Ademais, linhagens de *Salmonella* com diferentes perfis de resistência têm sido reportadas em vários países, em vista disso, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos em 2019 classificou a *Salmonella* não tifoide resistente a antimicrobianos como uma séria ameaça à saúde pública (CORTÉS *et al.*, 2022; DAS *et al.*, 2022; MCDERMOTT; ZHAO; TATE, 2018; QIN *et al.*, 2022).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno natural, entretanto o crescente número de linhagens multidroga resistentes de bactérias patogênicas, como *Salmonella* está relacionado a diferentes fatores, como por exemplo, o uso excessivo de antimicrobianos devido ao fácil acesso em determinados países (GUT *et al.*, 2018; MCDERMOTT; ZHAO; TATE, 2018; MEDALLA *et al.*, 2017). Em razão do crescimento da resistência, há uma necessidade de monitoramento dessas linhagens, para que ocorra a realização de uma antibioticoterapia eficiente, quando necessária, assim como estabelecimento de uma correlação epidemiológica a partir de linhagens isoladas de diferentes fontes.

Linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- resistentes têm sido relatadas em diferentes países, como Tailândia, Itália, e Austrália, incluindo linhagens resistentes a cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas (KONGSOI *et al.*, 2020; PROROGA *et al.*, 2019; QIN *et*

*al.*, 2022; SUN *et al.*, 2019). Tais antimicrobianos são usualmente utilizados no tratamento de salmonelose não-tifoide em humanos, enquanto as tetraciclinas, sulfonamidas e aminoglicosídeos são habitualmente empregados na terapia veterinária, assim como utilizados como promotores de crescimento na produção animal em alguns países (HOSAIN; LUTFUL KABIR; KAMAL, 2021; PHIRI *et al.*, 2020; TACK *et al.*, 2020)

#### 1.4. Mecanismos de resistência

As quinolonas e fluoroquinolonas são antimicrobianos que atuam inibindo a replicação do DNA bacteriano a partir da ligação dessas moléculas em proteínas como a DNA girase, uma enzima da classe das topoisomerases tipo II. Essa enzima é codificada pelos genes cromossomais *gyrA* e *gyrB* (BUSH *et al.*, 2020; PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019). Outra proteína alvo da classe das quinolonas é a topoisomerase IV, que é codificada pelos genes *parC* e *parE* ((BUSH *et al.*, 2020; PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019).

O principal mecanismo de resistência as quinolonas em *Salmonella* ocorre a partir da alteração do sítio de ligação do antimicrobiano na enzima. Assim, mutações pontuais nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, localizados em *quinolone resistance-determining regions* (QRDRs), podem desencadear alterações nas sequências de aminoácidos da DNA girase e topoisomerase IV, podendo resultar na ineficácia terapêutica desses antimicrobianos (CHAUDHARI; SINGH; KODGIRE, 2023).

A resistência a quinolonas ainda pode ocorrer devido à presença de plasmídeos mediadores de resistência a quinolonas (PMQR - *Plasmid Mediated Quinolone Resistance*). Os genes plasmidiais *oqxAB* e *qepA* são responsáveis pela codificação de bombas de efluxo, os genes *qnrABCD*S codificam pentapeptídeos que se ligam à DNA girase, bloqueando a ação dos antimicrobianos, e por fim, o gene *aac(6')-Ib-cr* é responsável pela codificação de uma enzima acetiltransferase capaz de bloquear a ação de aminoglicosídeos e reduzir a suscetibilidade a quinolonas e aminoglicosídeos simultaneamente (CHAUDHARI; SINGH; KODGIRE, 2023; URBAN-CHMIEL *et al.*, 2022).

Já as cefalosporinas de terceira e quarta geração e os carbapenêmicos pertencem a classe dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Esses antimicrobianos apresentam em sua estrutura um anel  $\beta$ -lactâmico que é responsável pela inibição da síntese da parede celular bacteriana a partir da ligação desse anel em proteínas ligadoras de penicilina (URBAN-CHMIEL *et al.*, 2022; ZANGO *et al.*, 2019). A resistência a essa classe de antibióticos em Gram-negativas está principalmente associada à presença de enzimas, denominadas de  $\beta$ -lactamases, que são

capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico, impedindo assim sua atividade (HUSSAIN *et al.*, 2021; URBAN-CHMIEL *et al.*, 2022).

Os genes codificadores de  $\beta$ -lactamases geralmente são de origem plasmidial, dentre esses genes há aqueles que codificam enzimas  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), que são enzimas que conferem resistência à maioria dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (HUSSAIN *et al.*, 2021; URBAN-CHMIEL *et al.*, 2022). Os genes codificadores de ESBL mais frequentemente relatados em linhagens de *Salmonella* spp. pertencentes às famílias TEM, SHV e CTX-M, incluindo múltiplas variantes dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, genes *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> (AKINYEMI *et al.*, 2022; GAMBINO *et al.*, 2022; GAWISH *et al.*, 2021; SABRY *et al.*, 2020).

Já em relação aos carbapenêmicos, que são antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos que apresentam um amplo espectro de ação, os genes codificadores de carbapenemases que já foram reportados em *Salmonella* spp. incluem variantes dos genes *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>IMP</sub> (ABRAHAM *et al.*, 2016; KANAAN *et al.*, 2022; PATIL *et al.*, 2022; RANJBAR; SAFARPOOR DEHKORDI; HEIAT, 2020; RODRÍGUEZ; BAUTISTA; BARRERO, 2014).

### 1.5. Métodos de tipagem bacteriana

Os estudos epidemiológicos utilizam diferentes metodologias de tipagem bacteriana o que permite determinar a fonte e os veículos de transmissão, além de inferir se os patógenos envolvidos em surtos representam ou não um único clone (OLIVE; BEAN, 1999).

Alguns métodos fenotípicos como a biotipagem, fagotipagem, sorotipagem e a determinação de perfis de suscetibilidade a antimicrobianos têm sido utilizados com finalidades epidemiológicas, entretanto podem apresentar algumas limitações, como problemas de reprodutibilidade interlaboratoriais para algumas metodologias, dificultando a comparação de resultados obtidos em diferentes laboratórios. Ademais, um ponto desfavorável é a capacidade restringida de diferenciação entre linhagens de uma mesma espécie e/ou sorovariedade (OLIVE; BEAN, 1999).

Em relação a caracterização de linhagens de *Salmonella*, a técnica de sorotipagem, baseada na identificação sorológica dos antígenos somáticos (O), flagelares (H, de fase 1 e 2) e, quando presentes, capsulares (Vi), é a mais comumente realizada (CAMPOS, 2015; ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014). Entretanto, devido à alta variabilidade e recombinações nos genes que codificam tais antígenos, o gênero *Salmonella* abrange um enorme número de soroviedades (REEVES, 1993).

Os métodos de tipagem molecular bacteriana, por sua vez, se baseiam na observação de marcadores moleculares ou genéticos, assim são capazes de determinar diferenças genéticas entre linhagens bacterianas semelhantes e, juntamente com as análises filogenéticas, essas diferenças são utilizadas na classificação dessas linhagens em grupos ou complexos clonais, que é fundamentada na relação e diversidade genética entre as bactérias estudadas (SCHÜRCH *et al.*, 2018; WANG; JORDAN; MAYER, 2014).

Diferentes métodos de tipagem molecular, como *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR) têm sido utilizados com sucesso para uma melhor caracterização epidemiológica e da diversidade genética de diferentes sorovarietades de *Salmonella*, incluindo *S.* 1,4, [5],12:i:- em diferentes países (BANERJI *et al.*, 2020; MARIN *et al.*, 2020; MURASE *et al.*, 2018; POONCHAREON *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2020a).

### 1.5.1. *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE)

O *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), descrito inicialmente em 1984 para análise cromossômica de DNA eucarioto, é considerado uma técnica padrão-ouro na tipagem molecular de diferentes patógenos, incluindo *Salmonella*, visto que apresenta alta reprodutibilidade e poder discriminatório elevado (GOERING, 2010; NEOH *et al.*, 2019; SCHWARTZ; CANTOR, 1964; TENOVER *et al.*, 1995).

Tal metodologia é baseada na fragmentação do DNA bacteriano. Inicialmente as células são envolvidas em *plugs* de gel de agarose e são lisadas com Proteinase K e detergentes. A fragmentação do DNA ocorre a partir da utilização de enzimas de restrição de cortes raros, originando assim fragmentos de DNA de peso molecular maior que 10 Kb (MAGALHÃES *et al.*, 2005; NEOH *et al.*, 2019; RIBOT *et al.*, 2006; SCHWARTZ; CANTOR, 1984). Para que ocorra a separação desses fragmentos de DNA, essa técnica utiliza uma eletroforese em campo pulsado, ou seja, a corrente elétrica é aplicada em diferentes ângulos durante curtos períodos (pulsos) a partir de grupos de eletrodos (MAGALHÃES *et al.*, 2005; RIBOT *et al.*, 2006; TENOVER *et al.*, 1995).

Posteriormente à corrida, ocorre a análise do gel de agarose a partir da utilização de *softwares* especializados, permitindo assim a comparação do padrão de fragmentos de cada linhagem e a análise da similaridade genotípica entre essas (MAGALHÃES *et al.*, 2005; NEOH *et al.*, 2019; RIBOT *et al.*, 2006; TENOVER *et al.*, 1995).

Em relação a *S.* 1,4, [5],12:i:-, trabalhos demonstram que o PFGE tem sido aplicado com sucesso na tipagem de linhagens dessa variante monofásica (ANDREOLI *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2015; MANDILARA *et al.*, 2021; MARIN *et al.*, 2020; MURASE *et al.*, 2018).

### 1.5.2. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR)*

*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)*, também conhecidas como *Intergenic Repeat Units (IRUs)*, são uma família de elementos repetitivos que foram descritas nas *Enterobacteriaceae* e em outras famílias bacterianas (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP, 2006).

Essas sequências apresentam 127 pb e encontram-se em múltiplas cópias no DNA de enterobactérias e víbrios. Ademais, possuem uma região central altamente conservada e estão presente em regiões intergênicas não-codificantes do genoma bacteriano, isto é, encontram-se entre genes transcritos dentro ou fora de *operons* com sua posição variando em relação a posição das sequências de terminação e promotora dos genes. Portanto, apenas uma pequena parte dessas sequências ERIC são transcritas em mRNA (SHARPLES; LLOYD, 1990; VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP, 2006).

A Reação em Cadeia da Polimerase baseada nas sequências ERIC utiliza *primers* específicos descritos por Versalovic e colaboradores (1991) que se hibridam nas sequências ERIC, assim ocorrerá a amplificação da região de DNA entre as sequências ERIC do genoma bacteriano (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP, 2006).

Posteriormente à reação de PCR, é realizada uma análise do perfil de bandas e subsequentemente esse perfil é analisado em gel de agarose a partir de uma corrida de eletroforese horizontal. Como o número e a posição das sequências ERIC varia entre linhagens distintas devido a polimorfismos, esse padrão de fragmentos amplificados (*amplicons*) é então utilizado para determinar o grau de similaridade entre tais linhagens, visto que o perfil de *amplicons* gerados por PCR é reprodutível, ou seja, uma mesma linhagem bacteriana sempre apresentará o mesmo perfil de fragmentos (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992).

Alguns trabalhos utilizaram com sucesso a técnica de ERIC-PCR na tipagem de linhagens de diferentes sorovarietades de *Salmonella*, incluindo *S.* 1,4, [5],12:i:- (HERRERA-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ; RONDÓN-BARRAGÁN, 2020; KACZOREK-LUKOWSKA *et al.*, 2021; MARIN *et al.*, 2020; RAMTAHAL *et al.*, 2022).

### 1.5.3. *Multilocus Sequence Typing (MLST)*

A técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) baseia-se no sequenciamento e identificação de polimorfismos em genes essenciais ou de manutenção, denominados de genes *housekeeping* (MAIDEN *et al.*, 1998). O MLST pode ser realizado a partir de reações de PCR e sequenciamento dos *amplicons*. Entretanto, devido ao fato do sequenciamento de nova geração estar se tornando um método cada vez mais acessível, os dados desta técnica podem ser obtidos *in silico* através do sequenciamento do genoma completo, visto que atualmente o banco de dados *Enterobase* aceita apenas o depósito de sequências obtidas a partir desse método (KIMURA, 2018).

Esta técnica tem sido aplicada em estudos epidemiológicos de diferentes microrganismos, além de que seus resultados poderem ser compartilhados *on-line* devido a banco de dados, permitindo a análise comparativa dos resultados obtidos com dados mundiais (ACHTMAN, 2008; MAIDEN *et al.*, 1998; URWIN; MAIDEN, 2003).

Cada sequência obtida após amplificação e sequenciamento dos genes *housekeeping* corresponde a um alelo, visto que sequências diferentes são consideradas alelos diferentes. Esses alelos recebem um número para identificação e assim, a combinação dos números dos alelos dos genes *housekeeping* gera um número único, denominado de *Sequence Typing* (ST), que pode ser comparado com STs de diferentes locais do mundo, possibilitando a realização de análises filogenéticas, populacionais e evolucionárias dos microrganismos (ACHTMAN, 2008; MAIDEN *et al.*, 1998; URWIN; MAIDEN, 2003).

Na análise dos dados de MLST, as sequências que diferem em apenas um único alelo são classificadas como *single locus variants*, assim como aquelas que diferem em dois alelos, *double locus variants*. Ademais, linhagens que apresentam ao menos 4 alelos em comum são geralmente definidas como o mesmo Complexo Clonal (CC) (FEIL *et al.*, 2004; TUMMLER, 2020).

Para linhagens de *Salmonella enterica* os sete genes *housekeeping* analisados são: *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA*, enquanto os STs mais reportados mundialmente para *S. Typhimurium* e sua variante monofásica são aqueles pertencentes ao Complexo Clonal 19 (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>).

Diferentes trabalhos foram realizados onde o MLST foi utilizado para análise filogenética de *S. 1,4, [5],12:i:-* isoladas em diferentes locais do mundo (LEE *et al.*, 2021; LONG *et al.*, 2022; POSSEBON *et al.*, 2020; XIE *et al.*, 2020)

## 1.6. *Galleria mellonella*

*Galleria mellonella* também conhecida como traça-da-colmeia ou traça-da-cera, é uma espécie de inseto lepidópteros, pertencente à família *Pyralidae*. O período de desenvolvimento larval com sete instares varia entre 34 a 48 dias, sendo que essas larvas se alimentam de cera velha, pólen e mel e sofrem transformações e metamorfoses, nas quais resultam em formações de pupas e posteriormente em mariposas (KWADHA *et al.*, 2017).

As larvas de *G. mellonella* têm sido cada vez mais utilizadas como modelo alternativo de infecção no estudo da interação patógeno-hospedeiro, devido a particularidades dessas larvas, como o seu tamanho (12-20 mm), o que permite uma fácil manipulação. Além disso, podem ser mantidas a 37°C, são facilmente cultivadas em grande número e com baixo custo (KAVANAGH; FALLON, 2010; KWADHA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020). Assim, com o aumento da utilização deste modelo, houve a necessidade de criação de larvas em laboratórios de pesquisa e desenvolvimento de diferentes dietas artificiais, com base na alimentação natural, mel, cera e pólen (KWADHA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020).

A resposta imune de *G. mellonella* compartilha uma alta similaridade com o sistema imune inato dos mamíferos. Essas larvas contêm células imunes fagocíticas, chamadas hemócitos, que são responsáveis pela fagocitose, encapsulamento e nodulação. Além disso, a resposta imune de *G. mellonella* ainda compreende os processos de opsonização, melanização e secreção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (KAVANAGH; FALLON, 2010; PEREIRA *et al.*, 2020, 2018).

Na literatura pode-se observar a utilização desse modelo alternativo de infecção em diferentes estudos com *Salmonella* spp. (FREITAS *et al.*, 2021; SERIBELLI *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021; VILELA *et al.*, 2020;).

### **1.7. Relevância do estudo de *Salmonella* 1,4,[5],12:i:-**

A salmonelose não tifoide é uma das principais Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) no mundo, com estimativa de 197,35 milhões de casos e 84.799 mortes anualmente. Especificamente no Brasil, *Salmonella* spp. foi o gênero mais identificado em surtos de DTAs entre 2009 e 2021, com cerca de 39.314 (14,77%) casos e 34 (16,04%) mortes (GBD, 2018; MARQUES; TRINDADE, 2022).

*Salmonella* 1,4,[5],12:i:- é uma das principais sorovarietades isoladas de infecções em humanos e em animais em diferentes locais do mundo, como Reino Unido, China, Espanha, Itália e Estados Unidos (PROROGA *et al.*, 2019; QIN *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2020a). Surtos de origem alimentar causados por *S.* 1,4, [5],12:i:- veem sendo relatados devido

principalmente à contaminação de produtos suínos (PROROGA *et al.*, 2019; QIN *et al.*, 2022). Tal associação com esses animais juntamente com o aumento de relatos de linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- multidroga resistentes elevou as infecções causadas por *S.* 1,4,[5],12:i:- ao *status* de emergência global de saúde pública (PROROGA *et al.*, 2019; QIN *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2020a).

Especificamente no Brasil, essa sorovariedade foi identificada como a terceira mais isolada de infecções em humanos e a oitava mais isolada de fontes não humanas no Estado de São Paulo entre 2004 e 2020 (FERNANDES *et al.* 2022). Entretanto, poucos estudos avaliaram características epidemiológicas e a diversidade genética de *S.* 1,4,[5],12:i:- no país (CASAS *et al.*, 2016; DE QUADROS *et al.*, 2020; FERNANDES *et al.*, 2006, 2022; POSSEBON *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2019; TAVECHIO *et al.*, 2009; TAVECHIO; GHILARDI; FERNANDES, 2004).

Um dos principais fatores associados à gravidade da infecção em humanos causada por *Salmonella* spp. é a presença de genes que codificam fatores de virulência, assim como a capacidade de tolerar algumas condições desfavoráveis, incluindo sua capacidade de sobreviver ao pH ácido do estômago e ao sistema imune do hospedeiro (BARILLI *et al.*, 2018; NABERHAUS *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2020a). Além disso, em condições graves de salmonelose é necessária a realização de tratamento com antimicrobianos que assegurem uma terapia eficiente no Brasil e no mundo (BARILLI *et al.*, 2018; MURASE *et al.*, 2018).

Contudo, poucos estudos no Brasil dispõem de informações sobre o perfil de virulência, sobrevivência em condições de *stress* e suscetibilidade a antimicrobianos de *S.* 1,4,[5],12:i:- isolados de diferentes fontes no país. Além disso, a maioria desses trabalhos objetivaram o isolamento e a identificação de diferentes sorovariedades de *Salmonella*, e apenas Tavechio e colaboradores (2004; 2006) estudaram especificamente a variante monofásica de *S.* Typhimurium no Brasil. (CASAS *et al.*, 2016; DE QUADROS *et al.*, 2020; FERNANDES *et al.*, 2006, 2022; MOURA *et al.*, 2018; POSSEBON *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2019; TAVECHIO *et al.*, 2009; TAVECHIO; GHILARDI; FERNANDES, 2004).

Ademais, comparações entre linhagens de *S.* 1,4,[5],12:i:- com *S.* Typhimurium realizadas com isolados da década de 90 no Brasil demonstraram grande similaridade genotípica e fenotípica entre tais sorovariedades (TAVECHIO *et al.*, 2009). Entretanto, apesar da estreita relação genética entre tais variantes, atualmente já foram descritas diferenças significativas nos perfis genéticos de *S.* Typhimurium e *S.* 1,4,[5],12:i:-, como prevalência de genes de virulência cromossomais e/ou transmitidos por plasmídeos que diferem entre os dois sorotipos relacionados (NGOI, YAP, THONG, 2018; PROROGA *et al.*, 2019).

Assim, considerando a escassez de trabalhos com linhagens de *S.* 1,4,[5],12:i:- no Brasil, estudos que objetivem caracterizar fenotipicamente e molecularmente linhagens dessa variante monofásica isoladas de diferentes fontes durante décadas no país, são de grande importância, e deverão contribuir para o entendimento da diversidade genotípica, potencial patogênico, perfil de resistência a antimicrobianos e virulência dessa importante sorovariedade de *Salmonella*.

## **CONCLUSÕES**

---

## 2. CONCLUSÕES

- O potencial patogênico das linhagens de *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- estudadas foi evidenciado pela alta frequência de todos os genes associados à virulência pesquisados;
- A detecção de uma relativamente alta porcentagem de linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- MDR é preocupante e alerta para a importância de um monitoramento constante da resistência, a fim de garantir o sucesso do tratamento antimicrobiano, quando esse for necessário;
- Mutação pontual no gene *gyrA* e a presença do gene plasmidial *qnrB* foram os principais mecanismos de resistência encontrado em linhagens resistentes a fluoroquinolonas, evidenciando um alerta à saúde pública pois esses antimicrobianos são utilizados como escolha no tratamento de infecções por *Salmonella*;
- As técnicas de PFGE e ERIC-PCR discriminaram similarmente linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- e seus respectivos resultados sugerem que a maioria das linhagens estudadas pertencem a um *cluster* prevalente ao longo de décadas no Estado de São Paulo e a circulação dessa sorovariedade entre fontes clínicas e não clínicas;
- O resultado do MLST indica que todas as linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- estudadas isoladas no Brasil descendem de um precursor comum pertencente ao ST19 que é o principal ST de *S.* Typhimurium, sugerindo que as linhagens estudadas são filogeneticamente mais próximas a essa sorovariedade do que linhagens de *Salmonella* monofásica do ST34 isoladas em outros países;
- As altas taxas de sobrevivência das linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- isoladas de fonte humana e não humana sob o *stress* ácido reforçaram a capacidade desse patógeno de tolerar essa condição desfavorável;
- Linhagens de *S.* 1,4, [5],12:i:- isoladas de humanos e fonte não humana apresentaram taxas semelhantes de sobrevivência ao *stress* ácido e oxidativo, indicando que tal capacidade

independeu da fonte de isolamento, o que também foi observado para linhagens de *S. Typhimurium*;

- O ensaio de virulência em *Galleria mellonella* mostrou que linhagens de *S. 1,4, [5],12:i-* isoladas de fonte não humana foram mais virulentas do que linhagens isoladas de humanos, diferentemente do observado em *S. Typhimurium*, onde as linhagens de humanos foram mais virulentas, sugerindo uma possível diferença entre essas sorovariedades geneticamente relacionadas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

### 3. REFERÊNCIAS

ABGOTTSPON, H. *et al.* Quinolone resistance mechanisms in *Salmonella enterica* serovars Hadar, Kentucky, Virchow, Schwarzengrund, and 4,5,12:i:-, isolated from humans in Switzerland, and identification of a novel *qnrD* variant, *qnrD2*, in *S. Hadar*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3560–3563, 2014. DOI: 10.1128/AAC.02404-14.

ABRAHAM, S. *et al.* Isolation and plasmid characterization of carbapenemase (IMP-4) producing *Salmonella enterica* Typhimurium from cats. **Scientific Reports**, v. 6, p. 35527, 21 out. 2016. DOI: 10.1038/srep35527.

ACHTMAN, M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 53-70, 2008. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162832.

AKINYEMI, K. O. *et al.* Extended-spectrum Beta-lactamases Encoding Genes among *Salmonella Enterica* serovar Typhi Isolates in Patients with Typhoid Fever from four Academic Medical Centers Lagos, Nigeria. **Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion**, v. 74, n. 3, p. 165–171, 2022. DOI: 10.24875/RIC.22000078.

ALMEIDA, F. *et al.* Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 145–151, 2013. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.07.004.

ALMEIDA, F. *et al.* Genotypic diversity, pathogenic potential and the resistance profile of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983 to 2013 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1395–1407, nov. 2015. DOI: 10.1099/jmm.0.000158.

ALMEIDA, F. *et al.* Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. **Plos One**, v. 13, n.8, 13 ago. 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0201882.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* Comparison of acids on the induction of an Acid Tolerance Response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. **Meat Science**, v. 81, n. 1, p. 65–70, jan. 2009. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.06.019.

ANDESFHA, E. *et al.* Detection of *Salmonella* Pathogenicity Island and *Salmonella* plasmid virulence genes in *Salmonella* Enteritidis originated from layer and broiler farms in Java Island. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 6, n. 3, p. 384–393, 8 ago. 2019. DOI: 10.5455/javar.2019.f358.

ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. **Scientific World Journal**, v. 2015, p. 520179, 2015. DOI: 10.1155/2015/520179.

ANDREOLI, G. *et al.* Foodborne salmonellosis in Italy: Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic variant 4,[5],12:I isolated from salami and human patients. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 4, p. 632–639, abr. 2017. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-16-331.

BANERJI, S. *et al.* Genome-based *Salmonella* serotyping as the new gold standard. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4333, 9 mar. 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-61254-1.

BAO, H. *et al.* *Salmonella* secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. **Microbiological Research**, v. 241, p. 126591, dez. 2020. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126591.

BARILLI, E. *et al.* Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and virulence genes in *Salmonella* isolated from pigs bred on intensive farms. **Italian Journal of Food Safety**, v. 7, n. 2, p. 131–137, 3 jul. 2018. DOI: 10.4081/ijfs.2018.7223.

BOLAND, C. *et al.* Extensive genetic variability linked to IS26 insertions in the *fljB* promoter region of atypical monophasic variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 9, p. 3169–3175, 1 mai. 2015. DOI: 10.1128/AEM.00270-15.

BRENNER, F. W. *et al.* *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465–67, jul. 2000. DOI: 10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000.

BRIONES, A. C. *et al.* Genetic regulation of the *ompX* porin of *Salmonella* Typhimurium in response to hydrogen peroxide stress. **Biological Research**, v. 55, n. 1, p. 8, 22 fev. 2022. DOI: 10.1186/s40659-022-00377-3.

BURNENS, A. P. *et al.* Evolutionary origin of a monophasic *Salmonella* serovar, 9,12:1,v:-, revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the *fljB* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1641–1645, jul. 1996. DOI: 10.1128/JCM.34.7.1641-1645.1996.

BUSH, N. G. *et al.* Quinolones: Mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5662, 1 dez. 2020. DOI: 10.3390/molecules25235662.

CALARGA, A. P. *et al.* Antimicrobial resistance and genetic background of non-typhoidal *Salmonella enterica* strains isolated from human infections in São Paulo, Brazil (2000–2019). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n.3, p. 1249-62, set. 2022. DOI: 10.1007/s42770-022-00748-8.

CALDERÓN, I. L. *et al.* Response regulator ArcA of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium down regulates expression of OmpD, a porin facilitating uptake of hydrogen peroxide. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 214–222, fev. 2011. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.11.001.

CAMPIONI, F. *et al.* Phenotypic analyses of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains isolated in the pre- and post-epidemic period in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 173–183, 2021. DOI: 10.1007/s42770-020-00392-0.

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 Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 254–264, dez. 2012. DOI: 10.1016/j.fm.2012.06.008.

CAMPIONI, F.; ZOLDAN, M. M.; FALCÃO, J. P. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 7, p. 1403–1410, jul. 2014. DOI:10.1017/S0950268814000491.

CAO, C. *et al.* Microbiological analysis and characterization of *Salmonella* and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates recovered from retail fresh vegetables in Shaanxi Province, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 387, p. 110053, 16 fev. 2023. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.

CARRIQUE-MAS *et al.* Trends in phage types and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from animals in Great Britain from 1990 to 2005. **Veterinary Record**, v.162, n. 17, p. 541-6, 26 nov. 2008. DOI: 10.1136/vr.162.17.541.

CASAS, M. R. T. *et al.* Presence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in gyrase and topoisomerase in *Salmonella enterica* isolates with resistance and reduced susceptibility to ciprofloxacin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 1, p. 85–89, maio 2016. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.016.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, p. 351-360, 2015.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Salmonella* Homepage. Atlanta, GA: CDC, 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2023.

CHANAMÉ PINEDO, L. *et al.* Sources and trends of human salmonellosis in Europe, 2015–2019: An analysis of outbreak data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 379, p. 109850, 16 out. 2022. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109850.

CHAUDHARI, R.; SINGH, K.; KODGIRE, P. Biochemical and molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Salmonella* spp. **Research in Microbiology**, v. 174, n.1-2, p. 103985, jan. 2023. DOI: 10.1016/j.resmic.2022.103985.

CHEN, X. *et al.* Prevalence of *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3423–3427, jun. 2012. DOI: 10.1128/AAC.06191-11.

CLÍMACO, E. C. *et al.* Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 127–133, out. 2013. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.06.024.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30ed. **CLSI supplement M100**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2020.

CORTÉS, V. *et al.* Monitoring antimicrobial resistance trends in *Salmonella* spp. from poultry in Eastern Spain. **Poultry Science**, v. 101, n. 6, p. 93-100, jun. 2022. DOI: 10.1016/j.psj.2022.101832.

CUENCA-ARIAS, P. *et al.* Molecular and phenotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium monophasic variant (1,4,[5],12:i:-) from Colombian clinical isolates. **Biomedica**, v. 40, n. 4, p. 722–733, 2 dez. 2020. DOI: 10.7705/biomedica.5417.

DAS, T. *et al.* Antimicrobial resistance profiling and burden of resistance genes in zoonotic *Salmonella* isolated from broiler chicken. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 1, p. 237–244, jan. 2022. DOI: 10.1002/vms3.648.

DE QUADROS, C. L. *et al.* Antimicrobial and Disinfectant Susceptibility of *Salmonella* Serotypes Isolated from Swine Slaughterhouses. **Current Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 1035-1042, jun. 2020. DOI: 10.1007/s00284-020-01904-9.

DIACONU, E. L. *et al.* Emergence of IncHI2 Plasmids with Mobilized Colistin Resistance (*mcr*)-9 Gene in ESBL-Producing, Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium and Its Monophasic Variant ST34 From Food-Producing Animals in Italy. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 705230, 16 jul. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.705230.

D'INCAU, M. *et al.* Occurrence of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant (4, [5],12:i:-) in healthy and clinically ill pigs in northern Italy. **Porcine Health Management**, v. 7, n. 1, p. 34, 26 abr. 2021. DOI: 10.1186/s40813-021-00214-1.

DIONISI, A. M. *et al.* Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 711–717, 2009. DOI: 10.1089/fpd.2008.0240.

DONG, N. *et al.* The phenotypic and molecular characteristics of antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium in Henan Province, China. **BMC Infection Disease**, v. 20, n.1, p. 511, jul. 2020. DOI: 10.1186/s12879-020-05203-3.

ECHEITA, M. A.; HERRERA, S.; USERA, M. A. Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i: - Appears to be a monophasic variant of serovar typhimurium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2981–2983, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.8.2981-2983.2001.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 20, n. 12, p. 1-273, 2022. DOI: 10.2903/j.efsa.2022.7666.

EL-LATTIEF, A. A. *et al.* Development of a duplex real-time PCR for differentiation of *Salmonella* Typhimurium and monophasic serovars. **Journal of World's Poultry Research**, v. 10, n. 2, p. 299–325, jun. 2020. DOI: 10.36380/jwpr.2020.36.

ELMI, S. A. *et al.* The Epidemiology and Antimicrobial Resistance of *Salmonella*: A Review. v. 14, n. 6, p. 1–11, jul. 2021. DOI: 10.9790/2380-1406030111.

ELNEKAVE, E. *et al.* *Salmonella enterica* Serotype 4,[5],12:i:-in Swine in the United States Midwest: An Emerging Multidrug-Resistant Clade. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 6, p. 877–885, 5 mar. 2018. DOI: 10.1093/cid/cix909.

ENG, S. K. *et al.* *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284–293, 9 jun. 2015. DOI: 10.1080/21553769.2015.1051243.

---

FÀBREGA, A. *et al.* Repression of invasion genes and decreased invasion in a high-level fluoroquinolone-resistant *Salmonella* Typhimurium mutant. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. e8029, 25 nov. 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0008029.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 308-41, abr. 2013. DOI: 10.1128/CMR.00066-12.

FANG, F. C. *et al.* The alternative  $\sigma$  factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, n. 24, p. 11978-11982, 15 dez. 1992. DOI: 10.1073/pnas.89.24.11978.

FARRERA, G. P. M. *et al.* Detection of Quinolone Resistance in *Salmonella* Typhimurium Pig Isolates Determined by GyrA Gene Mutation Using PCR-and Sequence-Based Techniques within the GyrA Gen. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 33, 2016. DOI: 10.2174/1381612822666160803165645.

FEIL, E. J. *et al.* eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1518–1530, mar. 2004. DOI: 10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004.

FERNANDES, S. A. *et al.* *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179–184, jul. 2006. DOI: 10.1590/S0036-46652006000400001.

FERNANDES, S. A. *et al.* *Salmonella enterica* serotypes from human and nonhuman sources in Sao Paulo State, Brazil, 2004-2020. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 64, p. e66, 30 set. 2022. DOI: 10.1590/S1678-9946202264066.

FERNÁNDEZ, J.; GUERRA, B.; RODICIO, M. R. Resistance to carbapenems in non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars from humans, animals and food. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 2, p. 1-13, 8 abr. 2018. DOI: 10.3390/vetsci5020040.

FOOKES, M. *et al.* *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the *Salmonellae*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 8, p. e1002191, agost. 2011. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002191.

FOSTER, J. W. Low pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of *Salmonella* Typhimurium. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 215-37, 1995. DOI: 10.3109/10408419509113541.

GALÁN-RELAÑO *et al.* Phenotypic and genotypic antibiotic resistance patterns in *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant from pigs in southern Spain. **Research in Veterinary Science**, v. 152, p. 596–603, 20 dez. 2022. DOI: 10.1016/j.rvsc.2022.09.028.

GAMBINO, D. *et al.* Food Is Reservoir of MDR *Salmonella*: Prevalence of ESBLs Profiles and Resistance Genes in Strains Isolated from Food. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 780, 6 abr. 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10040780.

GARCÍA, P. *et al.* Horizontal acquisition of a multidrug-resistance module (R-type assut) is responsible for the monophasic phenotype in a widespread clone of *Salmonella* serovar 4,[5],12:i:-. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 680, 10 maio 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00680.

GARCÍA-PASTOR, L.; PUERTA-FERNÁNDEZ, E.; CASADESÚS, J. Bistability and phase variation in *Salmonella enterica*. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanism**, v. 1862, n. 7, p. 752-758, jul. 2019. DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.01.003.

GAHAN, G. M.; HILL, C. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n.1-2, p. 93-100, set. 1999. DOI: 10.1016/s0168-1605(99)00079-3.

GAWISH, M. F. *et al.* Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* from retail fishes in Egypt: A major threat to public health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 351, p. 109268, 2 ago. 2021. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109268.

GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and etiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1211–1228, nov. 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30362-1.

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866–875, out. 2010. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.07.023.

GOGOI, M.; SHREENIVAS, M. M.; CHAKRAVORTTY, D. Hoodwinking the Big-Eater to Prosper: The *Salmonella* - Macrophage Paradigm. **Journal of Innate Immunity**, v. 11, n. 3, p. 289–299, 2019. DOI: 10.1159/000490953.

GUT, A. M. *et al.* *Salmonella* infection – Prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: A review. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, n. 11, p. 1327–1344, nov. 2018. DOI: 10.1099/mic.0.000709.

HAYWARD, M. R. *et al.* SPI-23 of *S. Derby*: Role in adherence and invasion of porcine tissues. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–8, 19 set. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0107857.

HE, J. *et al.* Multidrug resistance and prevalence of quinolone resistance genes of *Salmonella enterica* serotypes 4,[5],12:i:- in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 330, p. 108692, 2 out. 2020. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108692.

HENDERSON, I. R.; OWEN, P.; NATARO, J. P. Molecular switches - The ON and OFF of bacterial phase variation. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 919-32, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01555.x.

HERRERA-SÁNCHEZ, M. P.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, R.; RONDÓN-BARRAGÁN, I. S. Molecular characterization of antimicrobial resistance and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR as a molecular typing tool for *Salmonella* spp. isolated from poultry and humans. **Veterinary World**, v. 13, n. 9, p. 1771–1779, set. 2020. DOI: 10.14202/vetworld.2020.1771-1779.

HILEY, L.; GRAHAM, R. M. A.; JENNISON, A. V. Genetic characterisation of variants of the virulence plasmid, pSLT, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium provides evidence of a variety of evolutionary directions consistent with vertical rather than horizontal transmission. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–12, 11 abr. 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0215207.

HOSAIN, M. Z.; LUTFUL KABIR, S. M.; KAMAL, M. M. Antimicrobial uses for livestock production in developing countries. **Veterinary World**, v. 14, n. 1, p. 210–221, jan. 2021. DOI: 10.14202/vetworld.2021.210-221.

HSU, C.-Y. *et al.* A Novel Dibenzoxazepine Attenuates Intracellular *Salmonella* Typhimurium Oxidative Stress Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p. e0151921, 22 dez. 2021. DOI: 10.1128/Spectrum.01519-21.

HU, S. *et al.* Global transcriptomic Acid Tolerance Response in *Salmonella* Enteritidis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 330–338, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.02.039.

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. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 1, p. 49–56, 2011.

HUSSAIN, H. I. *et al.* Genetic basis of molecular mechanisms in  $\beta$ -lactam resistant Gram-negative bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 105040, 1 set. 2021. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105040.

IKEDA, J. S. *et al.* Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3021–3030, maio 2001. DOI: 10.1128/IAI.69.5.3021-3030.2001.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. *et al.* Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, set. 2014. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.07.004.

JACOBY, G. A. *et al.* Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1665–1666, set. 2009. DOI: 10.1128/AAC.01447-08.

JAJERE, S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, v. 12, n. 4, p. 504–521, 2019. DOI: 10.14202/vetworld.2019.504-521.

JANDA JM; ABBOTTB SL. The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: “*Enterobacterales*”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. e00174-20, fev. 2021. DOI: 10.1128/CMR.00174-20.

JEONG, H. S. *et al.* Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and mutations in the gyrase and topoisomerase IV genes in *Salmonella* isolated from 12 tertiary-care hospitals in Korea. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 4, p. 551–557, dez. 2011. DOI: 10.1089/mdr.2011.0095.

KACZOREK-ŁUKOWSKA, E. *et al.* Can domestic pigeon be a potential carrier of zoonotic *Salmonella*? **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 4, p. 2321–2333, jul. 2021. DOI: 10.1111/tbed.13891.

KADHIM, H. M. Review of pathogenicity and virulence determinants in *Salmonella*. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 14, n. 1, p. 377–381, 2020.

---

KANAAN, M. H. G. *et al.* Occurrence of virulence factors and carbapenemase genes in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from chicken meat and egg samples in Iraq. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 279, dez. 2022. DOI: 10.1186/s12866-022-02696-7.

KAVANAGH, K.; FALLON, J. P. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 79-83, fev. 2010. DOI: 10.1016/j.fbr.2010.04.001.

KAZMI, S. Y. The etymology of microbial nomenclature and the diseases these cause in a historical perspective. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 11, nov. 2022. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.103454.

KHALTABADI, R. F. *et al.* *Salmonella* Typhimurium in Iran: Contribution of molecular and IS200 PCR methods in variants detection. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–13, mar. 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0213726.

KHAN, C. M. A. The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1–23, 10 jul. 2014. DOI: 10.1155/2014/846049.

KHAN, M.; SHAMIM, S. Understanding the Mechanism of Antimicrobial Resistance and Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 2006, 1 out. 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10102006.

KIM, A. *et al.* Characterization of *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:- Isolates from Korean Food Animals. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 9, p. 766–769, set. 2015. DOI: 10.1089/fpd.2015.1947.

KIM, H. BIN *et al.* Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 639–645, fev. 2009. DOI: 10.1128/AAC.01051-08.

KIMURA, B. Will the emergence of core genome MLST end the role of in silico MLST? **Food Microbiology**, v. 75, p. 28-33, out. 2018. DOI: 10.1016/j.fm.2017.09.003.

KONGSOI, S. *et al.* Serotypes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* recovered from clinical swine samples. **Veterinary World**, v. 13, n. 11, p. 2312–2318, nov. 2020. DOI: 10.14202/vetworld.2020.2312-2318.

- KURTZ, J. R.; GOGGINS, J. A.; MCLACHLAN, J. B. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. **Immunology Letters**, v. 190, p. 42–50, ago. 2017. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.07.006.
- KWADHA, C. A. et al. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 6, 9 jun. 2017. DOI: 10.3390/insects8020061.
- LARKIN, L. et al. Investigation of an international outbreak of multidrug-resistant monophasic *Salmonella* Typhimurium associated with chocolate products, EU/EEA and United Kingdom, February to April 2022. **Euro surveillance**, v. 27, n. 15, p. 2200314, abr. 2022. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.15.2200314.
- LEE, S. et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in non-typhoidal *Salmonella* strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones isolated from human salmonellosis in Gyeonggi-do, South Korea from 2016 to 2019. **Gut Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 35, 1 jun. 2021. DOI: 10.1186/s13099-021-00431-7.
- LENZ, C. A.; HEW FERSTL, C. M.; VOGEL, R. F. Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 317–326, maio 2010. DOI: 10.1016/j.fm.2009.11.008.
- LERMINIAUX, N. A.; MACKENZIE, K. D.; CAMERON, A. D. S. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1): The evolution and stabilization of a core genomic type three secretion system. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 576, 16 abr. 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8040576.
- LONG, L. et al. Highly prevalent MDR, frequently carrying virulence genes and antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- isolates from Guizhou Province, China. **PLoS ONE**, v. 17, n. 5, p. e0266443, 19 maio 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0266443.
- LOU, L. et al. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 270, 31 jul. 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00270.
- FREITAS, L. L. et al. The virulence of *Salmonella* Enteritidis in *Galleria mellonella* is improved by N-dodecanoyl-homoserine lactone. **Microbial Pathogenesis**, v. 152, p. 104730, mar. 2021. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.104730.
- LUND, S. et al. Outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium Sequence Type 34 linked to chocolate products. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 82, p. 104597, 8 set. 2022. DOI: 10.1016/j.amsu.2022.104597.

LUPSKI1, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, Interspersed Repetitive DNA Sequences in Prokaryotic Genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4525–4529, jul. 1992. DOI: 10.1128/jb.174.14.4525-4529.1992.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. D. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia: uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAIDEN, M. C. J. *et al.* Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms (molecular typing *Neisseria meningitidis* housekeeping genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3140–3145, 17 mar. 1998. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3140.

MALORNY, B. *et al.* Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: Towards an international standard. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 290–296, jan. 2003. DOI: 10.1128/AEM.69.1.290-296.2003.

MANDILARA, G. *et al.* The rising burden of salmonellosis caused by monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:I:-) in Greece and new food vehicles. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 185, 13 fev. 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10020185.

MARIN, C. *et al.* Supplementary feeding stations for conservation of vultures could be an important source of monophasic *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-. **Science of the Total Environment**, v. 636, p. 449–455, 15 set. 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.310.

MARIN, C. *et al.* Contamination of pig carcass with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1,4[5],12:i:- originates mainly in live animals. **Science of the Total Environment**, v. 703, p. 134609, 10 fev. 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134609.

MARQUES, P. R. C.; TRINDADE, R. V. R. Panorama epidemiológico dos surtos de doenças transmitidas por alimentos entre 2000 e 2021 no Brasil. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3, n. 3, p. 1–10, 20 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.51161/rem/3477>.

MATHER, A. E. *et al.* New Variant of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Associated with Invasive Disease in Vietnam. **mBio**, v.9, n. 5, p. e01056-18, 4 set. 2018. DOI: 10.1128/mBio.01056-18.

MCDERMOTT, P. F.; ZHAO, S.; TATE, H. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 27 jul. 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017.

MEDALLA, F. *et al.* Estimated Incidence of Antimicrobial Drug – Resistant Nontyphoidal *Salmonella*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p.29-37, jan. 2017. DOI: 10.3201/eid2301.160771.

MENEGUZZI, M. *et al.* Re-emergence of salmonellosis in hog farms: Outbreak and bacteriological characterization. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1–15, 27 abr. 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9050947.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella*: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella* spp. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília. **Ministério da Saúde**, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil - Informe 2022. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Ministério da Saúde**, jan. 2022.

MORALES, E. H. *et al.* Hypochlorous acid and hydrogen peroxide-induced negative regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompW* by the response regulator ArcA. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 69, 22 maio 2012. DOI: 10.1186/1471-2180-12-63.

MOURA, Q. *et al.* Virulent nontyphoidal *Salmonella* producing CTX-M and CMY-2  $\beta$ -lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 281-286, 1 jan. 2018. DOI: 10.1080/21505594.2017.1279779.

MOURÃO, J. *et al.* Atypical non-h2s-producing monophasic *Salmonella* Typhimurium ST3478 strains from chicken meat at processing stage are adapted to diverse stresses. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 702, 26 ago. 2020. DOI: 10.3390/pathogens9090701.

MURASE, T. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium monophasic variants isolated in Thailand and Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 12, p. 1839–1846, 11 dez. 2018. DOI: 10.1292/jvms.18-0510.

- NABERHAUS, S. A. *et al.* Pathogenicity and Competitive Fitness of *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:- Compared to *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby in Swine. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 502, 30 jan. 2020. DOI: 10.3389/fvets.2019.00502.
- NADIMPALLI, M. *et al.* CTX-M-55-type ESBL-producing *Salmonella enterica* are emerging among retail meats in Phnom Penh, Cambodia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 2, p. 342–348, 1 fev. 2019. DOI: 10.1093/jac/dky451.
- NEOH, H. MIN *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 74, p. 103935, out. 2019. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103935.
- NGOI, S. T.; YAP, K. P.; THONG, K. L. Genomic characterization of endemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar I 4,[5],12:i:- isolated in Malaysia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 62, p. 109–121, ago. 2018. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.04.027.
- OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n. 6, p. 1661-9, jun. 1999. DOI: 10.1128/JCM.37.6.1661-1669.1999.
- OLUDAIRO, O. *et al.* Review of *Salmonella* Characteristics, History, Taxonomy, Nomenclature, Non Typhoidal Salmonellosis (NTS) and Typhoidal Salmonellosis (TS). **Zagazig Veterinary Journal**, v. 50, n. 2, p. 160–171, 30 jun. 2022. DOI: 10.21608/zvjz.2022.137946.1179.
- O'REGAN, E. *et al.* Multiple regulatory pathways associated with high-level ciprofloxacin and multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: Involvement of *ramA* and other global regulators. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1080–1087, mar. 2009. DOI: 10.1128/AAC.01005-08.
- PARK, C. H. *et al.* Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3953–3955, nov. 2006. DOI: 10.1128/AAC.00915-06.
- PATIL, S. *et al.* Genetic Characterization of Colistin-Resistant *Salmonella enterica* ST34 Co-Harboring Plasmid-Borne *mcr-1*, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>KPC-2</sub> Recovered from a Paediatric Patient in Shenzhen, China. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 757–763, 2 mar. 2022. DOI: 10.2147/IDR.S349585.

PEREIRA, M. F. *et al.* *Galleria mellonella* as an infection model: An in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. **Pathogens and Disease**, v.78, n.8, 11 nov. 2020. DOI: 10.1093/femspd/ftaa056.

PEREIRA, T. C. *et al.* Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 128, 27 nov. 2018. DOI: 10.3390/jof4040128.

PHAM, T. D. M.; ZIORA, Z. M.; BLASKOVICH, M. A. T. Quinolone antibiotics. **MedChemComm**, v. 10, n. 10, p. 1719-1739, 28 jun. 2019. DOI: 10.1039/c9md00120d.

PHIRI, N. *et al.* Antibiotic-resistant *Salmonella* species and *Escherichia coli* in broiler chickens from farms, abattoirs, and open markets in selected districts of Zambia. **Journal of Epidemiological Research**, v. 6, n. 1, p. 13, 25 set. 2020. DOI: 10.1101/2020.04.20.050914.

PITOUT, J. D. D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N. D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- $\beta$ -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5715–5721, dez. 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5715-5721.2004.

POONCHAREON, K. *et al.* Effectiveness of BOX-PCR in Differentiating Genetic Relatedness among *Salmonella enterica* Serotype 4,[5],12:i:- Isolates from Hospitalized Patients and Minced Pork Samples in Northern Thailand. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, 19 jun. 2019. DOI: 10.1155/2019/5086240.

POSSEBON, F. S. *et al.* Prevalence, antibiotic resistance, PFGE and MLST characterization of *Salmonella* in swine mesenteric lymph nodes. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 179, p. 105024, jun. 2020. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.105024.

PROROGA, Y. T. R. *et al.* Characterization of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant 1,4, [5],12:i:- isolated from different sources. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 6, p. 711–718, nov. 2019. DOI: 10.1007/s12223-019-00683-6.

QAMAR, F. N.; HUSSAIN, W.; QURESHI, S. Salmonellosis Including Enteric Fever. **Pediatric Clinics of North America**, v. 69, n. 1, p. 65-77, fev. 2022. DOI: 10.1016/j.pcl.2021.09.007.

QIN, X. *et al.* Antibiotic Resistance of *Salmonella* Typhimurium Monophasic Variant 1,4,[5],12:i:-in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, p. 532, 16 abr. 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11040532.

---

RAMTAHAL, M. A. *et al.* Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* in Poultry in South Africa Using the Farm-to-Fork Approach. **International Journal of Microbiology**, v. 2022, 13 jan. 2022. DOI: 10.1155/2022/5121273.

RANJBAR, R.; SAFARPOOR DEHKORDI, F.; HEIAT, M. The Frequency of Resistance Genes in *Salmonella* Enteritidis Strains Isolated from Cattle. **Iran J Public Health**, v. 49, n. 5, p. 968-974, maio 2020.

RASHEED, J. K. *et al.* Evolution of Extended-Spectrum-Lactam Resistance (SHV-8) in a Strain of *Escherichia coli* during Multiple Episodes of Bacteremia. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 3, p. 647-53, mar. 1997. DOI: 10.1128/AAC.41.3.647.

RAU, R. B. *et al.* *Salmonella enterica mcr-1* Positive from Food in Brazil: Detection and Characterization. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 3, p. 202–208, mar. 2020. DOI: 10.1089/fpd.2019.2700.

REEVES, P. Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 1, p. 17-22, jan. 1993. DOI: 10.1016/0168-9525(93)90067-R.

RENEWICK, J. *et al.* Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 377–384, jun. 2006. DOI: 10.1007/s11046-006-0021-1.

RHEN, M. *Salmonella* and Reactive Oxygen Species: A Love-Hate Relationship. **Journal of Innate Immunity**, v. 11, n. 3, p. 216-226, abr. 2019. DOI: 10.1159/000496370.

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 Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59-67. DOI: 10.1089/fpd.2006.3.59.

RODRÍGUEZ, E.; BAUTISTA, A.; BARRERO, L. First report of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolate with carbapenemase (KPC-2) in Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1263-4, fev. 2014. DOI: 10.1128/AAC.02423-13.

RYCHLIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n.1, p. 1-10, 10 jan. 2006. Doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.030.

SABRY, M. A. *et al.* Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella* serovars among healthy and diseased chickens and their public health implication. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 742–748, set. 2020. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.06.019.

SADIQ, S. *et al.* Molecular epidemiology of zoonotic *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry and human sources by multi locus sequence typing. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 41, n. 3, p. 264–268, 2021. DOI: 10.29261/pakvetj/2020.103.

SALADIN, M. *et al.* Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 2, p. 161–168, 9 abr. 2002. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x.

SÁNCHEZ-ROMERO, M. A.; CASADESÚS, J. Contribution of SPI-1 bistability to *Salmonella enterica* cooperative virulence: insights from single cell analysis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14875, 5 out. 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-33137-z.

SCHÜRCH, A. C. *et al.* Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 4, p. 350-354, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.12.016.

SCHWARTZ, D. C.; FT CANTOR, C. Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, maio 1984. DOI: 10.1016/0092-8674(84)90301-5.

SEIXAS, R. *et al.* Phenotypic and Molecular Characterization of *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- R-Type ASSuT Isolates from Humans, Animals, and Environment in Portugal, 2006-2011. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 11, p. 633–641, nov. 2016. DOI: 10.1089/fpd.2016.2156.

SERIBELLI, A. A. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from humans and foods in Brazil. **PloS one**, v. 15, n. 8, p. e0237886, 18 ago. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0237886.

SERIBELLI, A. A. *et al.* Phylogenetic relationship and genomic characterization of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from swine in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, p. 104977, set. 2021. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104977.

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. 5, p. 1428–1445, maio 2011. DOI: 10.1099/mic.0.044461-0.

SHAH, J. *et al.* Preadaptation to cold stress in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium increases survival during subsequent acid stress exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7281–7289, dez. 2013. DOI: 10.1128/AEM.02621-13.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6503-8, nov. 1990. Doi: 10.1093/nar/18.22.6503.

SILVA, F. P. DA *et al.* Effects of sub-lethal doses of nisin on the virulence of *Salmonella enterica* in *Galleria mellonella* larvae. **Research in Microbiology**, v. 172, n. 4–5, 1 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.resmic.2021.103836.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, 163, p. 688, abr. 1949. DOI: 10.1038/163688a0.

SIRSAT, S. A. *et al.* Effect of sublethal heat stress on *Salmonella* Typhimurium virulence. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 3, p. 813–822, mar. 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.04941.x.

SOUZA, M. N. *et al.* Molecular detection of *Salmonella* serovars Enteritidis, Heidelberg and Typhimurium directly from pre-enriched poultry samples. **British Poultry Science**, v. 60, n. 4, p. 388–394, ago. 2019. DOI: 10.1080/00071668.2019.1614525.

SOUZA, R. A. *et al.* Evaluation of four molecular typing methodologies as tools for determining taxonomy relations and for identifying species among *Yersinia* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 2, p. 141–150, ago. 2010. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.05.005.

SRIYAPAI, T. *et al.* Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporin and fluoroquinolone resistance genes in *Salmonella* and *Shigella* isolated from clinical specimens in Thailand. **Heliyon**, v. 8, n. 12, p. e12383, 15 dez. 2022. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e12383.

SU, L. H.; WU, T. L.; CHIU, C. H. Development of carbapenem resistance during therapy for non-typhoid *Salmonella* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 4, p. E91-4, abr. 2012. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03767.x.

SUEZ, J. *et al.* Virulence Gene Profiling and Pathogenicity Characterization of Non-Typhoidal *Salmonella* Accounted for Invasive Disease in Humans. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58449, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0058449.

SUN, H. *et al.* The Epidemiology of Monophasic *Salmonella* Typhimurium. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 2, p. 87–97, fev. 2020a. DOI: 10.1089/fpd.2019.2676.

SUN, R. Y. *et al.* Global clonal spread of *mcr-3*-carrying MDR ST34 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic 1,4,[5],12:i:- variants from clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 7, p. 1756–1765, 1 jul. 2020. DOI: 10.1093/jac/dkaa115.

TACK, B. *et al.* Invasive non-typhoidal *Salmonella* infections in sub-Saharan Africa: A systematic review on antimicrobial resistance and treatment. **BMC Medicine**, v. 18, n. 1, p. 212, 17 jul. 2020. DOI: 10.1186/s12916-020-01652-4.

TAMANG, M. D. *et al.* Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 11, p. 1199–1206, 1 nov. 2011. DOI: 10.1089/fpd.2011.0899.

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1042–1046, 2009. DOI: 10.1590/s0074-02762009000700019.

TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, Â. C. R.; FERNANDES, S. A. “Multiplex PCR” identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- In São Paulo State, Brazil: Frequency and antibiotic resistance patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 2, p. 115–117, mar. 2004. DOI: 10.1590/s0036-46652004000200012.

TENNANT, S. M. *et al.* Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e625, 9 mar. 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000621.

TENOVER, F. C. *et al.* Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–9, set. 1995. DOI: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995.

TÜMMLER, B. Molecular epidemiology in current times. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 4909-4918, 2020. DOI: 10.1111/1462-2920.15238.

TZOUVELEKIS, L. S. *et al.* Resistance to beta-lactams among blood isolates of *Salmonella* spp. in European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-98. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 2, p. 149-52, fev. 2003. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00507.x.

URBAN-CHMIEL, R. *et al.* Antibiotic Resistance in Bacteria - A Review. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, p. 1079, ago. 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11081079.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479-87, out. 2003. DOI: 10.1016/j.tim.2003.08.006.

VERSALOVIC, J. *et al.* Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.** v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991. DOI: 10.1093/nar/19.24.6823.

VILELA, F. P. *et al.* Virulence traits and expression of *bstA*, *fliC* and *sopE2* in *Salmonella* Dublin strains isolated from humans and animals in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 80, 1 jun. 2020. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104193.

WANG, H. *et al.* *Salmonella* Regulator STM0347 Mediates Flagellar Phase Variation via Hin Invertase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, 1 ago. 2022. DOI: 10.3390/ijms23158481.

WANG, X.; JORDAN, I. K.; MAYER, L. W. A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. **Molecular Medical Microbiology**, v. 1, p. 517–536, 2015. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00029-9.

WEMYSS, M. A.; PEARSON, J. S. Host Cell Death Responses to Non-typhoidal *Salmonella* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1758, 26 jul. 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01758.

WEN, S. C. H.; BEST, E.; NOURSE, C. Non-typhoidal *Salmonella* infections in children: Review of literature and recommendations for management. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 53, n. 10, p. 936–941, out. 2017. DOI: 10.1111/jpc.13585.

WESSELS, K.; RIP, D.; GOUWS, P. *Salmonella* in chicken meat: Consumption, outbreaks, characteristics, current control methods and the potential of bacteriophage use. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1742, jul. 2021. DOI: 10.3390/foods10081742.

WESTERMAN, T. L. *et al.* The *Salmonella* type-3 secretion system-1 and flagellar motility influence the neutrophil respiratory burst. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, 11 set. 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0203698.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 6, p. 1156–1168, jun. 2006. DOI: 10.1093/molbev/msj125.

WIN, A. T. *et al.* Sequence Analyses and Phenotypic Characterization Revealed Multidrug Resistant Gene Insertions in the Genomic Region Encompassing Phase 2 Flagellin Encoding *fljAB* Genes in Monophasic Variant *Salmonella enterica* Serovar 4,5,12:i:- Isolates From Various Sources in Thailand. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 4 out. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.720604.

XIE, X. *et al.* Pig as a reservoir of CRISPR type TST4 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant during 2009–2017 in China. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 1-4, 20 dez. 2019. DOI: 10.1080/22221751.2019.1699450.

YANG, X. *et al.* Prevalence and characterization of monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:-of food origin in China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 11 set. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0137967.

ZANGO, U. U. *et al.* A review on  $\beta$ -lactam antibiotic drug resistance. **MOJ Drug Design Development & Therapy**, v. 3, n. 2, p. 52-58, 5 abr. 2019. DOI: 10.15406/mojddt.2019.03.00080.

ZHAO, S. *et al.* Comparative genomic analysis of 450 strains of *Salmonella enterica* isolated from diseased animals. **Genes**, v. 11, n. 9, p. 2–16, 2020. DOI: 10.3390/genes11091025.

ZHENG, D. *et al.* Characterization of Human Origin *Salmonella* Serovar 1,4,[5],12:i:- in Eastern China, 2014 to 2018. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 18, n. 11, p. 790-797, nov. 2018. DOI: 10.1089/fpd.2021.0008.

