

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Caracterização molecular da diversidade genotípica, perfil de resistência e potencial patogênico de linhagens de *Salmonella* Infantis isoladas de fontes diversas no Brasil**

Felipe Pinheiro Vilela

Ribeirão Preto  
2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Caracterização molecular da diversidade genotípica, perfil de resistência e potencial patogênico de linhagens de *Salmonella* Infantis isoladas de fontes diversas no Brasil**

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

**Orientado:** Felipe Pinheiro Vilela

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

Ribeirão Preto  
2021

VILELA, F.V.	<b>Caracterização molecular da diversidade genotípica, perfil de resistência e potencial patogênico de linhagens de <i>Salmonella</i> Infantis isoladas de fontes diversas no Brasil</b>		MESTRADO FCFRP-USP 2021
--------------	--	--	-------------------------------

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

**Vilela, Felipe Pinheiro**

Caracterização molecular da diversidade genotípica, perfil de resistência e potencial patogênico de linhagens de *Salmonella* Infantis isoladas de fontes diversas no Brasil, 2021.

110 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* Infantis. 2. Epidemiologia molecular. 3 Resistência antimicrobiana. 4. Potencial patogênico

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Felipe Pinheiro Vilela

Caracterização molecular da diversidade genotípica, perfil de resistência e potencial patogênico de linhagens de *Salmonella* Infantis isoladas de fontes diversas no Brasil

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 Associados 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: \_\_\_\_\_

**Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios de pesquisa:**

**Laboratório de Bacteriologia, Epidemiologia Molecular, Virulência Bacteriana e Estudos da Genômica de Microrganismos** do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Pfrimer Falcão.

*Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) – Food and Drug Administration (FDA)*, na cidade de College Park, Maryland, Estados Unidos, sob a supervisão do Dr. Marc Allard e colaboração da Dr.<sup>a</sup> Maria Balkey, que coordenaram a realização do sequenciamento do genoma completo das linhagens estudadas.

*Kentucky Division of Lab Services, Centralized Lab Facility*, na cidade de Frankfort, Kentucky, Estados Unidos, onde foi realizado o sequenciamento do genoma completo das linhagens estudadas.

*Dedico este trabalho à minha família e aos meus grandes amigos, pelo apoio incondicional, força e incentivo durante esta trajetória.*

## Agradecimentos

À Deus, por nunca ter me abandonado, me deixado desamparado e deixado de me socorrer nas horas mais tristes, difíceis e sem esperança que eu e minha família enfrentamos. É graças ao Senhor que estou aqui hoje.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Juliana Pfrimer Falcão, pela oportunidade de realizar mais esta etapa acadêmica, pela confiança em meu trabalho, por todos os ensinamentos adquiridos, por sua postura exemplo de profissional e pessoa, e pela imensa paciência e calma em meus momentos de insegurança, nervosismo e erro. Minha eterna admiração e gratidão!

Aos meus pais Adriana e Sandro, à minha irmã Flávia, às minhas avós Darci e Jeannette e à minha tia Débora, pelo apoio incondicional, carinho, proteção, confiança e investimento. Mudar de rota, tendo o inesperado a frente, nunca será fácil. Porém, vocês deram o apoio para que eu me fortalecesse nesta decisão, me encorajaram, me fizeram erguer a cabeça nos momentos difíceis, me deram forças quando eu não tive, e que nos momentos de recompensa, comemoraram junto comigo. Sem vocês eu não existo. Meu amor infinito a vocês.

Ao meu avô José e minha bisavó Nair, cujo sonho de ambos era poder ver um de nós, netos e bisnetos, como estudante da Universidade de São Paulo. Vocês foram dois dos mais importantes pilares na minha formação, que me moveram, me protegeram e me fortaleceram ao longo de todas as minhas etapas. Ainda que infelizmente ambos tiveram que partir cedo demais e não puderam estar fisicamente comigo ao concluir de várias etapas, estaremos sempre juntos em espírito e alma. Espero ter honrado suas memórias, suas vidas e suas lutas ao ter me tornado Cirurgião-Dentista pela FORP-USP e (em breve) Mestre pela FCFRP-USP. Vocês estão sempre no meu coração.

Aos meus grandes amigos Amanda, Adrienne, Beatriz, Erick, Gabriel, Izadora, Juliane, Karen, Letícia, Nátali e Willian, a família que a Odontologia me deu direta ou indiretamente, e que apesar da distância e dos poucos encontros físicos, estão sempre comigo transmitindo seu carinho, apoio e força, e claro, aguardando pelo próximo reencontro.

À Nathália e Letícia, parceiras que o colegial colocou em minha vida e que a FCFRP uniu em um laço de muito carinho, parceria, diversão, bons momentos e incríveis lembranças.



Aos colegas de laboratório Amanda Aparecida Seribelli, Carolina Nogueira Gomes, Fábio Campioni, Giovana do Nascimento Pereira, Júlia Cunha Gonzales e Miliane Rodrigues Frazão, que conviveram, participaram desta trajetória e contribuíram de algum modo com minha formação.

Aos servidores técnicos Edson Alves Gomes e Eliane Pereira Figueiredo, pelo apoio técnico e serviços prestados, essenciais para a realização deste trabalho.

Às servidoras técnicas e administrativas Jaqueline Passaglia, Maraísa Palhão Verri e Vânia Cláudia de Albuquerque, pela ajuda na execução de experimentos, uso de equipamentos e na parte burocrática, respectivamente, e mais importante, pela amizade e bons momentos juntos.

À Dr<sup>a</sup>. Dália dos Prazeres Rodrigues, chefe do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (LABENT/IOC/FIOCRUZ) do Rio de Janeiro-RJ, ao Dr. Bruno Rocha Pribul e aos demais funcionários da mesma instituição, pela ajuda, disponibilidade e colaboração com e fornecimento das linhagens cedidas para este trabalho.

Ao *Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) – Food and Drug Administration (FDA)*, ao Dr. Marc W. Allard e a Dra. Maria Balkey, pela atenção, prontidão e suporte na coordenação do sequenciamento do genoma completo das linhagens deste estudo, mesmo durante a pandemia do Covid-19.

Aos funcionários do *Kentucky Division of Lab Services, Centralized Lab Facility*, pela realização em tempo hábil do sequenciamento do genoma completo das linhagens estudadas, mesmo durante a pandemia do Covid-19.

À Ana Lúcia Turatti e Rosana Florêncio, secretárias do setor de Pós-Graduação da FCFRP-USP, pelo apoio técnico e disponibilidade durante todo o projeto.

A todos os docentes da Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia (CCP-PPG-BBio), assim como à secretária Ana Lúcia Turatti e à colega de Mestrado Luisa Mestriner, pelos ensinamentos, experiências e bons momentos que pude ter como Representante Discente Titular da CCP-BBio no ano de 2020.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado (Proc. N° 2019/06947-6) e pelo auxílio financeiro ao laboratório e demais projetos, sob supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Pfrimer Falcão (Proc. N° 2016/24716-3 e 2019/19338-8).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro ao laboratório e demais projetos, sob supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Pfrimer Falcão (Proc. N° 304399/2018-3).

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

E finalmente, os meus mais sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Gostaria que você soubesse que existe dentro de si uma força capaz de mudar sua vida. Basta que lute e aguarde um novo amanhecer”*

**Margaret Thatcher**

## RESUMO

VILELA, F. P. **Caracterização molecular da diversidade genotípica, perfil de resistência e potencial patogênico de linhagens de *Salmonella* Infantis isoladas de fontes diversas no Brasil.** 2021. 110f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Infecções por sorovariedades não-tifóides de *Salmonella enterica* estão entre as principais doenças causadas por alimentos no mundo. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovariedade *Infantis* (*S. Infantis*) é uma sorovariedade não-tifoide, ubiqüitária, capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros animais além de humanos, e está entre as sorovariedades mais isoladas mundialmente. No Brasil, ainda que linhagens de *S. Infantis* apresentem uma elevada prevalência, poucos estudos caracterizaram um número expressivo de linhagens exclusivamente desta sorovariedade. Deste modo, o presente estudo teve como objetivos caracterizar a diversidade genotípica, verificar a presença de marcadores de virulência e os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos de linhagens de *S. Infantis* isoladas de fontes diversas no Brasil. Foram estudadas 80 linhagens de *S. Infantis*, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 em nove estados do Brasil. O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi determinado pela técnica de disco-difusão para 18 antimicrobianos. As linhagens foram molecularmente tipadas pela técnica de *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). A partir da realização do sequenciamento do genoma completo (WGS), as linhagens foram pesquisadas quanto a presença de 12 genes de virulência e de genes adquiridos e mutações pontuais em genes cromossômicos associadas à resistência a antimicrobianos. Além disso, as linhagens também foram caracterizadas pelas técnicas de *Multi-locus sequence typing* (MLST), *core genome MLST* (cgMLST) e pelas análises de *Single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) e *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) a partir dos dados do WGS. Um total de 72 linhagens (90,0%) apresentou resistência ou perfil intermediário de resistência a pelo menos um dos antimicrobianos estudados e 31 linhagens (38,8%) apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos de diferentes classes. As resistências de maior ocorrência nas linhagens estudadas foram: ampicilina (57,8%), piperaciclina (51,3%), tetraciclina (37,5%), cloranfenicol (35%), cefotaxime (30%), cefazolina (26,3%) e ceftriaxona (23,8%). Vale destacar que 42,5% das linhagens apresentaram perfis intermediários de resistência a ciprofloxacina. O PFGE dividiu as 80 linhagens de *S. Infantis* em 43 PFGE-tipos e três grupos distintos com uma similaridade  $\geq 80\%$  entre as linhagens de cada grupo e uma similaridade geral  $\geq 78,2\%$  entre as linhagens, além de ter apresentado um índice de discriminação (DI) de 0,966. Dentre os 12 genes de virulência pesquisados, os genes *invA*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *sipA*, *sipD*, *flgK*, *flgL*, *fljB*, *sifA* e *ssaR* foram detectados em todas as linhagens estudadas, enquanto o gene *spvB* não foi detectado em nenhuma das linhagens. Foram detectados os genes de resistência a aminoglicosídeos *aac(6')-Iaa* (100%) e *aadA12* (2,5%), os genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos *blaTEM-1* (40%), *blaCTX-M-8* (11,3%), *blaCMY-2* (10,0%) e *blaCMY-61* (1,3%), e os genes *dfrA8* (37,5%), *tet(A)* (36,3%) e *floR* (36,3%), que conferem resistência a compostos à base de diaminopirimidinas, às tetraciclinas e aos anfenicóis, respectivamente. Todas as linhagens estudadas apresentaram as mutações Gln624→Lys no gene *gyrB* e Thr57→Ser e Thr255→Ser no gene *parC*, enquanto uma linhagem apresentou a mutação Val702→Ala no gene *parC*, que são capazes de conferir resistência a quinolonas e fluoroquinolonas. A mutação Asp28→Tyr no gene *pmrA*, que pode conferir resistência a peptídeos antimicrobianos, também foi detectada em uma única linhagem. Todas as linhagens estudadas foram verificadas como pertencendo ao ST32 pelo MLST. O cgMLST e a análise de SNPs

dividiram as linhagens estudadas em três e dois grupos distintos, respectivamente, sendo que em ambas metodologias mais de 70% das linhagens foram alocadas em um mesmo grupo. A análise de CRISPR agrupou todas as linhagens em um único grupo, com similaridade geral entre todas as linhagens  $\geq 80,7\%$  e apresentou um DI de 0,696. Em conclusão, a alta prevalência dos genes cromossômicos de virulência detectados, envolvidos na motilidade, invasão celular e sobrevivência em células fagocíticas, reforça o potencial patogênico das linhagens *S. Infantis* estudadas em causar doença em humanos, assim como o risco de sua presença em alimentos, ambiente e fontes veterinárias. As altas taxas de linhagens apresentando perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos alertam para o potencial risco de falha terapêutica nas infecções causadas por *S. Infantis* em humanos quando o tratamento é necessário. A presença absoluta do ST32 entre as linhagens estudadas demonstra a dominância deste ST na sorovariedade *Infantis* e a capacidade do MLST em identificar precisamente linhagens desta sorovariedade. A técnica de PFGE discriminou adequadamente as linhagens e os resultados sugerem a circulação de um subtipo prevalente de *S. Infantis* em diferentes fontes e estados do país. Similarmente, a técnica de cgMLST e as análises de SNPs e CRISPR sugerem que a maioria das linhagens de *S. Infantis* estudadas descendem de um subtipo prevalente que tem contaminado humanos, animais, ambiente e alimentos, corroborando os achados do PFGE. Os resultados em conjunto reforçam o potencial perigo que as linhagens de *S. Infantis* de origem clínica e não-clínica estudadas possam representar para os âmbitos de saúde pública e segurança alimentar do Brasil.

Palavras-chave: *Salmonella* *Infantis*, gastroenterite, epidemiologia molecular, resistência antimicrobiana, potencial patogênico

## ABSTRACT

VILELA, F. P. **Molecular characterization of the genotypic diversity, resistance profile and pathogenic potential of *Salmonella* Infantis strains isolated from multiple sources in Brazil.** 2021. 110f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Infections caused by non-typhoid *Salmonella enterica* serovars are among the main causes of foodborne diseases worldwide. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Infantis (*S. Infantis*) is a non-typhoid and ubiquitous serovar, able to infect a broad range of hosts besides humans and is among the most isolated serovars in the world. In Brazil, although *S. Infantis* strains have demonstrated a high prevalence, few studies exclusively characterized an expressive number of strains of this serovar. In this way, the present study aimed to characterize the genotypic diversity, to verify the presence of virulence markers and the phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profiles of *S. Infantis* strains isolated from diverse sources in Brazil. A total of 80 *S. Infantis* strains isolated from food (n=27), the environment (n=24), humans (n=19), animals (n=7) and animal ration (n=3) between 2013 and 2018 from nine Brazilian states were studied. Antimicrobial susceptibility testing was performed by disk-diffusion for 18 antimicrobials. The strains studied were molecularly typed by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Whole-genome sequencing (WGS) was performed and its data were used for the search of 12 virulence genes, acquired resistance genes and chromosomal point mutations associated to antimicrobial resistance. In addition, the strains were also characterized by Multi-locus sequence typing (MLST), core genome MLST (cgMLST) and the analyses of Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) using WGS data. A total of 72 strains (90%) showed resistance or intermediate resistance profiles to at least one of the drugs tested and 31 (38,8%) showed resistance to three or more antimicrobials of three different drug classes. The most frequent resistant rates among the strains studied were ampicillin (57,8%), piperacillin (51,3%), tetracycline (37,5%), chloranphenicol (35,0%), cefotaxime (30,0%), cefazoline (26,3%) and ceftriaxone (23,8%). It is also important to notice that 42,5% of the strains exhibited intermediate resistance profiles to ciprofloxacin. PFGE divided the 80 *S. Infantis* strains into 43 PFGE-types, three distinct clusters with a  $\geq 80\%$  similarity among the strains comprised in each group and an overall similarity among all strains of  $\geq 78,2\%$ , and also presented a discriminatory index (DI) of 0,966. Among the 12 virulence markers searched, *invA*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *sipA*, *sipD*, *flgK*, *flgL*, *fljB*, *sifA* and *ssaR* were present in all strains, while *spvB* was absent in all strains analyzed. Strains also harbored aminoglycoside resistance genes *aac(6')-Iaa* (100%) and *aadA12* (2.5%),  $\beta$ -lactam resistance genes *bla<sub>TEM-1</sub>* (40%), *bla<sub>CTX-M-8</sub>* (11.3%), *bla<sub>CMY-2</sub>* (10.0%) and *bla<sub>CMY-6I</sub>* (1.3%), and resistance genes *dfrA8* (37.5%), *tet(A)* (36.3%) and *floR* (36.3%), which are capable to confer resistance to diaminopyrimidine compounds, tetracyclines and amphenicols, respectively. All strains presented the point mutations Gln624→Lys in *gyrB* gene and Thr57→Ser and Thr255→Ser in *parC* gene, while a single strain presented the point mutation Val702→Ala in *parC* gene, which are all capable to confer resistance to quinolones and fluoroquinolones. Also, a single strain showed mutation Asp28→Tyr in *pmrA* gene, which is capable to confer resistance to antimicrobial peptides. All strains studied belonged to ST32 as demonstrated by MLST. The SNP analysis and cgMLST clustered the strains into two and three distinct clusters, respectively, and in both methodologies above 70% of the strains were grouped into the same cluster. CRISPR analysis clustered all strains into the same cluster, with an overall similarity

among all strains of  $\geq 80.7\%$  and a 0,696 DI. In conclusion, the high prevalence of virulence markers detected, related to motility, cell invasion and survival within phagocytic cells, reinforces the pathogenic potential of this serovar to cause infections in humans, as well as the risk of its presence in food, and in environmental and veterinary sources. The high rates of strains presenting phenotypic and genotypic antimicrobial resistance alert for the potential risk of therapeutic failure in *S. Infantis* infections in humans when therapy is necessary. The absolute presence of ST32 revealed among the strains studied by MLST demonstrates the dominance of this ST among strains of serovar *Infantis* and the capacity of this methodology to precisely identify strains of this serovar. PFGE showed an adequate discriminatory capacity to differentiate the strains and its results suggest the circulation of a prevalent subtype of *S. Infantis* in different sources and states of the country. Similarly, cgMLST and SNP and CRISPR analyses suggest that the majority of the *S. Infantis* strains studied descend from a prevalent subtype that has been contaminating humans, animals, the environment and food, corroborating with PFGE results. Together, the results obtained reinforce the potential hazard that the *S. Infantis* strains of clinical and non-clinical sources studied may represent for the public health and food safety fields in Brazil.

Keywords: *Salmonella* *Infantis*, gastroenteritis, molecular epidemiology, antimicrobial resistance, pathogenic potential

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Gel de agarose 1% representando o produto da extração do DNA genômico de algumas linhagens de <i>S. Infantis</i> estudadas.....	37
<b>Figura 2</b> - Gel de agarose 1%, representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de <i>Salmonella</i> <i>Infantis</i> estudadas clivadas com a enzima <i>XbaI</i> .....	39
<b>Figura 3</b> - Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir dos padrões de fragmentos gerados por PFGE com a enzima <i>XbaI</i> para 80 linhagens de <i>Salmonella</i> <i>Infantis</i> estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.....	41
<b>Figura 4</b> - Dendrograma de similaridade genotípica gerado a partir da análise de SNPs das 80 linhagens de <i>Salmonella</i> <i>Infantis</i> estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.....	44
<b>Figura 5</b> - Diagrama de similaridade genotípica gerado através do <i>software</i> <i>PHYLOViZ</i> com os STs das 80 linhagens de <i>Salmonella</i> . <i>Infantis</i> estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) no Brasil entre 2013 e 2018, e os STs de 7.128 linhagens obtidas através da plataforma <i>Enterobase</i> .....	45
<b>Figura 6</b> - Dendrograma de similaridade genotípica gerado a partir da análise de cgMLST das 80 linhagens de <i>Salmonella</i> <i>Infantis</i> estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.....	47
<b>Figura 7</b> - Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir dos espaçadores detectados na análise de CRISPR das 80 linhagens de <i>Salmonella</i> <i>Infantis</i> estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.....	49



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Número de sorovarietades atualmente identificadas em cada espécie e subespécie do gênero <i>Salmonella</i> .....	03
<b>Tabela 2</b> - Ano, estado, material e fontes de isolamento das 80 linhagens de <i>Salmonella</i> Infantis estudadas.....	22
<b>Tabela 3</b> - Número e porcentagem de linhagens resistentes e que apresentaram perfis intermediários de resistência entre as 80 linhagens estudadas de <i>Salmonella</i> Infantis isoladas de alimentos, ambiente, humanos, animais e ração animal entre 2013 e 2018 no Brasil.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Do inglês, <i>Brain Heart Infusion</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC	Do inglês, <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFSAN	Do inglês, <i>Center for Food Safety and Applied Nutrition</i>
cgMLST	Do inglês, <i>core genome Multilocus sequence typing</i>
CLSI	Do inglês, <i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRISPR	Do inglês, <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DI	Do inglês, <i>discriminatory index</i> , ou Índice de Discriminação
D.O.	Densidade ótica
DNA	Do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
ECDC	Do inglês, <i>European Center for Disease Control and Prevention</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	Do inglês, <i>European Food Safety Authority</i>
EGM	Elementos genéticos móveis
ESBL	Do inglês, <i>Extended Spectrum Beta-Lactamase</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LABENT	Laboratório de Enterobactérias
MS	Ministério da Saúde
MH	Mueller Hinton
MLST	Do inglês, <i>Multilocus sequence typing</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFGE	Do inglês, <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PMQR	Do inglês, <i>Plasmid-mediated quinolone resistance</i>

QRDR	Do inglês, <i>quinolone resistance determining region</i>
RNA	Do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
SCV	Do inglês, <i>Salmonella Containing Vacuole</i>
SNP	Do inglês, <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
SPI	Do inglês, <i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
ssp.	espécie
SST	Sistema de Secreção Tipo
ST	Do inglês, <i>Sequence Type</i>
subesp.	subespécie
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSI	Do inglês, <i>Triple Sugar Iron</i>
UPGMA	Do inglês, <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WGS	Do inglês, <i>whole-genome sequencing</i> , ou sequenciamento de genoma completo
WHO	Do inglês, <i>World Health Organization</i>

**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\beta$	Beta
cm	Centímetro
NaCl	Cloreto de sódio
°C	Graus Celsius
kb	Kilobase
$\lambda$	Lambda
$\geq$	Maior que ou igual à
®	Marca Registrada
$\leq$	Menor que ou igual à
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometros
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanomolar
N	Normal
N°	Número
pb	Pares de base
%	Por cento
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
$\Sigma$	Somatório
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
v.	Versão
X	Veze
V	Volts

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	v
<b>LISTA DE TABELAS</b>	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	vii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Gênero <i>Salmonella</i> .....	1
1.1.1. Características e origem.....	1
1.1.2. Taxonomia e nomenclatura.....	1
1.2. Hospedeiros das diferentes sorovariedades de <i>Salmonella</i> .....	3
1.3. Transmissão e manifestações clínicas.....	4
1.3.1. Febre entérica.....	4
1.3.2. Gastroenterite.....	5
1.4. Dados epidemiológicos.....	6
1.5. <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovariedade <i>Infantis</i> .....	6
1.6. Genes de virulência.....	8
1.7. Susceptibilidade a antimicrobianos.....	10
1.8. Metodologias de tipagem bacteriana.....	12
1.8.1. <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE) .....	13
1.8.2. Sequenciamento de genoma completo (WGS) .....	13
1.8.3. Análise de <i>single-nucleotide polymorphisms</i> (SNPs) .....	15
1.8.4. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	16
1.8.5. <i>core genome</i> MLST (cgMLST).....	17
1.8.6. Análise de <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> (CRISPR). .....	17
1.9. Relevância do presente estudo.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
2.1. Objetivos gerais.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1. Linhagens Bacterianas.....	22
3.2. Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens.....	24
3.3. Extração e verificação da pureza e integridade do DNA genômico.....	25
3.4. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos.....	26
3.5. <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	27
3.5.1. Preparo, lise e digestão dos <i>plugs</i> de agarose.....	27
3.5.2. Condições da eletroforese em campo pulsado.....	28
3.5.3. Análise dos dados gerados.....	28
3.6. Sequenciamento do genoma completo (WGS) .....	29
3.6.1. Diluição do DNA.....	29
3.6.2. Fragmentação do DNA.....	29
3.6.3. Amplificação das bibliotecas.....	30
3.6.4. Purificação das bibliotecas.....	30
3.6.5. Normalização das bibliotecas.....	31
3.6.6. Mistura das bibliotecas.....	31
3.6.7. Análise dos dados gerados.....	32
3.7. Pesquisa de genes de virulência.....	32
3.8. Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos.....	33
3.9. Análises genômicas pelo sequenciamento do genoma completo (WGS) .....	33
3.9.1. Análise de <i>single-nucleotide polymorphisms</i> (SNPs) .....	33
3.9.2. <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	34
3.9.2. <i>core genome</i> MLST (cgMLST).....	34
3.9.3. Análise de <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> (CRISPR). 35	
3.10. Cálculo do índice de discriminação das metodologias de tipagem.....	36
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1. Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens.....	37
4.2. Extração e verificação da pureza e integridade do DNA genômico.....	37
4.3. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos.....	37
4.4. <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE) .....	38
4.5. Sequenciamento do genoma completo (WGS) .....	42

4.6. Pesquisa de genes de virulência.....	42
4.7. Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos.....	42
4.8. Análise de <i>single-nucleotide polymorphisms</i> (SNPs) .....	43
4.9. <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) .....	45
4.10. <i>core genome</i> MLST (cgMLST) .....	45
4.11. Análise de <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> (CRISPR)..	48
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Gênero *Salmonella*

#### 1.1.1. Características e origem

O gênero *Salmonella* pertence à ordem *Enterobacterales* e à família *Enterobacteriaceae*. É composto por bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, flagelados, não formadores de esporos, fermentadores de glicose, termófilos, com temperatura ótima de crescimento em 37°C, diâmetro de 0,7 a 1,5µm e comprimento de 2 a 5 µm (MS, 2011; CAMPOS, 2015; RYAN et al., 2017).

As bactérias do gênero *Salmonella* foram relatadas pela primeira vez em 1880 por Karl Joseph Eberth, que ao analisar amostras de pacientes que apresentavam a febre tifoide, nomeou o agente causador da doença de “*Eberthella typhosa*” em sua própria homenagem. Em 1884, Georg Gaffky foi o responsável por isolar pela primeira vez o bacilo causador da doença, confirmando assim as observações de Eberth. Pouco depois no mesmo ano, o patologista veterinário Daniel Elmer Salmon e seu assistente, o bacteriologista Theobald Smith, foram os primeiros a isolar a *Salmonella Choleraesuis* de intestino de porco ao pesquisar o agente causador da cólera em suínos, tendo então o nomeado como “*Bacillus choleraesuis*”. No entanto, foi em 1900 foi que o bacteriologista Joseph Lignières propôs o nome *Salmonella* ao gênero, em homenagem aos estudos de Salmon (GOSSNER et al., 2016; MONTE & SELLERA, 2020).

#### 1.1.2. Taxonomia e nomenclatura

Ainda que sejam complexas, controversas e já tenham sofrido diversas alterações, atualmente a nomenclatura e taxonomia de *Salmonella* são determinadas pelo Centro de Referência e Pesquisa em *Salmonella* do Instituto Pasteur da Organização Mundial da Saúde (OMS) em Paris, na França (BRENNER et al., 2000).

O gênero *Salmonella* atualmente é dividido nas espécies *bongori* e *enterica*, sendo que esta última é composta por seis subespécies denominadas *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. As espécies e subespécies são ainda, por sua vez, identificadas em sorovariedades a partir de uma classificação sorológica denominada Esquema Kaufmann-White, que se baseia na identificação dos antígenos somáticos (O), flagelares (H), e quando presente, do antígeno capsular (Vi) (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014; CAMPOS, 2015; RYAN et al., 2017).

Os antígenos somáticos O fazem parte da constituição dos lipopolissacarídeos presentes na superfície da membrana externa deste microrganismo, que determinam os



sorogrupos aos quais as sorovariedades de *Salmonella* pertencem, sendo designados por números arábicos. Sua identificação é feita em duas etapas, sendo que na primeira é realizada a aglutinação em lâmina para determinar o grupo ao qual o isolado pertence, e posteriormente à determinação do grupo, são testados os antissoros específicos para a identificação dos antígenos individuais (RYAN et al., 2017).

Os antígenos flagelares (H1 e H2) são compostos por subunidades da proteína flagelina, que representam a porção filamentosa dos flagelos bacterianos. Sua identificação é realizada em duas etapas, do mesmo modo que para os antígenos somáticos O. As sorovariedades de *Salmonella* podem tanto apresentar nenhum flagelo, sendo assim imóveis, quanto apresentar apenas um flagelo de fase única, sendo denominadas monofásicas. No entanto, a maioria apresenta flagelos de fase 1 e 2, sendo assim denominadas bifásicas. A nomenclatura dos antígenos de fase 1 é dada por letras minúsculas do alfabeto, e para os antígenos de fase 2 por números arábicos. Tendo em vista que o número de antígenos flagelares de fase 1 é maior que o número de letras do alfabeto, utiliza-se a letra z com expoentes numéricos, tais como z1, z2, z3, etc (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014; CAMPOS, 2015; RYAN et al., 2017).

Finalmente, o antígeno capsular Vi apresenta um único tipo sorológico. Este é mais frequentemente encontrado em amostras da sorovariedade Typhi, podendo ocasionalmente ser encontrado nas sorovariedades Paratyphi C e Dublin (CAMPOS, 2015; RYAN et al., 2017).

Atualmente, cerca de 2.659 sorovariedades de *Salmonella* foram identificadas (Tabela 1). As sorovariedades da espécie *bongori* e as sorovariedades da espécie *enterica* das subespécies *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* são menos isoladas, e geralmente estão presentes no ambiente e em animais de sangue frio, como anfíbios e répteis. No entanto, cerca de 96% dos isolados de *Salmonella* pertencem a uma das 1.586 sorovariedades identificadas da espécie *enterica* subespécie *enterica* (Tabela 1), que são capazes de infectar uma ampla gama de animais de sangue quente, como aves e mamíferos, incluindo ainda aquelas sorovariedades patogênicas para o ser humano (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014; CAMPOS, 2015; RYAN et al., 2017).

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

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

Fonte: ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014

Rotineiramente, as sorovariedades da subespécie *enterica* não são referidas por suas fórmulas antigênicas, mas sim por nomes que podem representar seu local inicial de isolamento, como as sorovariedades Dublin, Heidelberg e Panama, seu hospedeiro, como *Infantis* e *Gallinarum*, ou a doença causada, como *Typhi* e *Enteritidis* (BRENNER et al., 2000; CAMPOS, 2015). Ademais, ao contrário da nomenclatura das espécie e subespécies, onde utiliza-se a escrita na forma minúscula e em itálico, tal formato não é empregado para as sorovariedades, sendo escritas sem formatações específicas e com sua letra inicial maiúscula. Deste modo, ao se referir rotineiramente às sorovariedades de *Salmonella*, pode-se utilizar uma terminologia simplificada, como por exemplo *Salmonella* *Infantis*, ao invés de sua nomenclatura completa, que seria *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovariedade *Infantis* (BRENNER et al., 2000; CAMPOS, 2015).

## 1.2. Hospedeiros das diferentes sorovariedades de *Salmonella*

As sorovariedades de *Salmonella enterica* da subespécie *enterica* são capazes de infectar uma ampla gama de animais de sangue quente, como aves e mamíferos, incluindo o ser humano, e podem ser agrupadas de acordo com o tipo de hospedeiro que são capazes de infectar (UZZAU et al., 2000; AGBAJE et al., 2011; CAMPOS, 2015).

As sorovariedades hospedeiro-restritas são aquelas capazes de infectar exclusivamente um único tipo de hospedeiro, como por exemplo *Salmonella* *Typhi*, *Paratyphi C* e *Sendai* em humanos, *Salmonella* *Abortusovis* em ovinos e *Salmonella* *Typhisuis* em suínos. Já as sorovariedades hospedeiro-adaptadas são fortemente associadas a hospedeiros específicos, como *Salmonella* *Dublin* em bovinos e *Salmonella* *Choleraesuis* em suínos, mas eventualmente podem resultar em infecções em outros hospedeiros, como os humanos. Finalmente, as sorovariedades ubiqüitárias não possuem um hospedeiro específico

e são capazes de infectar uma ampla gama de animais incluindo o ser humano, como *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium e Infantis (UZZAU et al., 2000; AGBAJE et al., 2011; MS, 2011).

As sorovariedades capazes de infectar humanos ainda podem ser classificadas de acordo com a doença que causam. São chamadas de sorovariedades tifóides aquelas capazes de causar a febre entérica em humanos, como as sorovariedades Typhi, Paratyphi A, B e C e Sendai. Já as sorovariedades não-tifóides são aquelas que usualmente causam quadros de gastroenterite em humanos, podendo em alguns casos estar relacionadas a quadros de infecções extra-intestinais e sepse, usualmente em indivíduos imunocomprometidos. Algumas das sorovariedades não-tifóides mais comuns são *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Infantis e Heidelberg, por exemplo (UZZAU et al., 2000; BHAN et al., 2005; CAMPOS et al., 2015).

### **1.3. Transmissão e manifestações clínicas**

A contaminação por *Salmonella* se dá majoritariamente pela via fecal-oral, que usualmente ocorre pelo consumo de água, vegetais e hortaliças, leite e, principalmente, ovos e produtos cárneos crus ou malcozidos, que tenham sido expostos ao microrganismo e foram contaminados. Exposições indiretas, como por exemplo entre trabalhadores e operadores de granjas e abates também podem ocasionalmente ocorrer (MS, 2011; CAMPOS, 2015).

As principais manifestações clínicas da infecção por sorovariedades de *Salmonella* em humanos são a febre entérica e a gastroenterite, que ocorrem em decorrência da contaminação por sorovariedades tifóides e não-tifóides, respectivamente (MS, 2011; CAMPOS, 2015).

#### **1.3.1. Febre entérica**

A febre entérica em humanos, que também pode ser denominada de febre tifoide ou paratifoide a depender do seu agente causador, é causada pelas sorovariedades tifóides *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B e C e *Salmonella* Sendai. A doença se estabelece diretamente pela via fecal-oral através do contato ou consumo de água e alimentos contaminados exclusivamente com fezes humanas, sendo intimamente relacionada à falta de saneamento básico, condições precárias de higiene pessoal e indivíduos em quadros de imunossupressão (BHAN et al., 2005; MS, 2011; CAMPOS, 2015).

O período de incubação de um quadro típico e não-complicado de febre entérica dura em torno de 10 a 14 dias, sendo que a partir deste período se iniciam os primeiros sintomas da doença, que podem incluir febre baixa e prolongada por 10 a 14 dias, dor de cabeça frontal, dor abdominal, mal-estar generalizado, dor muscular, tosse seca, lesões eritematosas corporais pequenas, anorexia, náusea, calafrios e letargia. A febre pode se tornar progressivamente alta durante a segunda semana e depois retornar à normalidade, podendo levar até quatro semanas para tal diminuição se não houver tratamento apropriado. O mal-estar e a letargia podem levar ainda dois meses para recuperação completa. Ainda que a maioria dos casos se restrinja à febre e alguns outros poucos sintomas, indivíduos imunocomprometidos podem desenvolver quadros severos que podem incluir sangramentos gastrointestinais, perfurações intestinais, encefalopatia e pneumonias, que se não tratados rápida e adequadamente com antibióticos apropriados, podem levar ao óbito do paciente (BHAN et al., 2005; CAMPOS, 2015).

### **1.3.2. Gastroenterite**

A gastroenterite em humanos é a doença causada pelas sorovariedades não-tifóides de *Salmonella*, como Enteritidis, Typhimurium, Infantis e Heidelberg, por exemplo, e ocorre em decorrência do consumo de água, vegetais e hortaliças, leite e, principalmente, ovos e produtos cárneos crus ou malcozidos contaminados com o microrganismo. Ao contrário das sorovariedades tifóides, que colonizam exclusivamente humanos, as não-tifóides colonizam usualmente uma ampla gama de animais e podem ser transmitidas para o humano diretamente pelo consumo de sua carne e produtos derivados contaminados, e não exclusivamente pela contaminação com fezes humanas (MS, 2011; CAMPOS, 2015; CDC, 2019a).

A doença possui um período de incubação curto de 48 horas em média, e é caracterizada por sintomas de diarreia com ou sem sangue, febre inicial aguda, dor de cabeça, náuseas, vômito e dor abdominal por no máximo 10 dias, sendo que os microrganismos são ainda encontrados nas fezes por 4 a 5 semanas. A doença é geralmente autolimitante e facilmente controlada com a administração de água e eletrólitos. No entanto, uma pequena parcela de casos geralmente associados à pacientes imunocomprometidos podem eventualmente evoluir para quadros de infecção de urina, pneumonia, meningites e sepse, requerendo assim o tratamento com antimicrobianos (MS, 2011; CAMPOS, 2015; CDC, 2019a)

#### 1.4. Dados epidemiológicos

Infecções bacterianas de origem alimentar representam um grave problema de saúde pública mundial, não apenas devido às altas taxas de morbidade e mortalidade associadas a tais doenças, mas também devido ao significativo impacto negativo na economia de setores de saúde, veterinária e de produção alimentar (BUZBY & ROBERTS, 2009; TAUXE et al., 2010). Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que anualmente 550 milhões de indivíduos adoecem e 230 mil morrem em decorrência de infecções alimentares no mundo, sendo estes casos majoritariamente associados a infecções por bactérias dos gêneros *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Vibrio* spp. (HAVELAAR et al, 2015; WHO, 2020).

Infecções por sorovariedades não-tifóides de *Salmonella enterica* são consideradas uma das quatro maiores causas de diarreia no mundo, contabilizando aproximadamente 93.8 milhões de casos e 155 mil mortes anualmente (MAJOWICKZ et al., 2010; WHO, 2018). Estimativas sugerem que, apenas nos Estados Unidos, 1,3 milhões de casos, 26.500 hospitalizações e 420 mortes ocorram todos os anos em decorrência de infecções por estes microrganismos (CDC, 2021). Na União Europeia, dados demonstram que sorovariedades não-tifóides de *Salmonella enterica* são o segundo agente causador mais prevalente em casos de gastroenterite em humanos, responsáveis por aproximadamente um a cada três surtos de infecções alimentares identificados e por mais de 91 mil casos de salmonelose em 2018 (EFSA & ECDC, 2019).

No Brasil, as infecções por sorovariedades não-tifóides de *Salmonella enterica* são consideradas como a segunda maior causa de doenças transmitidas por alimentos no país (MS, 2019). Porém, ainda que casos de salmonelose sejam de notificação compulsória no país, o real panorama da doença e do número de casos em território nacional é incerto, tendo em vista que casos de subnotificação podem ocorrer em decorrência da natureza auto limitante da doença na maioria dos casos (CAETANO & PAGANO, 2019; MS, 2019).

#### 1.5. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovariedade *Infantis*

A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovariedade *Infantis* (*S. Infantis*) é uma sorovariedade não-tifoide, ubiquitária, capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros animais além de humanos, e está entre as sorovariedades mais isoladas mundialmente.

O principal reservatório animal de *S. Infantis*, assim como a principal via de transmissão para humanos por contaminação alimentar, são os frangos seguidos dos bovinos

e suínos. No entanto, devido à capacidade de sobrevivência desta sorovariedade em diversos ambientes e alimentos, sua presença também já foi reportada em outros tipos de animais de criação, animais domésticos, mamíferos e aves selvagens, répteis e até insetos (OLSEN & HAMMACK, 2000; MACIEL et al., 2009; MEDEIROS et al., 2011; IKWAP et al., 2014; PAIXÃO et al., 2014; GELAW et al., 2018; CUNHA-NETO et al., 2018; AMMAR et al., 2019).

Sua principal manifestação clínica é a gastroenterite, causada majoritariamente pelo consumo de produtos cárneos contaminados de origem aviária, suína e bovina crus ou malcozidos. Ainda que pouco reportados, casos de infecções extra intestinais podem ocorrer principalmente em indivíduos imunocomprometidos, sendo que uma característica peculiar de *S. Infantis* é a associação a casos de gastroenterite em recém-nascidos e crianças de pouca idade em instalações hospitalares (MORAES et al., 2000; PESSOA-SILVA et al., 2002; NÓGRÁDY et al., 2005; ALMEIDA et al., 2013; OZDEMIR & ACAR, 2014; RANJBAR et al., 2016; BROWN et al., 2018).

*S. Infantis* é reportada em diversos continentes do mundo como uma das sorovariedades mais prevalentes de *Salmonella* em diferentes fontes de isolamento, sendo usualmente apenas menos isolada que *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (THAI et al., 2012; HARA-KUDO et al., 2013; RAHMANI et al., 2013; SHAHADA et al., 2013; OZDEMIR & ACAR, 2014; IKWAP et al., 2014; CRIM et al., 2015; MARZEL et al., 2016; GELAW et al., 2018; AMMAR et al., 2019; EFSA & ECDC, 2019). Na União Europeia, *S. Infantis* foi a quarta sorovariedade mais isolada em casos de salmonelose em humanos entre 2016 e 2018 (EFSA & ECDC, 2019). Nos Estados Unidos, esta sorovariedade foi a sexta mais isolada entre humanos em 2014, além de ter apresentado um aumento de 162% em suas taxas de isolamento em relação aos anos de 2006 a 2008 (CRIM et al., 2015). Na Ásia, *S. Infantis* foi a quarta sorovariedade mais detectada em Israel em casos esporádicos em humanos entre 1995 e 2012, contabilizando mais de 5.400 casos por ano, e na Turquia foi a quarta mais detectada em isolados de fezes humanas entre 2004 e 2010. Já no Japão, Irã e Vietnã, foi a sorovariedade mais isolada em fontes diversas como frangos vivos e carcaças, alimentos a granel, efluentes de esgoto e superfícies de mesas (THAI et al., 2012; HARA-KUDO et al., 2013; RAHMANI et al., 2013; SHAHADA et al., 2013; OZDEMIR & ACAR, 2014; MARZEL et al., 2016). Na África, foi a segunda sorovariedade mais prevalente em frangos no Egito em 2017 e 2018, a terceira em suínos na Uganda em 2011 e 2012 e a quarta em

bovinos, aves, equinos, caprinos e ovinos na África do Sul entre 2007 e 2014 (IKWAP et al., 2014; GELAW et al., 2018; AMMAR et al., 2019).

No Brasil, a sorovariedade *Infantis* foi previamente reportada como a segunda mais isolada em carcaças de frango congeladas entre 2004 e 2006 em 15 cidades localizadas nas cinco regiões do país, a primeira em efluentes de esgoto de estações de tratamento de água em 2011, a primeira em carcaças de frango em matadouros do Mato Grosso entre 2014 e 2015 e a segunda em *swabs* de arrasto de granjas em 2009 e 2010 em Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul (MEDEIROS et al., 2011; KRZYZANOWSKI et al., 2014; VOSS-RECH et al., 2015; CUNHA-NETO et al., 2018). Já entre casos em humanos no país, *S. Infantis* foi a quinta sorovariedade mais isolada em amostras de sangue, fezes, urina e fluidos diversos entre pacientes hospitalizados de uma unidade de emergência de um hospital universitário em Ribeirão Preto - SP entre 1985 e 1999, além de ter sido associada a surtos em recém-nascidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) de hospitais públicos e universitários do Rio de Janeiro - RJ entre 1995 e 1999 (MORAES et al., 2000; CASTRO et al., 2002; PESSOA-SILVA et al., 2002, FONSECA et al., 2006).

### 1.6. Genes de virulência

Similarmente a outras sorovariedades de *Salmonella*, *S. Infantis* dispõe de um amplo conjunto de fatores de virulência codificados por diversos genes que visam favorecer o escape do microrganismo do sistema imune do hospedeiro, como a formação de cápsula, fimbrias, pili e flagelos, secreção de adesinas e toxinas e favorecimento da invasão, sobrevivência e replicação em células do hospedeiro. A presença destes genes de virulência, que podem estar alocados tanto no cromossomo bacteriano quanto em elementos móveis como plasmídeos, são indicativos importantes do potencial patogênico destas linhagens (MARCUS et al., 2000; ALMEIDA et al., 2013; JAJERE, 2019).

A maioria dos genes que codificam importantes fatores de virulência em *Salmonella* encontra-se no cromossomo, mais especificamente em grandes regiões genéticas altamente conservadas que são responsáveis por codificar proteínas associadas à virulência, denominadas de Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (do inglês *Salmonella Pathogenicity Islands*, ou SPIs). Atualmente, ainda que grande parte dos seus genes ainda não tenham sua função definida, mais de 20 SPIs já foram identificadas. As principais SPIs e mais amplamente estudadas são as SPI-1 e SPI-2, responsáveis por codificar a formação de sistemas de secreção do tipo III (SST3), que são estruturas localizadas na superfície de

bactérias Gram-negativas capazes de funcionar como seringas moleculares que injetam proteínas efetoras diretamente no citosol da célula do hospedeiro (MARCUS et al., 2000; DIEYE et al., 2009; RYCHLIK et al., 2009; JAJERE, 2019).

Ao codificar o SST3, a SPI-1 atua injetando proteínas efetoras no citosol das células epiteliais intestinais, promovendo rearranjos do citoesqueleto celular que levam à invasão destas células pela bactéria e ao início da resposta inflamatória no intestino. Entre os genes da SPI-1 que codificam as principais proteínas estão o *invA*, responsável por codificar proteínas internas de membrana do SST3, *sipA* e *sipD*, que atuam na internalização da bactéria e translocação de proteínas efetoras, e os genes *sopA*, *sopB*, *sopD* e *sopE2*, que atuam na remodelação da actina da membrana da célula hospedeira e medeiam a secreção de fluidos e inflamação (DIEYE et al., 2009; RYCHLIK et al., 2009; JAJERE, 2019).

Diferentemente da SPI-1, o SST3 codificado pelos genes da SPI-2 é ativado intracelularmente em células fagocíticas como macrófagos, onde realizam o transporte de proteínas efetoras pela membrana de compartimentos intracelulares de replicação bacteriana, denominados *Salmonella containing vacuoles* (SCVs), para dentro do sistema endomembrana e citoplasma da célula hospedeira, atuando assim na replicação bacteriana em tais células. Entre os principais genes da SPI-2 estão o *ssaR*, que está envolvido na codificação de proteínas estruturais do SST3, e *sifA*, que está relacionado ao funcionamento do SCV e na replicação bacteriana (DIEYE et al., 2009; RYCHLIK et al., 2009; JAJERE, 2019).

Além das SPIs, outros fatores de virulência também se mostram de importante contribuição na patogênese de *Salmonella*, como por exemplo os flagelos, que atuam promovendo motilidade a bactéria no meio em que se encontra, e são codificados por genes cromossômicos como *flgK*, *flgL* e *fljB* (WOSNIAK et al., 2010; SHAH et al., 2011; JAJERE, 2019).

Entre as sorovariedades de *Salmonella*, plasmídeos também são relatados e podem desempenhar diferentes papéis em sua virulência. Entre os principais genes relatados que podem estar contidos em tais plasmídeos, o *operon spvRABCD* contribui na fase sistêmica da infecção, atuando na sobrevivência e replicação intracelular (MAZURKIEWICZ et al., 2008; GUINEY & FIERER, 2011). Ademais, estudos também demonstram a presença de um mega plasmídeo emergente sorovariedade-específico, de aproximadamente 277kb e pertencendo aos grupos de incompatibilidade IncI/IncP, em linhagens *S. Infantis* isoladas em diversos países, que carregam não só genes de resistência a antimicrobianos mas também



genes de virulência ligados a funções de regulação, captação de ferro e tolerância ao estresse oxidativo, cuja presença sugere maior adesão e invasão a células do hospedeiro, maior inflamação intestinal em modelos animais e formação de biofilme mais acentuada (AVIV et al., 2014; SZMOLKA et al., 2018; ALBA et al., 2020; BOGOMAZOVA et al., 2020).

### **1.7. Susceptibilidade a antimicrobianos**

As infecções por sorovariedades não-tifóides de *Salmonella* geralmente são auto limitantes e não requerem o uso de agentes antimicrobianos para seu tratamento, que são geralmente empregados apenas quando pacientes imunocomprometidos são acometidos ou infecções de maior gravidade se desenvolvem, sendo as fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira e quarta geração as drogas de escolha no tratamento da doença (HAEUSLER & CURTIS, 2012; CHRISTENSON, 2012; McDERMOTT et al., 2018).

No entanto, o crescente aumento no número de linhagens de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos mostra-se como um grave impedimento para o tratamento adequado de tais infecções, o que levou o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos em 2019 a classificar as infecções por sorovariedades não-tifóides e resistentes de *Salmonella* em um nível de “ameaça séria” (CDC, 2019b). Além disso, este fato também representa um importante problema de saúde pública e segurança alimentar, tendo em vista que a disseminação destes microrganismos se dá principalmente pelo consumo de alimentos contaminados e condições de higiene precárias (HAEUSLER & CURTIS, 2012; CHRISTENSON, 2012; McDERMOTT et al., 2018; CDC, 2019b).

Linhagens de *S. Infantis*, ainda que sejam reportadas como usualmente sensíveis a maioria dos antimicrobianos, vem demonstrando nos últimos anos um aumento no número de linhagens resistentes não só às cefalosporinas de terceira e quarta geração e fluoroquinolonas, que são os antimicrobianos de escolha para tratamento humano, mas também a drogas como tetraciclinas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e fenicóis, que são pouco utilizadas atualmente na terapia humana mas são eventualmente empregadas na terapia veterinária e utilizadas ilegalmente como promotores de crescimento em animais de produção (FRANCO et al., 2015; FOLSTER et al., 2017; BROWN et al., 2018; ACAR et al., 2019; WAJID et al., 2019).

Dentre as drogas de escolha para tratamento das infecções por *Salmonella*, os antimicrobianos da classe das quinolonas e fluoroquinolonas, como ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina e levofloxacina, atuam inibindo a síntese do DNA bacteriano ao

se ligarem às proteínas DNA girase, codificada pelos genes cromossômicos *gyrA* e *gyrB*, e topoisomerase IV, codificada pelos genes cromossômicos *parC* e *parE* (HAWKEY, 2003; ALDRED et al., 2014; VILELA et al., 2019). O principal mecanismo de resistência a estas drogas se dá através de mutações pontuais nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, localizados na *quinolone resistance determining region* (QRDR), que podem levar a substituições nas sequências de aminoácidos da DNA girase e topoisomerase IV e resultar em diferentes níveis de resistência a estes antimicrobianos (HAWKEY, 2003; ALDRED et al., 2014; VILELA et al., 2019). Ainda, genes de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR) também estão associados a resistência a estes antimicrobianos, como os genes *qnrABCDS*, que codificam pentapeptídeos capazes de bloquear a ação da ciprofloxacina na DNA girase e topoisomerase IV, os genes *oqxAB* e *qepA*, que codificam a formação de bombas de efluxo, e o gene *aac(6')-Ib-cr* que codifica uma enzima acetiltransferase capaz de inibir a ação de antibióticos aminoglicosídeos e reduzir a susceptibilidade a ciprofloxacina (PARK et al., 2006; GOUDARZI et al., 2015; VILELA et al., 2019).

Já as cefalosporinas de terceira geração como ceftriaxona, ceftazidime e cefotaxime, e de quarta geração, como cefepime, pertencem ao grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, que atuam impedindo a síntese das moléculas de peptideoglicano constituintes das paredes celulares bacterianas através da ligação do anel  $\beta$ -lactâmico presente na molécula destes antimicrobianos com as chamadas proteínas ligadoras de penicilina (LIVERMORE & WOODFORD, 2006; ALTERTHUM, 2015, ANDRADE & DARINI, 2017). A resistência aos antimicrobianos desta classe ocorre em bactérias Gram-negativas com maior frequência pela presença de genes geralmente de origem plasmidial que codificam a formação das chamadas enzimas  $\beta$ -lactamases, capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico destes antimicrobianos e assim inativar suas moléculas (LIVERMORE & WOODFORD, 2006; ALTERTHUM, 2015, ANDRADE & DARINI, 2017). Entre os genes codificadores destas enzimas que são mais prevalentes entre linhagens resistentes de sorovarietades não-tifoídes de *Salmonella* estão o *bla<sub>CMY</sub>*, que codificam enzimas do tipo cefamicinase/ $\beta$ -lactamases tipo AmpC, e *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>*, que codificam enzimas  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBLs) (CHOI et al., 2015; FRANCO et al., 2015; BROWN et al., 2018; McDERMOTT et al., 2018; VILELA et al., 2020a)

Entre outros mecanismos de resistência a antimicrobianos que são amplamente prevalentes em linhagens de *Salmonella*, pode-se ainda citar as bombas de efluxo codificadas pelos genes *tet(ABCD)*, que são os principais mecanismos de resistência a

tetraciclina; as diversas variantes dos genes *aac*, *aph* e *ant/aad*, que codificam a formação de enzimas modificadoras que promovem a inativação de aminoglicosídeos; os genes *catAB* e *floR*, que levam à resistência aos fenicóis pela produção de enzimas inativadoras e transportadores de drogas, respectivamente; e as variantes dos genes *sul* e *dfr*; que promovem respectivamente a resistência a sulfonamida e sua associação com compostos à base de diaminopirimidinas, como o trimetoprim (ROBERTS, 1996; SCHNAPPINGER & HILLEN, 1996; SKÖLD, 2001; SCHWARZ et al., 2004; RAMIREZ & TOLMASKY, 2010; POULIKAKOS & FALAGAS, 2013; VILELA et al., 2019; VILELA et al., 2020a).

### 1.8. Metodologias de tipagem bacteriana

Diversas metodologias de tipagem bacteriana baseadas em testes fenotípicos, como a biotipagem, sorotipagem, fagotipagem e a determinação de perfis de susceptibilidade a antimicrobianos, foram utilizadas ao longo dos anos com finalidades epidemiológicas. Dentre estes, a sorotipagem ainda é amplamente empregada na caracterização de linhagens de *Salmonella*, se baseando na identificação sorológica dos antígenos somáticos (O), flagelares (H, de fase 1 e 2) e, quando presentes, capsulares (Vi) para a determinação de suas sorovariedades. No entanto, em decorrência da alta variabilidade e ocorrência de recombinações nos genes que codificam os antígenos somáticos e flagelares, um elevado número de sorovariedades são atualmente descritas (REEVES, 1993; OLIVE & BEAN, 1999)

Tais métodos baseados em testes fenotípicos têm cada vez mais caído em desuso em razão de suas limitações, como a baixa reprodutibilidade e capacidade de diferenciação de subtipos dentre uma determinada espécie (REEVES, 1993; OLIVE & BEAN, 1999). No entanto, o crescente número de técnicas de tipagem baseadas em métodos genotípicos, que foram desenvolvidas nas últimas décadas, vem demonstrando o papel essencial de tais metodologias para a identificação e caracterização de microrganismos, detecção de surtos, interpretação de padrões de infecção e rotas de transmissão de diferentes patógenos (OLIVE & BEAN, 1999; SACHSE & MOEBIUS, 2015).

Assim como para outras sorovariedades de *Salmonella*, diversas metodologias genotípicas de tipagem molecular bacteriana tem sido empregadas com sucesso ao longo dos anos para caracterização de linhagens de *S. Infantis*, como *IS200-polymerase chain reaction* (IS200-PCR), *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *Repetitive extragenic palindromic PCR* (rep-PCR), *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *Enterobacterial*

*repetitive intergenic consensus-PCR* (ERIC-PCR), *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Multi-locus variable tandem-repeat analysis* (MLVA), *Multi-locus sequence typing* (MLST), e ainda mais recentemente, técnicas baseadas no sequenciamento do genoma completo, como *Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis*, *core genome MLST* (cgMLST) e *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) analysis* (MERINO et al., 2003; FONSECA et al., 2006; LINDQVIST & PELKONEN, 2007; NODA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; RANJBAR et al., 2016; CUNHA-NETO et al., 2018; ALBA et al., 2020).

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

Entre as metodologias consideradas como padrão-ouro para utilização em estudos epidemiológicos de sorovariedades de *Salmonella*, o PFGE se estabeleceu com sucesso como a técnica de tipagem molecular mais utilizada no mundo, e vem sendo utilizado no estudo de linhagens a *S. Infantis* ao longo de aproximadamente 25 anos (WEGENER & BAGGESEN, 1996; FONSECA et al., 2006; NODA et al., 2010; NÓGRÁDY et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; RAHMANI et al., 2013; OZDEMIR & ACAR, 2014; MASARIKOVA et al., 2016; FOLSTER et al., 2017; PAPADOPOULOS et al., 2017; REALPE-QUINTERO et al., 2018).

Esta técnica foi descrita inicialmente em 1984 para a análise do DNA cromossômico de células eucarióticas, tendo sido adaptada com grande sucesso e eficiência para estudos epidemiológicos de diversas espécies bacterianas (SCHWARTZ & CANTOR, 1984; TENOVER et al., 1995; MAGALHÃES et al., 2005). A metodologia se baseia na confecção de blocos (ou *plugs*) de agarose a partir de uma suspensão contendo células bacterianas. Estes blocos são tratados com detergentes enzimáticos capazes de promover a lise das células bacterianas e a liberação do DNA bacteriano, que é posteriormente clivado com uma enzima de restrição de corte raro, capaz de se ligar a poucos sítios de reconhecimento e gerar fragmentos superiores a 10 kb. Os fragmentos gerados são então levados para uma eletroforese horizontal em gel de agarose em equipamentos específicos, que são capazes de emitir correntes elétricas em múltiplas e alternadas direções por períodos curtos e pré-determinados de tempo, permitindo que grandes fragmentos de DNA sejam separados (TENOVER et al., 1995; MAGALHÃES et al., 2005; RIBOT et al., 2006). Os padrões de bandas gerados pela separação destes fragmentos podem ser visualizados nos géis de agarose e, após fotografados, podem ser analisados em *softwares* especializados para

comparar os padrões de bandas obtidos e determinar assim a similaridade entre diferentes linhagens (TENOVER et al., 1995; MAGALHÃES et al., 2005; RIBOT et al., 2006).

### 1.8.2. Sequenciamento de genoma completo

Nos últimos anos, os avanços obtidos em tecnologias de sequenciamento de genoma completo (*whole-genome sequencing*, WGS ou *new generation sequencing*, NGS) aliados a um maior acesso e barateamento de custos, vem promovendo uma revolução no estudo de diferentes patógenos através do rápido rastreamento e vigilância de rotas de infecção e surtos, desenvolvimento de novas metodologias de tipagem molecular e investigação de mecanismos de virulência e resistência a antimicrobianos (GILMOUR et al., 2013; ALLARD, 2016; TAGINI & GREUB, 2017).

O desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento pode ser dividido em três gerações. A primeira geração é notadamente marcada pela técnica criada por Frederik Sanger em 1977, baseada na terminação e fragmentação do DNA e análises em sistemas de eletroforese. O método de Sanger se tornou uma técnica padrão-ouro por quase 30 anos e revolucionou a biologia moderna, permitindo a descoberta e estudo de genes e de genomas inteiros (McGINN & GUT, 2013; VAN DIJK et al., 2014; HEATHER & CHAIN, 2016). Com o início Projeto Genoma Humano em 1990, ao passo que diversos progressos foram obtidos no desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento, foi exposta a necessidade de barateamento de custos e redução de tempo na realização de tais técnicas (McGINN & GUT, 2013; VAN DIJK et al., 2014). Deste modo, foram desenvolvidas as tecnologias de segunda e terceira gerações de sequenciamento, baseadas no sequenciamento de *high-throughputs* e de *reads* longas, respectivamente, e que possuem como principal vantagem a geração rápida de milhões de *reads* de tamanhos variados de pares de bases em corridas únicas (VAN DIJK et al., 2014; LOMAN & PALLEEN, 2015; HEATHER & CHAIN, 2016).

Entre as diversas plataformas disponíveis, os sequenciadores de segunda geração da Illumina, como o MiSeq®, NextSeq® e HiSeq®, são amplamente empregados no sequenciamento de genoma completo de genomas bacterianos devido à qualidade de suas performances. Nestas plataformas, que se baseiam no sequenciamento por síntese, o DNA das amostras é inicialmente fragmentado e adaptadores que funcionam como códigos de barras para identificar as diferentes amostras na corrida são implementados em tais fragmentos de DNA, que em seguida são amplificados por uma reação de PCR,

sequenciados e, após a obtenção dos dados gerados, são analisados em *softwares* específicos (METZKER, 2010; RAVI et al., 2018).

Ainda que sejam mais escassos que em relação a outras sorovariedades de *Salmonella*, estudos que utilizam técnicas de tipagem molecular baseadas no WGS já vem sendo empregados nos últimos anos na caracterização molecular de linhagens de *S. Infantis* (YOKOYAMA et al., 2014; YOKOYAMA et al., 2015; BROWN et al., 2018; GYMOESE et al., 2019; ACAR et al., 2019; MONTE et al., 2019; ALBA et al., 2020).

### **1.8.3. Análise de *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs)**

Dentre as abordagens disponíveis para a realização de análises filogenéticas através de sequências obtidas pelo WGS, a análise de polimorfismos únicos de nucleotídeo (*single-nucleotide polymorphisms*, SNPs) é a mais amplamente utilizada atualmente para a caracterização da diversidade e correlação genética entre linhagens bacterianas (FOLEY et al., 2009; JAGADEESAN et al. 2019). Especificamente, esta tem sido a metodologia mais utilizada em análises filogenéticas a partir do WGS para caracterizar linhagens de *S. Infantis* (YOKOYAMA et al., 2014; YOKOYAMA et al., 2015; BROWN et al., 2018; ACAR et al., 2019; ALBA et al., 2020)

Os SNPs são caracterizados como variações em nucleotídeos únicos que ocorrem em regiões codificantes e não-codificantes dentro dos genomas e estão presentes em níveis específicos dentre as diferentes populações. Estas variações podem ser denominadas de sinônimas, quando não alteram a sequência de aminoácidos codificadas por tais genes, ou de não-sinônimas, que resultam na codificação de um aminoácido diferente em decorrência da variação do nucleotídeo. Tendo em vista que as espécies bacterianas evoluem, divergindo geneticamente umas das outras através de diferentes formas, a análise de SNPs se baseia nestas mutações de nucleotídeos do genoma para diferenciar isolados bacterianos (FOLEY et al., 2009; RONHOLM et al., 2016; JAGADEESAN et al. 2019).

A análise de SNPs é realizada através de *softwares* específicos que realizam o alinhamento das *reads* de diferentes linhagens com um genoma de referência conhecido, sendo que este deve ser completamente sequenciado e deve possuir uma correlação genética estreita com as linhagens a serem analisadas, como por exemplo, de uma mesma sorovariedade de *Salmonella*. Após o alinhamento, os SNPs são anotados, quantificados e utilizados para determinar a correlação genética entre tais linhagens (JAGADEESAN et al. 2019). Tais análises utilizam por volta de 95% de todo o conteúdo do genoma, tendo em

vista que sequências de plasmídeos, profagos e elementos de inserção, que geralmente são adquiridos horizontalmente, são pouco confiáveis para a determinação da correlação epidemiológica entre isolados (JAGADEESAN et al. 2019).

#### **1.8.4. *Multilocus sequence typing (MLST)***

A técnica de MLST é uma das metodologias moleculares mais difundidas no mundo utilizada na tipagem de diferentes microrganismos, incluindo linhagens de *S. Infantis* (ACHTMAN et al., 2012; HAUSER et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; CHIRONNA et al., 2014; RANJBAR et al., 2018; GYMOESE et al., 2019; SODAGARI et al., 2019). Esta metodologia foi inicialmente proposta em 1998 por Maiden e colaboradores, visando o desenvolvimento de uma técnica que superasse os problemas de baixa reprodutibilidade inter-laboratorial enfrentados por outras metodologias (MAIDEN et al., 1998). Entre as principais vantagens do MLST, pode-se destacar a alta reprodutibilidade e a facilidade em disponibilizar e acessar informações relacionadas em bancos de dados disponíveis publicamente online, facilitando a comparação dos resultados obtidos com dados globais (MAIDEN et al., 1998; ACHTMAN et al., 2012). Em 2012, o MLST foi ainda proposto por Achtman e colaboradores como uma alternativa à sorotipagem tradicional para a classificação de isolados de *Salmonella enterica* em sorovariedades (ACHTMAN et al., 2012).

A metodologia se baseia na amplificação e sequenciamento de sete genes essenciais ou de manutenção que são altamente conservados dentre diferentes espécies de microrganismos, denominados genes *housekeeping*. Após o sequenciamento, as sequências obtidas para cada um dos genes, referidas como alelos, são depositadas em bancos de dados específicos onde são identificadas de acordo com as diferentes sequências de nucleotídeos e são atribuídas de um número específico. A combinação dos números dos alelos dos sete genes *housekeeping* resulta em um número único denominado *sequence type* (ST), que pode ser comparado com STs de diferentes localidades no mundo, permitindo assim a realização de análises filogenéticas, populacionais e evolucionárias de diferentes microrganismos (MAIDEN et al., 1998; ACHTMAN et al., 2012).

Para linhagens de *Salmonella enterica*, os genes *housekeeping* analisados no MLST são *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA*, enquanto o ST mais reportado mundialmente para linhagens da sorovariedade *Infantis* é o ST32 (ACHTMAN et al., 2012).

Com o maior acesso e barateamento de custos do sequenciamento de genoma completo, atualmente é possível realizar o MLST *in silico*, de maneira rápida e simples, através do *upload* de das sequências obtidas em ferramentas virtuais (LARSEN et al., 2012).

#### **1.8.5. *core genome* MLST (cgMLST)**

Seguindo a abordagem utilizada pela técnica de MLST mas visando aumentar seu poder discriminatório entre diferentes linhagens, a metodologia de *core genome* MLST (cgMLST) se baseia, diferentemente da análise de SNPs, numa abordagem denominada “gene-a-gene”, que permite verificar as variações presentes nas diferentes regiões codificantes dos genes (ou *loci*) presentes ao longo dos genomas bacterianos (RONHOLM et al., 2016; PÉREZ-LOSADA et al., 2018; JAGADEESAN et al., 2019).

As análises que utilizam a abordagem gene-a-gene se baseiam amplamente nos conceitos de pan-genoma (*pangenome*), genoma central (*core genome*) e genoma acessório (*accessory genome*). O pan-genoma se refere ao conjunto de todos genes que ocorrem dentro de um grupo de indivíduos geneticamente relacionadas entre si, como uma espécie ou sorovariedade, por exemplo. O genoma central compreende todos os genes que estão presentes obrigatoriamente em todos os indivíduos deste grupo. Por último, o genoma acessório corresponde aos genes que estão presentes exclusivamente em uma única linhagem ou uma parcela de linhagens deste grupo, não sendo comuns ao todo (RONHOLM et al., 2016).

Deste modo, na técnica de cgMSLT, as sequências de diferentes linhagens obtidas pelo WGS são analisadas em *softwares* específicos que detectam os genes que compõe o genoma central e analisam os SNPs presentes dentro destes genes, permitindo a comparação das linhagens entre si e a determinação de sua correlação genética (RONHOLM et al., 2016; PÉREZ-LOSADA et al., 2018; JAGADEESAN et al., 2019).

Ainda que seja menos utilizada em relação a análise de SNPs em estudos baseados na tipagem molecular pelo WGS, a técnica de cgMLST também vem sendo utilizada na caracterização de linhagens de *Salmonella*, incluindo *S. Infantis* (GYMOESE et al., 2019; ALBA et al., 2020).

#### **1.8.6. Análise de *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)**

Ao longo de sua evolução, os microrganismos desenvolveram diversos mecanismos de defesa visando sobreviver às constantes exposições a moléculas de DNA exógeno,



promovidas pela transdução, conjugação e transformação por diferentes tipos de elementos genéticos móveis (EGMs) (HORVATH & BARRANGOU, 2010). Um destes mecanismos, o sistema de *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), é descrito como uma espécie de “sistema imune” bacteriano, que visa promover uma resposta adquirida a moléculas de DNA exógeno provenientes principalmente de vírus bacteriófagos através da integração de fragmentos de DNA a regiões específicas de seu genoma (HORVATH & BARRANGOU, 2010; TOUCHON & ROCHA, 2010; SOREK et al., 2013).

O sistema CRISPR é encontrado em mais de 40% dos genomas bacterianos e 90% dos genomas de arqueas, e sua estrutura é formada tipicamente por uma série de sequências repetidas e altamente conservadas de 20 a 50pb, denominadas repetições diretas, que são intercaladas por sequências altamente variáveis e de tamanhos similares às repetições diretas, denominadas de espaçadores (HORVATH & BARRANGOU, 2010; TOUCHON & ROCHA, 2010; SOREK et al., 2013). As sequências de espaçadores são em sua maioria adquiridas de bacteriófagos e, em menor quantidade, de plasmídeos, e podem proteger os microrganismos frente à futuras exposições a tais moléculas de ácidos nucleicos (LIU et al., 2011).

As espécies microbianas podem apresentar diferentes números de *loci* CRISPR em seu genoma, que variam em sua extensão devido a quantidade de espaçadores que neles estão contidos (HORVATH & BARRANGOU, 2010; SOREK et al., 2013). Tais espaçadores ainda podem se apresentar em uma ampla diversidade e variabilidade genética mesmo entre linhagens geneticamente correlacionadas, característica essa que permitiu o desenvolvimento de análises filogenéticas baseadas na presença ou ausência dos espaçadores para finalidades epidemiológicas e de tipagem molecular entre diversos microrganismos (HORVATH & BARRANGOU, 2010; LIU et al., 2011). Ademais, com os avanços obtidos através do WGS, atualmente existem ferramentas online capazes de localizar e identificar rapidamente os espaçadores e repetições diretas *in silico* em linhagens sequenciadas (COUVIN et al., 2018).

Dentre as sorovariedades de *Salmonella*, dois *loci* CRISPR são comumente detectados, nomeados rotineiramente de CRISPR1 e CRISPR2 (LIU et al., 2011). Com o auxílio do WGS, a análise de CRISPR permitiu que diversas sorovariedades tenham sido tipadas molecularmente com sucesso por esta técnica (SHARIAT et al., 2013; DENG et al., 2015; ALMEIDA et al., 2017; VILELA et al., 2020b).

### 1.9. Relevância do presente estudo

Ainda que as infecções causadas por sorovariedades de *Salmonella* possuam ampla importância clínica e econômica nos âmbitos de saúde pública e segurança alimentar e que linhagens de *S. Infantis* estejam entre as sorovariedades de *Salmonella* mais isoladas no Brasil e no mundo, poucos estudos foram conduzidos no país visando caracterizar um expressivo número de linhagens exclusivamente desta sorovariedade isoladas de fontes clínicas e não-clínicas (PESSOA-SILVA et al, 2002; FONSECA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013).

A maioria dos trabalhos conduzidos no país não compreenderam de forma exclusiva o estudo de linhagens da sorovariedade *Infantis* e geralmente se limitaram a reportar apenas suas taxas de isolamento e perfil de resistência a antimicrobianos (MORAES et al., 2000; CASTRO et al., 2002; PESSOA-SILVA et al, 2002; FONSECA et al., 2006; MEDEIROS et al., 2011; ROWLANDS et al., 2014; CUNHA-NETO et al., 2018). Ainda, poucos trabalhos realizados no Brasil até hoje utilizaram técnicas de tipagem molecular para caracterizar especificamente linhagens de *S. Infantis* (FONSECA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013; CUNHA-NETO et al., 2018), sendo ainda mais raros trabalhos que utilizaram WGS (MONTE et al., 2019).

No estudo de Almeida e colaboradores (2013), foram estudadas 25 linhagens de *S. Infantis* isoladas de humanos e 10 de alimentos entre 1984 e 2009 em diversas cidades do estado de São Paulo, sendo o primeiro estudo a utilizar técnicas de tipagem molecular como ERIC-PCR e MLST para caracterizar linhagens de *S. Infantis* no país (ALMEIDA et al., 2013). No trabalho de Fonseca e colaboradores (2006), 35 linhagens desta sorovariedade foram isoladas de recém-nascidos em quatro hospitais públicos do Rio de Janeiro entre 1996 e 2001 e foram caracterizadas pela técnica de PFGE (FONSECA et al., 2006). Já no estudo de Cunha-Neto e colaboradores (2018), 11 linhagens de *S. Infantis* isoladas de animais entre 2014 e 2015 foram estudadas, sendo que apenas uma linhagem foi tipada por rep-PCR em comparação a linhagens de outras sorovariedades (CUNHA-NETO et al., 2018). No estudo de Monte e colaboradores (2019), três linhagens de *S. Infantis* isoladas de carne suína em São Paulo em 2015 e uma linhagem isolada de caixa de frangos em 2016 em Santa Catarina foram sequenciadas e avaliadas quanto a presença de genes de resistência a antimicrobianos, genes de virulência e analisadas através do MLST através de dados obtidos por WGS (MONTE et al., 2019)

Deste modo, estudos conduzidos com um número expressivo de linhagens de *S. Infantis* isoladas de diferentes localidades, fontes e anos mais recentes no Brasil são necessários para caracterizar aspectos específicos das linhagens circulantes desta sorovariedade no país quanto a seus perfis de resistência a antimicrobianos, seu potencial patogênico e epidemiologia molecular através de técnicas de tipagem molecular clássicas, como o PFGE, e mais modernas, como análises baseadas no WGS, visando proporcionar um melhor entendimento de linhagens desta sorovariedade isoladas no Brasil.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Caracterizar a diversidade genotípica, verificar a presença de marcadores de virulência e os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella* Infantis isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente no Brasil.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar o perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens de *S. Infantis* de origens diversas através do método de disco-difusão;
- Verificar a diversidade genotípica de linhagens de *S. Infantis* isoladas de fontes clínicas e não-clínicas por PFGE;
- Realizar o sequenciamento do genoma completo das linhagens de *S. Infantis* de origens diversas isoladas no país;
- Investigar o potencial patogênico das linhagens de *S. Infantis* pela pesquisa dos genes de virulência *invA*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *sipA*, *sipD*, *flgK*, *flgL*, *fljB*, *sifA*, *ssaR* e *spvB* utilizando os dados do sequenciamento do genoma completo;
- Verificar a presença de genes de resistência a antimicrobianos nas linhagens de *S. Infantis* utilizando os dados obtidos pelo sequenciamento do genoma completo;
- Tipar molecularmente linhagens de *S. Infantis* pelas análises de MLST, SNPs, CRISPR e cgMLST utilizando os dados do WGS.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens Bacterianas

Foram estudadas 80 linhagens de *Salmonella* Infantis, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil (Tabela 2).

As linhagens são provenientes da coleção do Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (LABENT/IOC/FIOCRUZ) do Rio de Janeiro-RJ e foram isoladas a partir de material proveniente das regiões Sul (Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná), Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul e Goiás) e Nordeste (Alagoas e Maranhão).

Em relação as linhagens isoladas de humanos, por serem amostras de coleção e pela Fundação Oswaldo Cruz receber somente o material clínico para a análise e não ter contato direto com os pacientes em cujas amostras foram isoladas as linhagens de *S. Infantis*, o estudo foi encaminhado para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP-USP e obteve a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos pacientes para o uso das amostras (Protocolo CEP/FCFRP n° 134).

A Tabela 2 traz em detalhes os dados relativos ao ano, local, fonte e material de isolamento das 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas.

**Tabela 2** - Ano, estado, material e fontes de isolamento das 80 linhagens de *Salmonella* Infantis estudadas.

Amostra	Ano	Estado	Material de Isolamento	Fonte
1348	2013	PR	Fezes	Humano
2385	2013	PR	Soja	Alimento
2950	2013	AL	Fezes	Humano
2951	2013	AL	Fezes	Humano
3156	2013	SC	Propé	Ambiente
5025	2013	SC	Fezes	Humano
124	2014	RS	Fezes de suíno	Animal
210	2014	SC	Swab de arrasto	Ambiente
212	2014	SC	Swab de arrasto	Ambiente
388	2014	SP	Farelo de soja	Ração animal
583	2014	SC	Carcaça de frango	Alimento
584	2014	SC	Massa contendo presunto	Alimento
677	2014	SC	Chiffonette de carcaça	Alimento
723	2014	SC	Swab de arrasto	Ambiente

Continua

<b>Amostra</b>	<b>Ano</b>	<b>Estado</b>	<b>Material de Isolamento</b>	<b>Fonte</b>
982	2014	RS	Fezes de frango	Animal
1143	2014	RS	Fezes de frango	Animal
1284	2014	SC	<i>Swab</i> de arrasto	Ambiente
1380	2014	RS	Fezes de frango	Animal
1408	2014	RS	Fezes	Humano
1409	2014	RS	Fezes	Humano
1441	2014	RS	Maionese	Alimento
1711	2014	RS	Fezes de frango	Animal
2378	2014	SC	<i>Swab</i> de caminhão	Ambiente
2430	2014	SC	Linguiça mista	Alimento
2461	2014	SC	Carcaça de frango	Alimento
2463	2014	SC	Carcaça de frango	Alimento
2548	2014	RS	Fezes de frango	Animal
3836	2014	RS	<i>Swab</i> de arrasto	Ambiente
4882	2014	MG	Carcaça de frango	Alimento
4892	2014	MG	Asa de frango	Alimento
4895	2014	MG	Carcaça de frango	Alimento
4901	2014	MG	Focinho suíno	Alimento
5247	2014	MG	Coxa e sobrecoxa de frango	Alimento
342	2015	SC	Coração suíno	Alimento
444	2015	SC	Filé suíno	Alimento
447	2015	SC	Copa suína	Alimento
1809	2015	SC	Farinha de carne	Ração animal
1816	2015	SC	Farinha de vísceras	Ração animal
2280	2015	SC	Carcaça de frango	Alimento
2302	2015	SC	<i>Chiffonette</i>	Ambiente
2370	2015	SC	<i>Chiffonette</i> de carcaça	Alimento
2869	2015	MG	Sobrecoxa de frango	Alimento
3056	2015	MG	Carcaça de frango	Alimento
4764	2015	SC	<i>Chiffonette</i>	Ambiente
5391	2015	SC	Propé	Ambiente
5837	2015	SC	Propé	Ambiente
5853	2015	SC	Propé	Ambiente
5859	2015	SC	Propé	Ambiente
5911	2015	SC	<i>Chiffonette</i>	Ambiente
5912	2015	SC	<i>Chiffonette</i>	Ambiente
5915	2015	SC	<i>Chiffonette</i>	Ambiente
5923	2015	SC	<i>Chiffonette</i>	Ambiente
220	2016	SC	<i>Chiffonette</i>	Ambiente

Continua

Amostra	Ano	Estado	Material de Isolamento	Fonte
3687	2016	SC	Carcaça de frango	Alimento
4447	2016	SC	Linguiça suína	Alimento
5946	2016	SC	Costelinha Suína	Alimento
6987	2016	MA	Fezes	Humano
7876	2016	RS	Fezes	Humano
11	2017	PR	Swab de arrasto	Ambiente
23	2017	PR	Swab de arrasto	Ambiente
238	2017	PR	Swab de arrasto	Ambiente
872	2017	MG	Carcaça de frango	Alimento
1171	2017	SP	Solo	Ambiente
1256	2017	SP	Solo	Ambiente
2580	2017	SC	Fezes	Humano
2953	2017	GO	Swab fecal	Humano
2954	2017	GO	Swab fecal	Humano
3380	2017	GO	Swab fecal	Humano
3877	2017	MG	Asa de frango	Alimento
3906	2017	SP	Resíduo de peneira	Ambiente
4065	2017	PR	Fezes	Humano
4067	2017	PR	Fezes	Humano
4069	2017	PR	Sangue	Humano
52	2018	MG	Carcaça de frango	Alimento
331	2018	GO	Swab fecal	Humano
623	2018	SC	Fezes	Humano
661	2018	MS	Fezes	Humano
942	2018	RS	Swab fecal	Humano
1634	2018	SC	Carne de peixe olhete	Alimento
2676	2018	GO	Matriz avícola de reprodução	Animal

SP, São Paulo; MG, Minas Gerais, SC, Santa Catarina; RS, Rio Grande do Sul; PR, Paraná; AL, Alagoas; MA, Maranhão; MS, Mato Grosso do Sul; GO, Goiás.

*Chiffonette*: material similar a um tecido de limpeza sintético, utilizado na indústria alimentícia e granjas para coleta de material para cultura microbiana.

### 3.2. Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens

A determinação da sorovariedade das 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 1) foi realizada pela técnica de sorotipagem, que é realizada como procedimento padrão de rotina para os isolados de *Salmonella enterica* recebidos ou isolados pelo LABENT/IOC/FIOCRUZ/RJ.

As linhagens, que foram recebidas em um meio de transporte e armazenamento, foram inicialmente inoculadas em 5ml de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Kasvi) e

incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas. Após esse período, as linhagens foram cultivadas em placas de ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (Kasvi) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas para posterior observação da fermentação ou não de lactose e produção ou não de H<sub>2</sub>S. Após esse período, as colônias características de *Salmonella* spp. foram inoculadas em tubos de ágar *Triple Sugar Iron* (TSI) (Kasvi) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas para posterior observação da fermentação ou não de lactose, sacarose e glicose, e produção ou não de H<sub>2</sub>S e gás.

Após a reconfirmação, as linhagens foram novamente inoculadas em 3ml de caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas. Após a incubação, 1.430µl do crescimento bacteriano foram acrescidos de 570µl de glicerol 70%, transferidos para criotubos e armazenados a -80°C para preservação das amostras até a realização dos experimentos subsequentes.

### **3.3. Extração e verificação da pureza e integridade do DNA genômico**

O DNA genômico das 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) foi extraído segundo o protocolo descrito por CAMPIONI & FALCÃO (2014) para realização do sequenciamento do genoma completo.

As linhagens foram inicialmente cultivadas em 4ml de caldo BHI (Kasvi) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas. Em seguida, o cultivo foi centrifugado a 14.000rpm por 3 minutos (centrífuga 5810 R da marca Eppendorf) e o sedimento obtido foi suspenso em 250µl da solução I (20% de sacarose, 50mM Tris-HCl pH 8.0 e 50mM de EDTA) a 4°C. Após incubação de 10 minutos em gelo, a suspensão foi acrescida de 500µl da solução II (50mM de NaCl, 1% de Sarcosil e 0,05 mg/ml de proteinase K) e foi incubada em banho de água a 37°C por 2 horas. Após este período, foram adicionados às suspensões 750µl de uma mistura de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (proporção 25:24:1), e foram novamente centrifugadas a 14.000rpm por 10 minutos (centrífuga 5810 R da marca Eppendorf). O sobrenadante obtido das suspensões foi coletado, transferido para um novo tubo, foi acrescido de 750µl de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (proporção 24:1), e foi novamente centrifugado a 14.000rpm por 10 minutos (centrífuga 5810 R da marca Eppendorf). O sobrenadante obtido foi novamente coletado e transferido para um novo tubo, onde foi acrescido de 1ml de etanol a 4°C e incubado em gelo por 15 minutos para precipitação do DNA genômico. Em seguida, o DNA genômico foi sedimentado por centrifugação a 14.000rpm por 15 minutos (centrífuga



5810 R da marca Eppendorf), teve seu sobrenadante cuidadosamente descartado e foi levado para secagem do sedimento em um aparelho do tipo *Speed Vac Concentrator* (modelo 5301 da marca Eppendorf). Após a secagem, o sedimento foi suspenso em 400µl de água destilada ultrapura e livre de DNase e RNase (Thermo Fisher Scientific), onde foram adicionados 2µl de RNase 50mg/ml, e esta suspensão foi incubada em banho de água a 37°C por 1 hora.

A integridade do DNA genômico extraído foi verificada por eletroforese vertical, onde 3µl do DNA genômico foram adicionados a 2µl de solução de azul de bromofenol (40% sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) e aplicados em um gel de agarose 1,0% preparado com o tampão Tris Acetato EDTA (TAE) 1X. A corrida foi conduzida a 80 Volts por 1 hora e 30 minutos e, depois de finalizada, os géis foram corados em uma solução de brometo de etídeo (Thermo Fisher Scientific) 0,5µg/ml por 20 minutos, foram observados em um transluminador ultravioleta *Gel Doc XR* (Bio-Rad) e fotografados utilizando o *software Quantity One 4.6.1* (Bio-Rad).

A verificação da pureza e determinação da concentração do DNA genômico extraído foram realizadas utilizando um espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific). Foram consideradas como boas as extrações com pureza  $\geq 1,6$  e  $\leq 1,9$  nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260nm e 280nm, valores que sugerem um teor baixo de impurezas na amostra (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

### **3.4. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos**

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado para as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) de acordo com as normas para a técnica de disco-difusão, seleção dos antimicrobianos e a interpretação dos resultados estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015; 2019).

As linhagens foram inicialmente cultivadas em 3ml de caldo BHI (Kasvi) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas. Posteriormente, os cultivos foram semeados em placas de ágar Müeller-Hinton (MH) (Oxoid) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas. Em seguida, com o auxílio de um *swab*, algumas colônias foram selecionadas e suspensas em uma solução salina NaCl 0,8% até que visualmente fosse atingida a escala 0,5 de MacFarland, e com o auxílio de um novo *swab*, estas soluções foram semeadas em placas de Petri de dimensões 20x150mm contendo ágar MH (Oxoid). Após isto, os discos de antimicrobianos (Oxoid) foram posicionados na

superfície do ágar com o auxílio de uma pinça estéril e as placas foram novamente incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas para posterior leitura dos halos de inibição formados. Os antimicrobianos testados foram amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), piperacilina (10µg), amicacina (30µg), ampicilina (10µg), gentamicina (30µg), imipenem (10µg), trimethoprim-sulfametoxazol (25µg), tetraciclina (30µg), ácido nalidíxico (30µg), ciprofloxacina (5µg), estreptomicina (10µg), cloranfenicol (30µg), cefazolina (30µg), cefoxitina (30µg), ceftriaxona (30µg), cefotaxime (30µg), ceftazidime (30µg) e cefepime (30µg).

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

#### **3.5.1. Preparo, lise e digestão dos plugs de agarose**

A técnica de PFGE foi realizada para as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) de acordo com o protocolo do *PulseNet* para *Salmonella* (RIBOT et al., 2006).

Inicialmente, as linhagens foram cultivadas em 3ml de caldo BHI (Kasvi) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas. Em seguida, os cultivos foram semeados em placas de ágar triptona de soja (TSA) e novamente incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas. Após o crescimento, com o auxílio de um *swab*, algumas colônias foram selecionadas, suspensas em um tampão de suspensão de células (100mM Tris, pH 8,0; 100mM EDTA, pH 8,0) até que fosse atingida uma densidade ótica (D.O.) (610nm) entre 0,8 e 1,0. Desta suspensão, 200µl foram transferidos para um novo tubo plástico de 2,0ml, que foram incubados em gelo para cessar o crescimento bacteriano até a etapa seguinte, onde foram incubados em banho-seco a 60°C e tiveram adicionados 10µl de proteinase K (20mg/ml) e 200µl de agarose fundida 1% do tipo *Seaken Gold* (Lonza). Desta mistura, aproximadamente 80µl foram distribuídos em moldes dos *plugs* a serem confeccionados e levados por cerca de 5 minutos em geladeira até atingirem sua solidificação.

Após solidificados, os *plugs* foram transferidos para tubos de 15mL (Falcon) contendo 5ml de um tampão de lise celular (50mM Tris, pH 8,0; 50mM EDTA, pH 8,0 e 1% de Sarcosil) e 25µl de proteinase K (20mg/ml), foram incubados em banho de água a 54°C por 2 horas e depois agitados vigorosamente por 30 minutos. Em seguida, o tampão foi removido e foram realizadas duas lavagens com água MilliQ e quatro lavagens com o tampão de lavagem TE (10mM Tris, pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0), ambos pré-aquecidos a

54°C, por 30 minutos e sob leve agitação. Após as lavagens, os *plugs* foram armazenados em tubos contendo 1ml do tampão TE, em geladeira, até sua digestão.

A digestão dos *plugs* foi feita separando um *plug* em um tubo de 2ml e realizando três lavagens com 1ml do tampão TE pré-aquecido a 54°C por 15 minutos sob leve agitação. Posteriormente, o tampão TE foi removido e foi realizada uma lavagem com 300µl do tampão comercial da enzima *XbaI* (Thermo Fisher Scientific) em temperatura ambiente, por 30 minutos sob leve agitação. O DNA genômico contido nos *plugs* foi depois digerido com um tampão contendo 40 unidades da enzima *XbaI* (Thermo Fisher Scientific) em banho de água a 37°C por 2 horas.

### 3.5.2. Condições da eletroforese em campo pulsado

Para realização da eletroforese em campo pulsado, foram preparados 2,5l de tampão de corrida TBE 0.5X (45mM Tris; 45mM ácido bórico e 1mM EDTA, pH 8,0), sendo que 150ml foram utilizados para preparo do gel com agarose tipo *Seaken Gold* (Lonza) a 1% e o restante foi adicionado na cuba de eletroforese onde foi realizada a corrida até que atingisse a temperatura de 14°C. Após o preparo do gel, foram separados 2ml da agarose fundida em um tubo, que foi armazenado em banho-seco a 60°C, para realizar o posterior selamento dos *plugs* no gel. Em três poços do gel de agarose foram adicionados *plugs* do marcador de peso molecular *Lambda Ladder PFG Marker* (New England BioLabs), de 50 a 1000kb.

Após a transferência dos *plugs* para o gel e seu selamento, o gel foi posicionado na cuba de eletroforese em campo pulsado do modelo *CHEF-DR III* (Bio-Rad), onde este foi submetido à corrida em um programa de um bloco sob as seguintes condições: tempo total de corrida de 19 horas, voltagem de 6V/cm, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e pulso inicial de 2,2 segundos e final de 63,6 segundos (RIBOT et al., 2006).

Após a corrida, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo (Thermo Fisher Scientific) 0,5mg/ml por 30 minutos, foi descorado em água MilliQ por 90 minutos, observado em um transluminador ultravioleta *Gel Doc XR* (Bio-Rad) e fotografados utilizando o *software* Quantity One 4.6.1 (Bio-Rad).

### 3.5.3. Análise dos dados gerados

A análise do padrão de bandas gerado através da eletroforese em campo pulsado foi realizada utilizando o *software* *Bionumerics 7.6* (Biomérieux). Apenas bandas acima de 48,5kb foram incluídas na análise. O marcador de peso molecular *Lambda Ladder PFG*

*Marker* (New England BioLabs) utilizado na corrida do gel foi empregado para normalizar as imagens e permitir a comparação entre os géis obtidos na análise. Os dendrogramas de similaridade genotípica foram gerados pelo algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), utilizando o coeficiente de similaridade Dice e tolerância de 1,5.

### **3.6. Sequenciamento do genoma completo**

O sequenciamento do genoma completo (*whole-genome sequencing*, WGS) foi realizado para as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) pelo *Kentucky Division of Lab Services, Centralized Lab Facility*, na cidade de Frankfort, Kentucky, Estados Unidos, em colaboração com o *Center for Food Safety and Applied Nutrition* (CFSAN) do *Food and Drug Administration* (FDA), na cidade de College Park, Maryland, Estados Unidos.

As linhagens foram sequenciadas na plataforma de sequenciamento MiSeq<sup>®</sup>500 (Illumina) a partir do DNA genômico extraído conforme descrito no item 3.3, cuja pureza e concentração foram verificadas em um espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific) e em um fluorômetro *Qubit<sup>®</sup>* (Thermo Fisher Scientific), respectivamente.

#### **3.6.1. Diluição do DNA**

Após a quantificação, o DNA das linhagens foi diluído com água destilada ultrapura e livre de DNase e RNase (Thermo Fisher Scientific) para atingir a concentração de 0,2ng/μl. Desta solução, foram utilizados 5μl, correspondentes a 1ng do DNA genômico, que representa a quantidade necessária para realização do WGS de cada linhagem.

As etapas de fragmentação do DNA genômico e preparo das bibliotecas para o sequenciamento foram realizadas utilizando os reagentes e o protocolo do *Nextera XT Sample Prep Kit* (Illumina), enquanto a mistura das bibliotecas e sequenciamento foram realizados utilizando os reagentes e o protocolo do *MiSeq Reagent Kit v3 (2 X 150-bp paired-end)* (Illumina).

#### **3.6.2. Fragmentação do DNA**

Em cada poço de uma placa de 96 poços foram adicionados 5μl do DNA genômico diluído (0,2ng/μl) de cada uma das linhagens, 10μl do *tagment DNA buffer* e 5μl do *amplicon tagment mix*. Esta mistura foi homogeneizada e a placa foi selada com um adesivo tipo *Microseal B* e centrifugada por 1 minuto a 400rpm e 20°C. Após a centrifugação, a

placa foi incubada em um termociclador a 55°C por 5 minutos e mantida a 10°C. Posteriormente, foram adicionados 5µl do *neutralize tagment buffer* em cada um dos poços e a mistura foi novamente homogeneizada. A placa foi mais uma vez selada com o adesivo *Microseal B*, foi centrifugada por 1 minuto a 400rpm e 20°C, e mantida em temperatura ambiente por 5 minutos.

### 3.6.3. Amplificação das bibliotecas

Em cada um dos poços da placa foram adicionados 5µl do adaptador *index 1* (i17), 5µl do adaptador *index 2* (i5) e 15µl do *Nextera PCR master mix*. As misturas nos poços foram homogeneizadas e a placa foi selada com adesivo o *Microseal B*, sendo em seguida centrifugada por 1 minuto a 400rpm e 20°C. Após a centrifugação, a placa foi levada para amplificação em um termociclador sob as seguintes condições: 3 minutos a 72°C; 30 segundos a 95°C; 12 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C; seguidos de uma etapa de extensão final por 5 minutos a 72°C e sendo mantida ao final a 10°C.

### 3.6.4. Purificação das bibliotecas

Após a amplificação, a placa foi centrifugada por 1 minuto a 400rpm e 20°C, e uma alíquota de 50µl da mistura de cada poço foi transferida para uma nova placa. Em cada um dos poços foram adicionados 30µl do *AMPure XP beads* e, em seguida, a placa foi selada, colocada sob agitação por 2 minutos a 1800rpm e centrifugada por 1 minuto a 400rpm a 20°C. Ao fim da centrifugação, a placa foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos e foi colocada em uma estante magnética até que o sobrenadante das misturas se tornasse límpido, que foi descartado na sequência. Posteriormente, foram realizadas 2 lavagens compostas da adição de 200µl de etanol 80% em cada poço e do descarte do sobrenadante formado. Após esta etapa, a placa foi mantida por 15 minutos na estante magnética para a secagem completa do etanol e logo depois foram adicionados 52,5µl do *resuspension buffer* em cada poço. A placa foi novamente selada, colocada sob agitação por 2 minutos a 1800rpm, centrifugada por 1 minuto a 400rpm e 20°C, e mantida em temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, a placa foi novamente colocada na estante magnética até que o sobrenadante se tornasse límpido, de onde foram retiradas alíquotas de 50µl deste sobrenadante.

### 3.6.5. Normalização das bibliotecas

Em uma nova placa contendo 20µl de cada sobrenadante obtido, foram adicionados 52µl em cada poço de uma mistura composta de 46µl da solução de *library normalization additives 1* e 8µl da solução de *library normalization beads 1*. As misturas dos poços foram logo após homogeneizadas e a placa foi selada e colocada sob agitação por 30 minutos a 1800rpm. Em seguida, a placa foi colocada sob a estante magnética por 2 minutos e teve o sobrenadante obtido descartado. Após a placa ser retirada da estante magnética, foram realizadas duas lavagens compostas pelas seguintes etapas: adição de 45µl da solução *library normalization wash 1* em cada um dos poços da placa, selagem e agitação por 30 minutos a 1800rpm, colocação sob estante magnética por 2 minutos e descarte do sobrenadante obtido. Logo depois destas etapas, a placa foi removida da estante magnética e 30µl de NaOH 0,1N foram adicionados em cada um dos poços. A placa foi então selada, colocada sob agitação por 5 minutos a 1800rpm e colocada sob a estante magnética por 2 minutos. Foram retiradas alíquotas de 30µl do sobrenadante de cada poço, que foram transferidas para uma nova placa e tiveram 30µl do *library normalization storage buffer 1*. A placa foi selada e centrifugada por 1 minuto a 1400rpm.

### 3.6.6. Mistura das bibliotecas

Antes de prosseguir às bibliotecas, o *Reagent cartridge*, o cartucho que contém os reagentes necessários para a realização do sequenciamento e que é armazenado a -20 °C, foi colocado em um banho contendo água destilada em temperatura ambiente até que os poços contendo os reagentes líquidos estivessem descongelados. Após o descongelamento, o cartucho foi seco e visualmente inspecionado para verificar quaisquer alterações.

Em um tubo plástico de fundo cônico de 2ml, foi criado um *pool* contendo 5µl de cada uma das bibliotecas obtidas ao final do item 3.6.5, contendo assim as bibliotecas de cada uma das linhagens estudadas no mesmo *pool*. Após ser homogeneizado, uma alíquota de 24µl do *pool* de amostras foi transferida para um novo tubo de fundo cônico de 2ml, onde foram adicionados 576µl do *hibridization buffer* HT1 em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo foi levado a um agitador tipo vortex a 400rpm por 1 minuto, incubado em banho-seco a 96°C por dois minutos e depois incubado em gelo por 5 minutos.

Por último, 600µl deste *pool* foram adicionados no cartucho, que foi levado para a realização do sequenciamento no sequenciador MiSeq® (Illumina).

### 3.6.7. Análise dos dados gerados

Os *assemblies* gerados a partir das *reads* obtidas pelo sequenciamento das linhagens foram obtidos pelo *software* SKESA 2.2 (SOUVOROV et al., 2018) e a anotação dos *contigs* foi realizada pela ferramenta *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) (KLIMKE et al., 2009).

Os *assemblies* obtidos foram utilizados na pesquisa de genes de virulência e de genes de resistência a antimicrobianos e nas análises de SNPs, MLST, cgMLST e CRISPR. O genoma completo fechado da linhagem de referência de *S. Infantis* SINFA (número de acesso LN649235.1), isolada de frango no Reino Unido em 1973, foi obtido através da plataforma GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e foi utilizado como referência na análise de SNPs e incluído com a finalidade de comparação nas análises de cgMLST e CRISPR.

### 3.7. Pesquisa de genes de virulência

A pesquisa dos genes de virulência *invA*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *sipA*, *sipD*, *flgK*, *flgL*, *fljB*, *sifA*, *ssaR* e *spvB* foi realizada para as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) através dos *assemblies* gerados pelo WGS, utilizando a ferramenta online *MyDbFinder* 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MyDbFinder/>).

Inicialmente, foi criado um banco de dados personalizado com *software* Bloco de Notas (Microsoft) na extensão *.txt*, contendo as sequências de nucleotídeos dos 12 genes a serem pesquisados. Para isto, na primeira linha do arquivo foi adicionada a identificação da sequência (>Seq1\_nomegene1) e na segunda linha a sequência do respectivo gene, repetindo este processo a cada linha para adicionar os demais genes. As sequências de nucleotídeos dos 12 genes de virulência pesquisados foram obtidas no genoma de referência da linhagem de *Salmonella* Typhimurium str. LT2 (número de acesso NC\_003197.2) disponível no *GenBank*.

Cada um dos *assemblies* das linhagens de *S. Infantis* foi individualmente submetido na plataforma junto do banco de dados criado para realizar a pesquisa dos 12 genes selecionados, utilizando como parâmetros mínimos para a confirmação da presença de um gene uma similaridade de 95% e cobertura de 80%.

### 3.8. Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos

A pesquisa de genes de resistência à antimicrobianos foi realizada para as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) estudadas através dos *assemblies* gerados pelo WGS utilizando a ferramenta online *ResFinder* 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (BORTOLAIA et al., 2020).

Cada um dos *assemblies* das linhagens de *S. Infantis* foi individualmente submetido na plataforma, onde foram pesquisados quanto a presença de genes adquiridos de resistência de 15 classes de agentes antimicrobianos (Aminoglicosídeos;  $\beta$ -lactâmicos; Colistina; Fluoroquinolonas; Fosfomicina; Ácido fusídico; Glicopeptídeos; MLS – Macrolídeos, Lincosamida e Estreptogramina; Nitroimidazol; Oxazolidinona; Fenicóis; Rifampicina; Sulfonamida; Tetraciclina e Trimetoprim) e genes adquiridos de resistência à desinfetantes. Foram também pesquisadas mutações nos genes cromossômicos *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, capazes de conferir resistência a quinolonas e fluoroquinolonas; nos genes *pmrA* e *pmrB*, capazes de conferir resistência a peptídeos antimicrobianos; e no gene *16S\_rrsD*, capaz de conferir resistência a espectinomicina.

Para realização da pesquisa dos genes e mutações, foi utilizado o filtro específico para o gênero *Salmonella* spp. e foram selecionados como parâmetros mínimos uma similaridade de 95% e cobertura de 80% para a confirmação da presença destes genes.

### 3.9. Análises genômicas pelo sequenciamento do genoma completo

#### 3.9.1. Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis

A análise de SNPs foi realizada para as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) através dos *assemblies* gerados pelo WGS utilizando a ferramenta online *CSI Phylogeny* 1.4 (*Call SNPs & Infer Phylogeny*) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>) (KAAS et al., 2014).

Inicialmente, todos os *assemblies* foram submetidos simultaneamente na plataforma para a análise, assim como a linhagem LN649235 no campo específico para o genoma a ser utilizado como referência. Foram selecionados os seguintes parâmetros para a pesquisa de SNPs: qualidade de mapeamento das *reads* de 25, cobertura mínima da posição dos SNPs de 10 *reads*, cobertura relativa mínima da posição dos SNPs de 10%, qualidade dos SNPs de 30, distância mínima entre SNPs de 10pb e *Z-score* mínimo de 1,96.

Após a submissão dos *assemblies* para análise, o *CSI Phylogeny* 1.4 realiza o mapeamento das *reads* pelo software *Burrows-Wheeler Alignment* (BWA) v.0.7.2, a



cobertura das regiões mapeadas pela ferramenta *genomeCoverageBed* do software *BEDTools* v.2.16.2 e a identificação dos SNPs pela ferramenta *mpileup* do software *SAMTools* v.0.1.18 (KAAS et al., 2014).

Ao final da análise, foi obtido um dendrograma de similaridade genotípica na extensão *.newick*, que foi visualizado e salvo utilizando o software *FigTree* v. 1.4.2 (Rambaut Research Group, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh).

### 3.9.2. Multilocus sequence typing (MLST)

A metodologia de MLST foi realizada para as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) através dos *assemblies* gerados pelo WGS, utilizando a ferramenta online *MLST 2.0* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) (LARSEN et al., 2012).

Individualmente, um a um dos *assemblies* das linhagens de *S. Infantis* foram submetidos na plataforma, onde foi selecionada a configuração do MLST para *Salmonella enterica*, baseada na pesquisa dos sete genes *housekeeping* *aroC*, *dnaN*, *hemC*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA* (ACHTMAN et al., 2012).

Com a finalidade de comparar os STs das linhagens estudadas com dados globais, foi construído um diagrama através do software *PHYLOViZ* (RIBEIRO-GONÇALVES et al., 2016) utilizando os STs e respectivos números dos alelos dos sete genes *housekeeping* de linhagens da sorovariedade *Infantis* disponíveis para acesso público na plataforma *Enterobase* (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>).

### 3.9.3. core genome MLST (cgMLST)

A análise de cgMLST foi realizada para as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 1) através dos *assemblies* gerados pelo WGS, utilizando a plataforma online *PGAdb-builder* (LIU et al., 2016).

Inicialmente, todos os *assemblies* foram submetidos simultaneamente para a análise na ferramenta *Build\_PGAdb* (<http://wgmlstdb.imst.nsysu.edu.tw/index.php>), que realiza a anotação dos genomas pela ferramenta *Prokka* e a identificação dos alelos dos genes presentes através da ferramenta *Roary* (LIU et al., 2016). Ao término da análise, o *Build\_PGAdb* gera um esquema contendo os alelos obtidos em um arquivo na extensão *.xls*. O download desse arquivo foi realizado utilizando o filtro específico da página para um valor de ocorrência dos alelos  $\geq 95\%$ . Deste modo, este esquema obtido possuía apenas os alelos dos genes presentes em  $\geq 95\%$  dos *assemblies* das linhagens estudadas.

A análise filogenética de cgMLST foi realizada utilizando a ferramenta *Build\_wgMLSTtree* (<http://wgmlstdb.imst.nsysu.edu.tw/wgProfiling.php>). Os *assemblies* foram novamente submetidos junto do esquema dos alelos na extensão *.xls* obtido anteriormente, utilizando como parâmetros para a comparação uma cobertura e identidade mínimas de 90%. O *Build\_wgMLSTtree* realiza o alinhamento e detecção dos alelos presentes nos *assemblies* pela comparação com o esquema submetido através da ferramenta BLASTn, e em seguida o cálculo e construção do dendrograma de similaridade genotípica pelas ferramentas *Environment for Tree Exploraion* (ETE) e *PHYLIP* através do algoritmo UPGMA (LIU et al., 2016).

Ao final da análise, o dendrograma obtido na extensão *.newick* foi visualizado e salvo utilizando o *software FigTree v. 1.4.2* (Rambaut Research Group, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh).

#### **3.9.4. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)**

A análise de CRISPR foi realizada para as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) através dos *assemblies* gerados pelo WGS, utilizando a ferramenta online *CRISPRCasFinder* (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) (COUVIN et al., 2018).

Individualmente, um a um dos *assemblies* das linhagens de *S. Infantis* foram submetidos na plataforma, que realiza a busca das repetições diretas e espaçadores, listando seus respectivos tamanhos, sequências e localização ao longo do genoma bacteriano submetido. Apenas os espaçadores detectados no CRISPR1 e CRISPR2 foram incluídos na realização da análise. Os espaçadores presentes de cada uma das linhagens analisadas foram listados, e através do *software* Microsoft Excel foi criada uma matriz binária, onde o número “1” representaria a presença e “0” a ausência de determinado tipo espaçador em cada uma das linhagens estudadas.

A análise do padrão dos espaçadores presentes nas linhagens estudadas e a obtenção do dendrograma de similaridade genotípica foram realizados através da matriz binária construída no *software Bionumerics 7.6* (Biomérieux) pelo método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), utilizando o coeficiente de similaridade Dice e tolerância de 0.

### 3.10. Cálculo do índice de discriminação das metodologias de tipagem

O cálculo do índice de discriminação (DI) dos dendrogramas de similaridade genotípica das gerados no PFGE e na análise de CRISPR foi realizado utilizando uma variação do índice de diversidade de SIMPSON (1949), onde o índice de discriminação ( $D$ ) utilizado baseia-se na probabilidade de que duas linhagens não relacionadas, escolhidas aleatoriamente dentro de uma população, se localizem dentro de grupos de tipagem distintos. O índice  $D$  é obtido de acordo com a seguinte fórmula:

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

Onde  $N$  representa o número total de linhagens estudadas,  $s$  é o número total de tipos obtidos no dendrograma e  $n_j$  é o número de amostras que pertencem ao tipo  $j$  (HUNTER & GASTON, 1988).

## 4. RESULTADOS

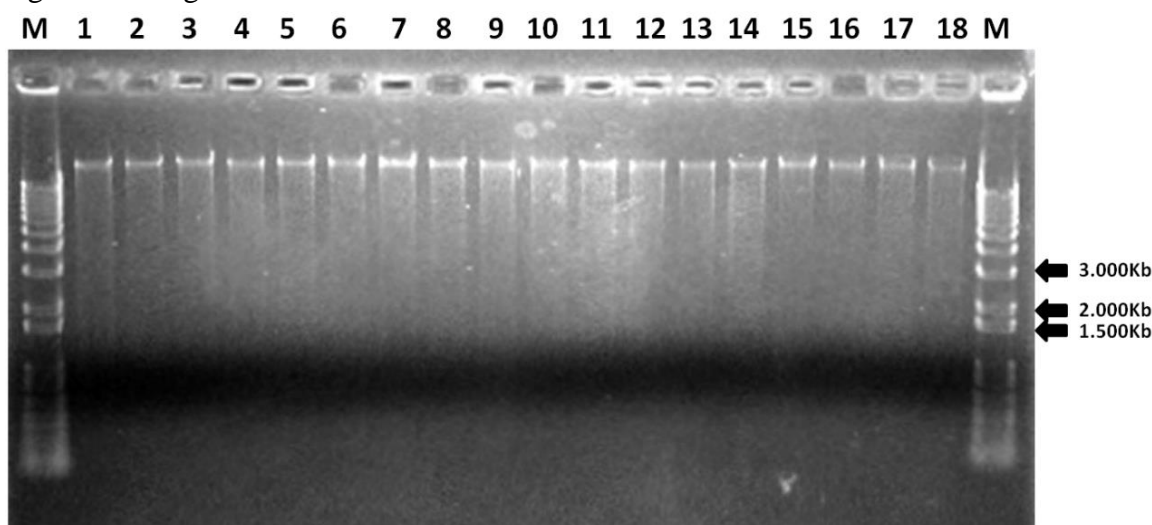
### 4.1. Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens

As 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) foram reativadas e tiveram sua pureza reconfirmada. Em ágar SS, as linhagens mostraram-se lactose-negativas e produtoras de H<sub>2</sub>S. Em ágar TSI, observou-se resultado positivo para a produção de H<sub>2</sub>S, fermentação de glicose e produção de gás para todas as linhagens estudadas.

### 4.2. Extração e verificação da pureza e integridade do DNA genômico

Todas as 80 linhagens tiveram seu DNA genômico extraído e apresentaram pureza entre 1,6 e 1,9. A Figura 1 apresenta um gel representativo de uma eletroforese em gel de agarose, realizada para avaliação da integridade do DNA genômico de algumas das linhagens de *Salmonella Infantis* estudadas.

**Figura 1** - Gel de agarose 1% representando o produto da extração do DNA genômico de algumas linhagens de *S. Infantis* estudadas.



M: marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Canaletas de 1 a 18: linhagens 1348, 2385, 2950, 2951, 3156, 5025, 124, 210, 212, 388, 583, 584, 677, 723, 982, 1143, 1284 e 1380, respectivamente.

### 4.3. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Entre as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2), 72 (90,0%) apresentaram resistência ou um perfil intermediário de resistência a pelo menos um dos antimicrobianos estudados, enquanto oito (10,0%) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados. Ainda, 31 linhagens (38,8%) apresentaram resistência a três ou mais diferentes classes de antimicrobianos. A Tabela 3 apresenta as porcentagens de linhagens resistentes ou que apresentaram perfis intermediários de resistência aos 18 antimicrobianos testados. O

Apêndice 1 apresenta os perfis de resistência a antimicrobianos para cada uma das 80 linhagens estudadas.

**Tabela 3** – Número e porcentagem de linhagens resistentes e que apresentaram perfis intermediários de resistência entre as 80 linhagens estudadas de *Salmonella* Infantis isoladas de alimentos, ambiente, humanos, animais e ração animal entre 2013 e 2018 no Brasil.

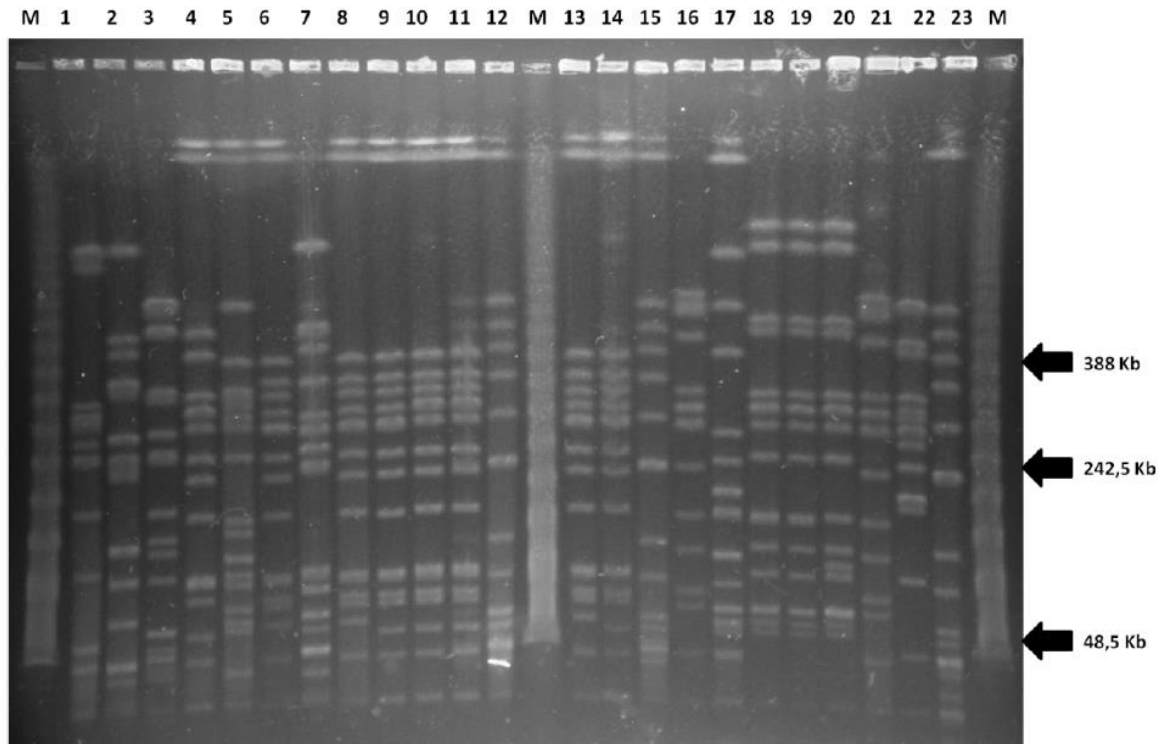
Antimicrobianos	Nº Linhagens resistentes (%)	Nº Linhagens com perfil intermediário (%)
<b>Penicilinas</b>		
Ampicilina	47 (57,8)	0
Piperacilina	41 (51,3)	6 (7,5)
<b>Associações de <math>\beta</math>-lactâmicos e inibidores de <math>\beta</math>-lactamases</b>		
Amoxicilina – ácido clavulânico	8 (10,0)	3 (3,8)
<b>Carbapenêmicos</b>		
Imipenem	2 (2,5)	3 (3,8)
<b>Cefalosporinas</b>		
Cefazolina	21 (26,3)	26 (32,5)
Cefoxitina	10 (12,5)	0
Ceftriaxona	19 (23,8)	2 (2,5)
Cefotaxime	24 (30,0)	16 (20,0)
Ceftazidime	11 (13,8)	4 (5,0)
Cefepime	9 (11,3)	7 (8,8)
<b>Quinolonas e Fluoroquinolonas</b>		
Ácido nalidíxico	4 (5,0)	10 (12,5)
Ciprofloxacina	1 (1,3)	34 (42,5)
<b>Tetraciclina</b>		
Tetraciclina	30 (37,5)	0
<b>Anfenicóis</b>		
Cloranfenicol	28 (35,0)	0
<b>Aminoglicosídeos</b>		
Estreptomicina	2 (2,5)	48 (60,0)
Amicacina	2 (2,5)	3 (3,8)
Gentamicina	1 (1,3)	0
<b>Sulfonamidas</b>		
Trimetoprim-sulfametoxazol	2 (2,5)	3 (3,8)

#### 4.4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

A Figura 1 traz um gel representativo de uma eletroforese em campo pulsado em gel de agarose PFGE 1% após clivagem do DNA genômico com a enzima de restrição *Xba*I

para visualização dos fragmentos de restrição gerados pelo ensaio de PFGE para algumas das linhagens de *Salmonella* Infantis estudadas.

**Figura 2** - Gel de agarose 1%, representativo do ensaio de PFGE de algumas das linhagens de *Salmonella* Infantis estudadas, clivadas com a enzima *XbaI*.



M: marcador de peso molecular *Lambda Ladder PFG Marker* (New England). Canaletas de 1 a 23: linhagens 1348, 2385, 2950, 2951, 3156, 5025, 124, 210, 212, 388, 583, 584, 677, 723, 982, 1143, 1284, 1380, 1408, 1409, 1441, 1711 e 2378, respectivamente.

A Figura 3 apresenta o dendrograma de similaridade genotípica gerado a partir da metodologia de PFGE para as linhagens de *S. Infantis* estudadas.

O dendrograma de similaridade genotípica agrupou as linhagens estudadas em 43 PFGE-tipos e três grupos distintos, que foram denominados PFGE-A, PFGE-B e PFGE-C, com uma similaridade  $\geq 80\%$  entre as linhagens de cada grupo, e uma similaridade geral  $\geq 78,2\%$  entre todas as linhagens analisadas (Figura 3).

O grupo PFGE-A apresentou similaridade  $\geq 80,0\%$  e um total de 27 linhagens, sendo destas 13 isoladas de alimentos entre 2014 e 2016, nove isoladas de ambiente entre 2014 e 2017, quatro isoladas de humanos entre 2016 e 2018 e uma isolada de ração animal em 2014. Com exceção de duas linhagens isoladas de alimento e ração animal no estado de São Paulo, todas as outras pertenciam aos três estados da região Sul (Figura 3).

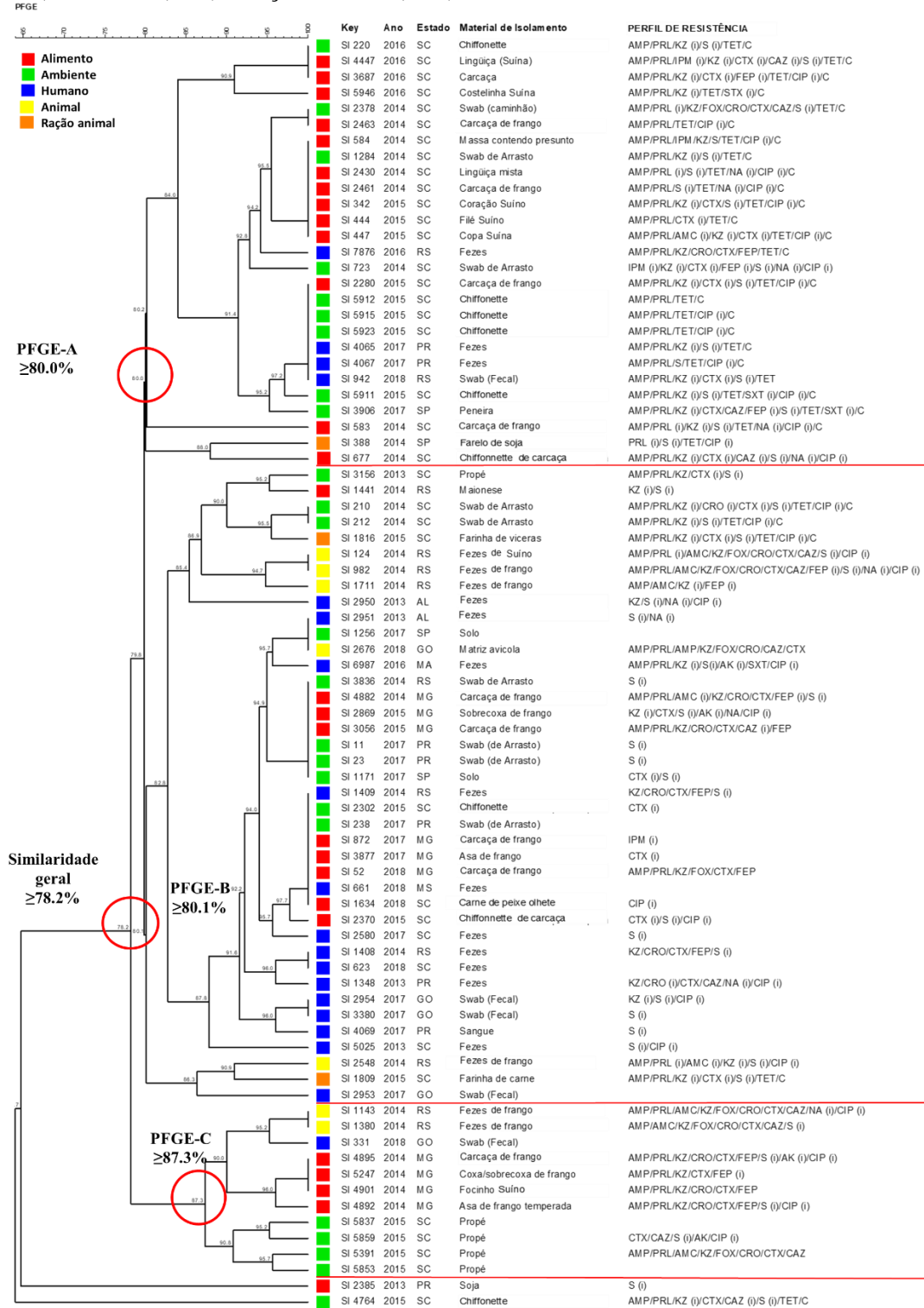
O grupo PFGE-B apresentou similaridade  $\geq 80,1\%$  e um total de 40 linhagens, sendo destas 14 isoladas de humanos entre 2014 e 2018, nove isoladas de alimento entre 2014 e 2018, nove isoladas de ambiente entre 2013 e 2017, cinco isoladas de animais em 2014 e 2018, e duas isoladas de ração animal em 2015. As linhagens foram isoladas dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Alagoas, Maranhão, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (Figura 3).

O grupo PFGE-C apresentou similaridade  $\geq 87,3\%$  e um total de 11 linhagens, sendo destas quatro isoladas de alimentos em 2014 no estado de Minas Gerais, quatro isoladas de ambiente em 2015 no estado de Goiás, duas isoladas de animais em 2014 no estado do Rio Grande do Sul e uma isolada de humano em 2018 no estado de Goiás (Figura 3).

A linhagem 2385, isolada em 2013 de alimento no estado do Paraná, e a linhagem 4764, isolada de ambiente em 2015 no estado de Santa Catarina, foram alocadas externamente a esses três grupos (Figura 3).

O índice de discriminação obtido pela metodologia de PFGE para as linhagens estudadas foi de 0,966.

**Figura 3** - Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir dos padrões de fragmentos gerados por PFGE com a enzima *Xba*I para 80 linhagens de *Salmonella* Infantis estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.



Alagoas, AL; Goiás, GO; Maranhão, MA; Mato Grosso do Sul, MS; Minas Gerais, MG; Paraná, PR; Rio Grande do Sul, RS; Santa Catarina, SC; São Paulo, SP. (i), perfil intermediário de resistência. AMC, Amoxicilina-ácido clavulânico; AMP, Ampicilina; AK, Amicacina; C, Cloranfenicol; CAZ, Ceftazidime; CIP, Ciprofloxacina; CN, Gentamicina; CRO, Ceftriaxona; CTX, Cefotaxime; FEP, Cefepime; FOX, Cefoxitina; IPM, Imipenem; KZ, Cefazolina; NA, Ácido nalidíxico; PRL, Piperacilina; S, Estreptomicina; SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; TE, Tetraciclina.



#### 4.5. Sequenciamento do genoma completo (WGS)

O WGS foi realizado para todas as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2). Os *assemblies* gerados apresentaram de 30 a 96 *contigs*, tamanho de 4,6 a 5,2Mb e cobertura de 34 a 296X. Os dados individuais dos *assemblies* gerados para cada uma das linhagens estudadas e os respectivos números de acesso estão listados no Apêndice B.

#### 4.6. Pesquisa de genes de virulência

Dentre os 12 genes de virulência pesquisados através dos *assemblies* das 80 linhagens de *S. Infantis* (Tabela 2), os genes *invA*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *sipA*, *sipD*, *flgK*, *flgL*, *fljB*, *sifA* e *ssaR* foram detectados em todas as linhagens estudadas, enquanto o gene *spvB* não foi detectado em nenhuma das linhagens estudadas de acordo com os parâmetros descritos no item 3.7.

#### 4.7. Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos

Entre as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2), todas apresentaram ao menos um gene adquirido de resistência a antimicrobianos ou mutação em genes cromossômicos, que foram pesquisados conforme descritos no item 3.8.

Foram detectados os genes *aac(6')-Iaa* (n=31/100%) e *aadA12* (n=2/2.5%), que conferem resistência a antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos; *bla<sub>TEM-1</sub>* (n=32/40%), *bla<sub>CTX-M-8</sub>* (n=9/11.3%), *bla<sub>CMY-2</sub>* (n=8/10.0%) e *bla<sub>CMY-61</sub>* (n=1/1.3%), que conferem resistência à antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos; *dfrA8* (n=30/37.5%), que confere resistência a compostos a base de diaminopirimidinas, como o trimetoprim; *tet(A)* (n=29/36.3%), que confere resistência a antimicrobianos da classe das tetraciclina; e *floR* (n=29/36.3%), que confere resistência a antimicrobianos da classe dos anfenicóis.

Entre as mutações pesquisadas em genes cromossômicos, foram encontrados três tipos de mutações no gene *parC* e um tipo no gene *gyrB*, que conferem resistência a antimicrobianos das classes das quinolonas, e um tipo no gene *pmrA*, que confere resistência a peptídeos antimicrobianos.

No gene *gyrB*, foi encontrada a mutação pontual da base C para A no códon que codifica o aminoácido Glutamina (Gln) 624, levando a formação do aminoácido Lisina (Lys). Já no gene *parC* foi detectada uma mutação pontual da base C para G no códon que codifica o aminoácido Treonina (Thr) 57, levando a formação do aminoácido Serina (Ser), e uma segunda mutação pontual da base A para T no códon que codifica a formação do

aminoácido Thr255, levando a formação de uma Ser. Estas três mutações foram detectadas em todas as linhagens estudadas.

A linhagem 2580/17 apresentou adicionalmente uma mutação pontual no gene *parC*, de base T para C no códon que codifica o aminoácido Valina (Val) 702, levando a formação de uma Alanina (Ala). A linhagem 124/14 apresentou também no gene *pmrA* uma mutação pontual de base G para T no códon que codifica o aminoácido Aspartato (Asp) 28, levando a formação de uma Tirosina (Tyr).

No Apêndice 1 são apresentados os genes de resistência adquiridos e as mutações em genes cromossômicos detectados em cada uma das 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas.

#### **4.8. Análise de *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs)**

A Figura 4 apresenta o dendrograma de similaridade genotípica gerado a partir da análise de SNPs realizada com os *assemblies* das 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas.

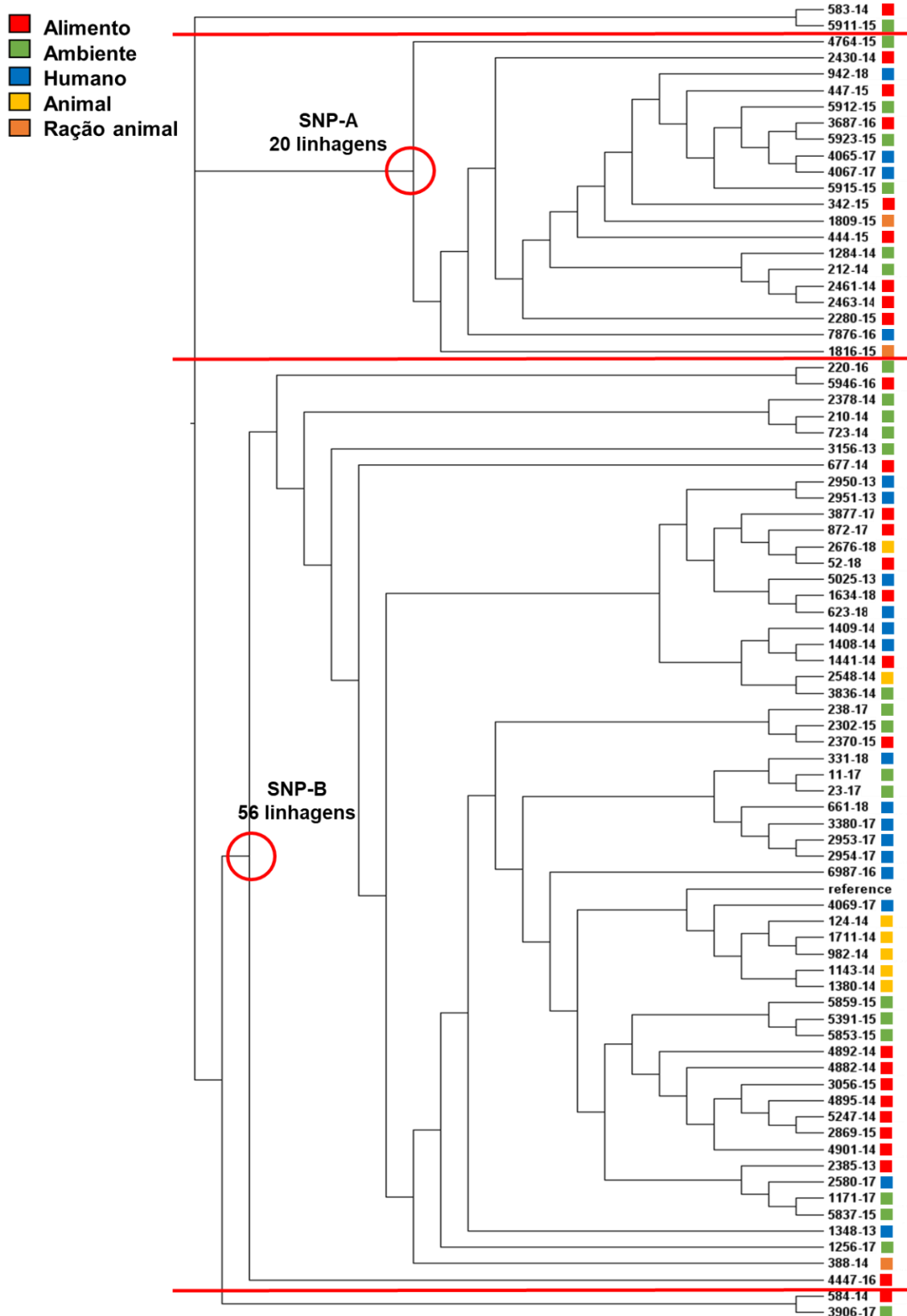
O dendrograma de similaridade genotípica agrupou as linhagens estudadas em dois grupos distintos, que foram denominados SNP-A e SNP-B (Figura 4).

O grupo SNP-A apresentou um total de 20 linhagens, sendo destas oito isoladas de alimentos entre 2014 e 2016, seis isoladas de ambiente em 2014 e 2015, quatro isoladas de humanos entre 2016 e 2018 e duas isoladas de ração animal em 2015 (Figura 4). Todas as linhagens do grupo SNP-A pertencem aos três estados da região Sul.

O grupo SNP-B apresentou um total de 56 linhagens, sendo destas 17 isoladas de alimentos entre 2013 e 2018, 16 isoladas de ambiente entre 2013 e 2018, 15 isoladas de humanos em 2013 e 2018 e uma isolada de ração animal em 2014. Todas as sete linhagens estudadas, isoladas de animais em 2014 e 2018, foram agrupadas no grupo SNP-B (Figura 4). As linhagens foram isoladas dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Alagoas, Maranhão, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. A linhagem de referência LN649235 foi alocada junto das 56 linhagens de *S. Infantis* no grupo SNP-B (Figura 4).

As linhagens 583 e 584, isoladas de alimento em 2014 no estado de Santa Catarina, a linhagem 5911, isolada de ambiente em 2015 também no estado de Santa Catarina, e a linhagem 3906, isolada de ambiente em 2017 no estado de São Paulo, foram alocadas externamente a estes dois grupos (Figura 4).

**Figura 4** - Dendrograma de similaridade genotípica gerado a partir da análise de SNPs das 80 linhagens de *Salmonella* Infantis estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.

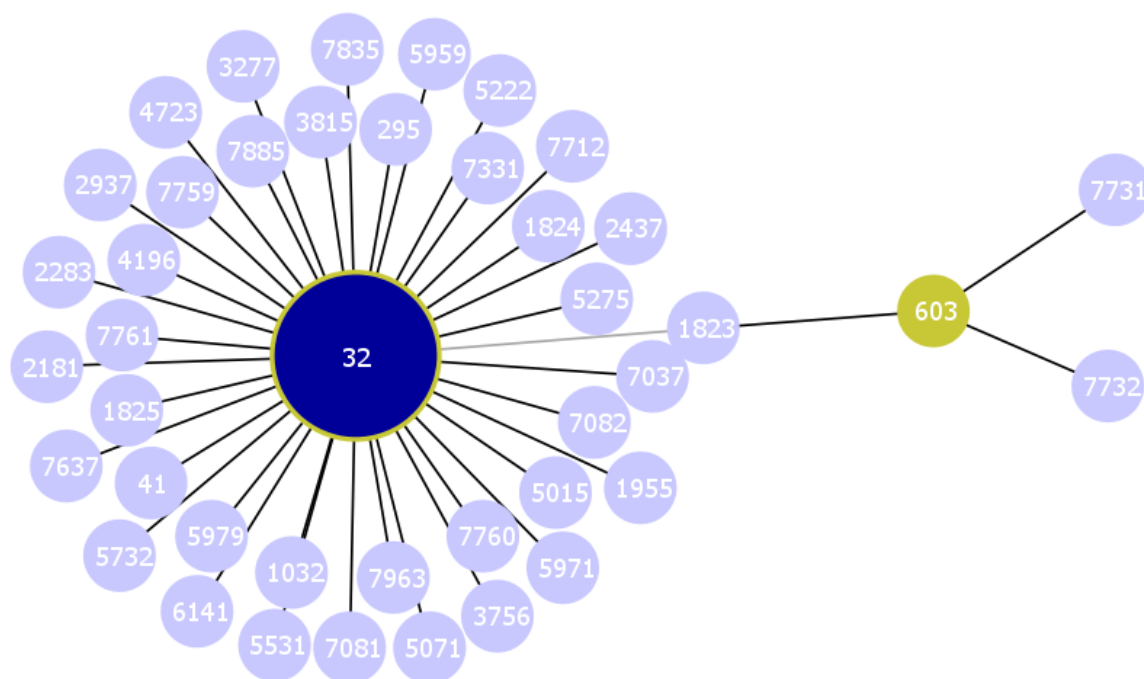


A linhagem “reference” representa a linhagem de *S. Infantis* LN649235, que foi utilizada como genoma de referência na análise de SNPs e também para fins de comparação.

#### 4.9. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Todas as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Tabela 2) foram analisadas pela metodologia de MLST e todas apresentaram o mesmo *sequence type*, o ST32. A Figura 4 apresenta o diagrama de similaridade genotípica entre as 80 linhagens de *S. Infantis* pertencentes ao ST32 e dos STs de outras 7.128 linhagens desta sorovariedade obtidos através da plataforma *Enterobase* no dia 30 de janeiro de 2021.

**Figura 5** - Diagrama de similaridade genotípica gerado através do *software PHYLOViZ* com os STs das 80 linhagens de *Salmonella Infantis* estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) no Brasil entre 2013 e 2018, e os STs de 7.128 linhagens obtidas através da plataforma *Enterobase*.



No centro do diagrama, representado pelo círculo azul, está representado o ST32, o principal ST encontrado entre as linhagens de *S. Infantis* analisadas neste estudo e entre as linhagens disponíveis na plataforma *Enterobase*. A linha amarela ao redor do círculo azul do ST32 e o círculo amarelo do ST603 indicam que estes são os STs centrais detectados entre as linhagens de *S. Infantis*, onde os outros STs (representados em círculos azuis claros) são variações destes STs principais. O tamanho das esferas é proporcional à quantidade de linhagens.

#### 4.10. core genome MLST (cgMLST)

A Figura 6 apresenta o dendrograma de similaridade genotípica gerado a partir da análise de cgMLST realizada com os *assemblies* das 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas.

O dendrograma de similaridade genotípica agrupou as linhagens estudadas em três grupos distintos, que foram denominados cgMLST-A, cgMLST-B e cgMLST-C.

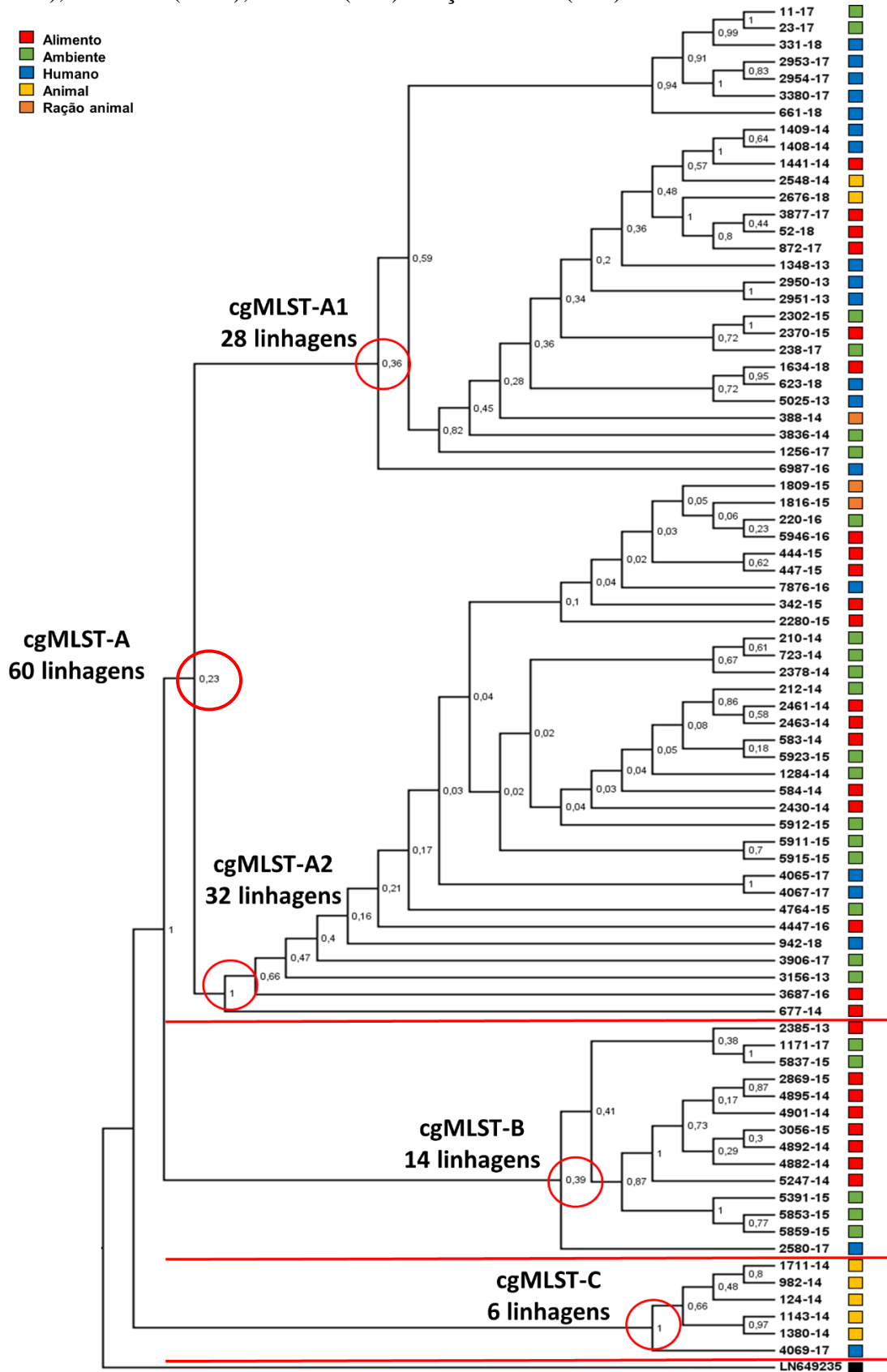
O grupo cgMLST-A apresentou um total de 60 linhagens, que foram divididas em dois subgrupos denominados cgMLST-A1 e cgMLST-A2. O grupo cgMLST-A1 apresentou um total de 28 linhagens, sendo destas 13 isoladas de humanos e entre 2013 e 2018, seis isoladas de alimentos entre 2014 e 2018, seis isoladas de ambiente entre 2014 e 2017, duas isoladas de animais em 2014 e 2018 e uma de ração animal em 2014 (Figura 6). As 28 linhagens foram isoladas dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Alagoas, Maranhão, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. O grupo cgMLST-A2 apresentou um total de 32, sendo destas 13 isoladas de alimentos entre 2013 e 2016, 13 isoladas de ambiente entre 2013 e 2017, quatro isoladas de humanos entre 2016 e 2018 e duas isoladas de ração animal em 2015 (Figura 6). Todas as linhagens do grupo cgMLST-B foram isoladas dos três estados da região Sul.

O grupo cgMLST-B apresentou um total de 14 linhagens, sendo destas oito isoladas de 2013 a 2015, cinco isoladas de ambiente em 2015 e 2017 e uma isolada de humano em 2017 (Figura 6). As 14 linhagens do grupo cgMLST-B foram isoladas dos três estados da região Sul e do estado de São Paulo.

O grupo cgMLST-C apresentou um total de seis linhagens, sendo destas cinco isoladas de animais em 2014 no estado do Rio Grande do Sul e uma isolada de humano em 2017 no estado do Paraná (Figura 6).

A linhagem de referência LN649235 foi alocada externamente aos quatro grupos contendo as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas (Figura 6).

**Figura 6** - Dendrograma de similaridade genotípica gerado a partir da análise de cgMLST das 80 linhagens de *Salmonella* Infantis estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.



A linhagem de *S. Infantis* LN649235 foi incluída para fins de comparação no dendrograma.

#### **4.11. Análise de *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)**

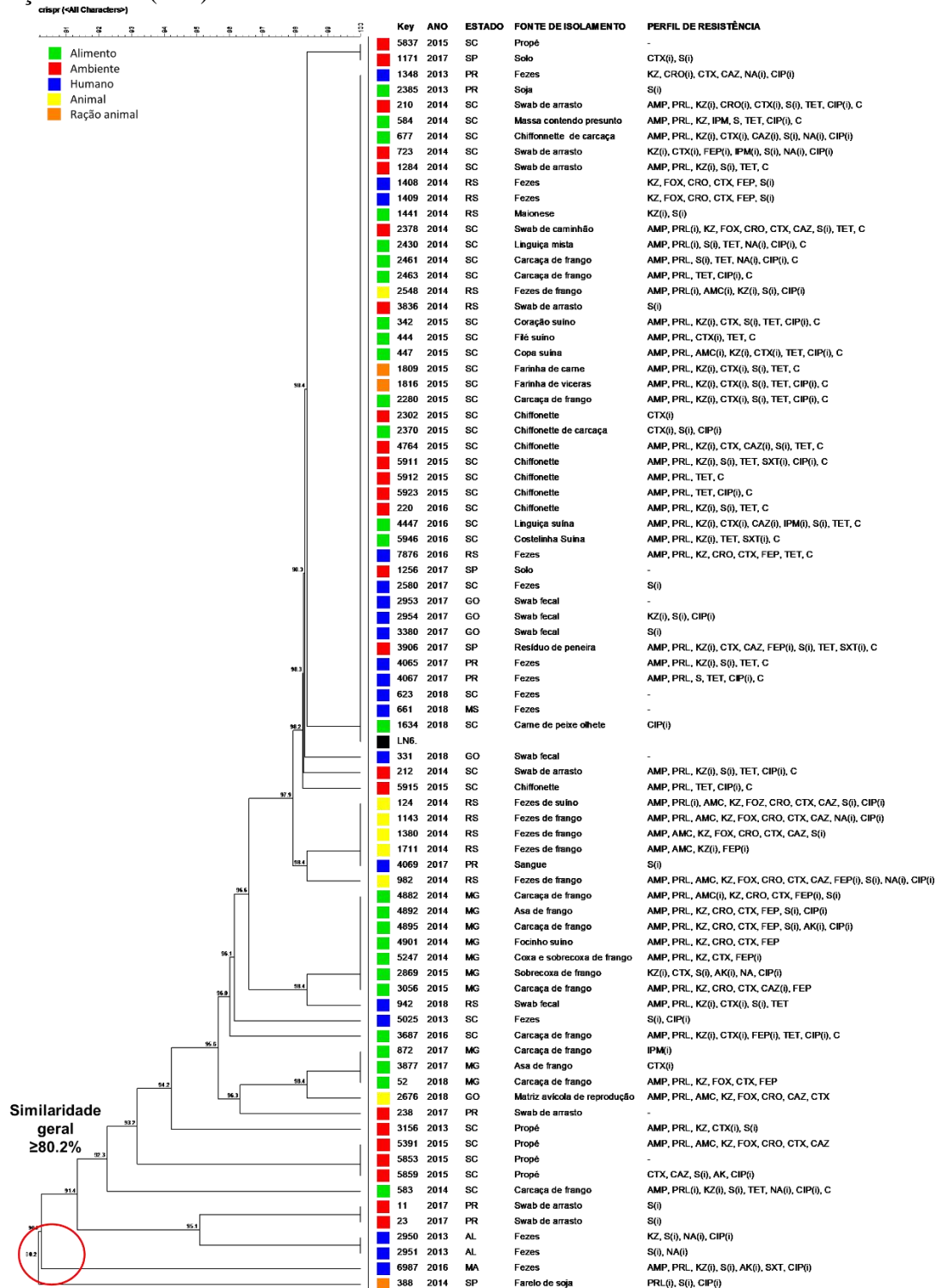
No CRISPR1 das 80 linhagens estudadas de *S. Infantis* foram encontrados 35 tipos de espaçadores com tamanhos de 25 a 72pb. Em cada linhagem estudada foram encontrados de 26 a 32 espaçadores, que resultaram na formação de 14 diferentes alelos do CRISPR1.

No CRISPR2 das 80 linhagens estudadas de *S. Infantis* foram encontrados 26 tipos de espaçadores com tamanhos de 32 a 33pb. Em cada linhagem estudada foram encontrados de 22 a 26 espaçadores, que resultaram na formação de 14 diferentes alelos do CRISPR2.

A análise dos espaçadores presentes nos diferentes alelos de CRISPR1 e CRISPR2 das 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas foi utilizada para gerar um dendrograma de similaridade genotípica, como demonstrado na Figura 7. As 80 linhagens foram diferenciadas em 21 CRISPR-tipos e agrupadas em um único grupo, já que a similaridade geral obtida no dendrograma entre todas as linhagens estudadas foi  $\geq 80.2\%$  (Figura 7). Entre os tipos encontrados, a linhagem de referência LN649235 e 43 linhagens isoladas de alimentos, ambiente, humanos, animais e ração animal entre 2013 e 2018 dos estados de São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná pertenceram a um mesmo tipo com similaridade de 100%, sendo assim consideradas indistinguíveis por esta metodologia (Figura 7).

O índice de discriminação obtido pela metodologia de CRISPR para as linhagens estudadas foi de 0,696.

**Figura 7** - Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir dos espaçadores detectados na análise de CRISPR das 80 linhagens de *Salmonella* Infantis estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.



LN6, *S. Infantis* LN649235. Alagoas, AL; Goiás, GO; Maranhão, MA; Mato Grosso do Sul, MS; Minas Gerais, MG; Paraná, PR; Rio Grande do Sul, RS; Santa Catarina, SC; São Paulo, SP. (i), perfil intermediário de resistência. AMC, Amoxicilina-ácido clavulânico; AMP, Ampicilina; AK, Amicacina; C, Cloranfenicol; CAZ, Ceftazidime; CIP, Ciprofloxacina; CN, Gentamicina; CRO, Ceftriaxona; CTX, Cefotaxime; FEP, Cefepime; FOX, Cefotaxime; IPM, Imipenem; KZ, Cefazolina; NA, Ácido nalidíxico; PRL, Piperacilina; S, Estreptomicina; SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; TE, Tetraciclina.



## 5. DISCUSSÃO

A salmonelose por sorovariedades não-tifóides de *Salmonella* está entre as infecções bacterianas mais comuns no mundo causadas pela ingestão de alimentos e água contaminados (MAJOWICKZ et al., 2010; WHO, 2018). *S. Infantis* é uma sorovariedade não-tifoide, ubiquitária, capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros animais além de humanos, e vem sendo relatada nos últimos anos entre as sorovariedades mais isoladas de *Salmonella* em diversos países (SHAHADA et al., 2013; CRIM et al., 2015; MARZEL et al., 2016; GELAW et al., 2018; AMMAR et al., 2019; EFSA & ECDC, 2019). No Brasil, a sorovariedade *Infantis* é reportada em uma alta prevalência entre linhagens isoladas de alimentos, animais e do ambiente, além de estar relacionada a quadros de infecções hospitalares em adultos e recém-nascidos. (MORAES et al., 2000; CASTRO et al., 2002; PESSOA-SILVA et al., 2002; MEDEIROS et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013; KRZYZANOWSKI et al., 2014; VOSS-RECH et al., 2015; CUNHA-NETO et al., 2018).

No entanto, apesar da importância clínica e econômica que as infecções causadas por *S. Infantis* podem representar nos âmbitos de saúde pública e segurança alimentar, poucos estudos foram conduzidos no país visando caracterizar genotipicamente linhagens desta sorovariedade, limitando-se geralmente ao seu isolamento e determinação do perfil de resistência a antimicrobianos (MORAES et al., 2000; CASTRO et al., 2002; PESSOA-SILVA et al., 2002; FONSECA et al., 2006; MEDEIROS et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013; ROWLANDS et al., 2014; CUNHA-NETO et al., 2018, MONTE et al., 2019). Deste modo, são necessários estudos que investiguem aspectos como a diversidade genotípica, o potencial patogênico e perfil genotípico e fenotípico de resistência a antimicrobianos em um expressivo número de linhagens de *S. Infantis* isoladas de fontes e localidades diversas no país, permitindo assim uma melhor caracterização de isolados desta sorovariedade no Brasil.

No presente estudo, a presença de marcadores de virulência e os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos foram verificados em 80 linhagens de *S. Infantis* isoladas de alimentos, ambiente, humanos, animais e ração animal no Brasil entre 2013 e 2018. Ainda, foram utilizadas metodologias de tipagem molecular tradicionais, como o PFGE, e metodologias baseadas nos dados obtidos pelo WGS, como MLST, cgMLST, e análises de SNPs e CRISPR, para investigar a diversidade genotípica das linhagens estudadas.

Em relação ao potencial patogênico das linhagens de *S. Infantis* estudadas, todas apresentaram os genes de virulência *invA*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *sipA*, *sipD*, *flgK*, *flgL*, *fljB*,

*sifA* e *ssaR*, enquanto o gene *spvB* não foi detectado em nenhuma linhagem estudada. A presença em altas frequências de genes cromossômicos de virulência de *Salmonella*, majoritariamente presentes nas ilhas de patogenicidade 1 e 2, foi previamente descrita para linhagens de *S. Infantis* isoladas em diferentes locais do mundo, tendo em vista que são estes os principais responsáveis por promover a patogenicidade deste microrganismo através da formação de flagelos, invasão a células epiteliais intestinais e sobrevivência e replicação em macrófagos do hospedeiro (DIEYE et al., 2009; RYCHLIK et al., 2009; ALMEIDA et al., 2013; SEVER & AKAN, 2018; JAJERE, 2019). Por outro lado, similarmente ao presente estudo, o gene *spvB* também já foi reportado em baixas frequências ou até mesmo ausente em *S. Infantis*, sugerindo que linhagens desta sorovariedade provavelmente não possuam o plasmídeo associado a virulência que contém os genes *spv* (MAZURKIEWICZ et al., 2008; GUINEY & FIERER, 2011; ALMEIDA et al., 2013; SEVER & AKAN, 2018).

Em 2013, Almeida e colaboradores relataram a presença dos genes *invA*, *sopB*, *sopD*, *sipA*, *sipD*, *ssaR*, *sifA*, *flgK*, *fljB* e *flgL* em mais de 90% de 35 linhagens de *S. Infantis* isoladas de humanos e alimentos no estado de São Paulo entre 1984 e 2009, enquanto o gene *spvB* esteve ausente em todas (ALMEIDA et al., 2013). Similarmente, Sever e Akan (2018) reportaram a presença dos genes *sipA*, *sipD*, *sopD*, *sopB*, *sopE*, *ssaR* e *sifA* em mais de 88% das 220 amostras isoladas de frangos e perus na Turquia, enquanto o gene *spvC* foi detectado em pouco mais de 8% das linhagens estudadas (SEVER & AKAN, 2018).

Deste modo, mesmo que genes plasmidiais como o *spvB* estejam ausentes, a presença absoluta de importantes genes de virulência cromossômicos de *Salmonella* reforçam o potencial patogênico de linhagens desta sorovariedade em causar doença em humanos, assim como o risco de sua presença em alimentos, ambiente e fontes veterinárias.

Ainda que as infecções por sorovariiedades não-tifoides de *Salmonella* geralmente sejam auto limitantes, os antimicrobianos das classes das fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira e quarta geração, que são drogas de escolha no tratamento da salmonelose, podem ser necessários quando pacientes imunocomprometidos são acometidos ou infecções de maior gravidade se desenvolvem (HAEUSLER & CURTIS, 2012; CHRISTENSON, 2012; McDERMOTT et al., 2018). No entanto, o crescente aumento das taxas de resistência a diversas classes de agentes antimicrobianos utilizados na terapia humana e veterinária se mostram como um grave problema de saúde pública e segurança alimentar, já que a disseminação destes microrganismos ocorre principalmente pelo consumo de alimentos

contaminados e condições de higiene precárias (FRANCO et al., 2015; FOLSTER et al., 2017; BROWN et al., 2018; ACAR et al., 2019; MONTE et al., 2019; WAJID et al., 2019).

No presente estudo, foram detectadas taxas de resistência fenotípica de 2,5 a 57,8% a antimicrobianos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos entre as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas, incluindo às cefalosporinas de terceira e de quarta geração, detectadas em taxas de 11,3 a 30,0% (Tabela 3). Já em relação à resistência genotípica aos  $\beta$ -lactâmicos, foram detectados através do WGS os genes *bla<sub>TEM-1</sub>* em 40% das linhagens estudadas, *bla<sub>CTX-M-8</sub>* em 11,3%, *bla<sub>CMY-2</sub>* em 10,0% e *bla<sub>CMY-61</sub>* em 1,3%. Similarmente ao presente estudo, outros autores já reportaram a presença destes genes e perfis fenotípicos de resistência aos antimicrobianos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos em linhagens de *S. Infantis* no Brasil e no mundo (MORAES et al., 2000; FONSECA et al., 2006; SHAHADA et al., 2010; VINUEZA-BURGOS et al., 2016; MONTE et al., 2019; VILELA et al., 2020).

Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, os genes *bla<sub>TEM-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-8</sub>* e *bla<sub>CMY-2</sub>* foram detectados entre 54 genomas sequenciados de linhagens de *S. Infantis* isoladas de animais, alimentos e do ambiente entre 2005 e 2016 no Brasil, que estavam disponíveis em um banco de dados público (VILELA et al., 2020a). Vinueza-Burgos e colaboradores (2016) reportaram que, entre 52 linhagens de *S. Infantis* isoladas de cortes de frango no Equador entre 2013 e 2014, aproximadamente 80% apresentavam resistência a ampicilina e cefotaxime e 5% a ceftazidime, que estavam associadas a presença do gene *bla<sub>CTX-M</sub>* em mais de 60% destes isolados (VINUEZA-BURGOS et al., 2016). Shahada e colaboradores (2010) detectaram taxas de 24% de resistência a ampicilina em 9% a cefotaxime e ceftazidime entre 120 linhagens de *S. Infantis* isoladas de granjas no Japão entre 2007 e 2008, estando majoritariamente associadas a presença do gene *bla<sub>TEM</sub>* entre estes isolados resistentes (SHAHADA et al., 2010). Nos estudos de Moraes e colaboradores (2000) e de Fonseca e colaboradores (2002), foram identificadas linhagens de *S. Infantis* em casos de infecções hospitalares em recém-nascidos em hospitais públicos do Rio de Janeiro entre 1995 e 2001 apresentando extensa resistência a cefalosporinas e ampicilina associadas a presença do gene *bla<sub>TEM</sub>* (MORAES et al., 2000; FONSECA et al., 2006). No trabalho de Monte e colaboradores (2019), três linhagens de *S. Infantis* isoladas de carne suína em São Paulo em 2015 tiveram o gene *bla<sub>TEM-1</sub>* identificado através do WGS (MONTE et al., 2019).

Em relação aos antimicrobianos das classes das quinolonas e fluoroquinolonas, no presente estudo foram detectadas baixas taxas de resistência fenotípica ao ácido nalidíxico e a ciprofloxacina (Tabela 3), assim como a ausência de genes PMQR de resistência a esta

classe de drogas. No entanto, mais de 40% das linhagens estudadas apresentaram perfis intermediários de resistência fenotípica a ciprofloxacina, além da presença absoluta em todas as linhagens estudadas de mutações nos genes *gyrB* (Gln624→Lys) e *parC* (Thr57→Ser e Thr255→Ser), responsáveis por conferir resistência a estes antimicrobianos desta classe. Deste modo, a presença de resistência intermediária a ciprofloxacina alerta para a necessidade de um monitoramento mais frequente de linhagens de *S. Infantis* em vista do potencial de seleção de linhagens resistentes a antimicrobianos desta classe, que são considerados de escolha para tratamento da salmonelose em humanos.

As diferentes mutações nos genes cromossômicos da QRDR podem conferir diferentes níveis de resistência a quinolonas e fluoroquinolonas nas linhagens em que estes estão presentes. As mutações no gene *gyrA* são geralmente as mais prevalentes e as mais associadas a níveis elevados de resistência a estes antimicrobianos, sendo a mutação Asp87→Tyr no gene *gyrA* a mais encontrada em linhagens de *S. Infantis* (KEHRENBERG et al., 2006; KARCZMARCZYK et al., 2010; VELHNER et al., 2014; NAKATSUCHI et al., 2018). A mutação *parC* (Thr57→Ser) já foi previamente descrita em linhagens de *Salmonella*, estando relacionada a um aumento de susceptibilidade à ciprofloxacina (EAVES et al., 2004), corroborando com as baixas taxas de resistência observadas fenotipicamente entre as linhagens estudadas. Já as mutações *gyrB* (Gln624→Lys), *parC* (Thr255→Ser) e *parC* (Val702→Ala), sendo esta última presente em apenas uma linhagem, não foram previamente reportadas em linhagens de *Salmonella*. Em conjunto, estes resultados podem sugerir que linhagens de *S. Infantis* possam estar desenvolvendo baixos níveis de resistência fenotípica às quinolonas e fluoroquinolonas em decorrência da presença de diferentes tipos de mutações pontuais em genes da QRDR. No entanto, são necessários estudos adicionais para investigar com maior precisão os níveis de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas conferidos pelas mutações citadas nestes isolados.

É importante notar que, entre as linhagens estudadas, foram encontradas taxas significativas de resistência fenotípica assim como a alta presença de genes adquiridos de classes de antimicrobianos como tetraciclina, anfenicóis, sulfonamidas e aminoglicosídeos, que são pouco utilizados atualmente no tratamento clínico da salmonelose em humanos, mas ainda são empregados na área veterinária. Similarmente, outros estudos também reportam estes perfis fenotípicos e genotípicos de resistência em linhagens de *S. Infantis* isoladas de humanos, alimentos e animais no Brasil e no mundo (SHAHADA et al., 2010; KRZYZANOWSKI et al., 2014; VINUEZA-BURGOS et al., 2016; HINDERMANN et al.,

2017; ASGHARPOUR et al., 2018; BROWN et al., 2018; CUNHA-NETO et al., 2018; RANJBAR et al., 2018; WAJID et al., 2019). Estes perfis podem ser decorrentes não só do elevado uso clínico destes agentes na terapia humana no passado, mas também de seu amplo e indiscriminado uso profilático e como promotor de crescimento na criação de animais de produção como frangos, bovinos e suínos, que ainda ocorrem ilegalmente no país, podendo assim influenciar na disseminação da resistência a antimicrobianos em microrganismos causadores de infecções alimentares, como *Salmonella* (McDERMOTT et al., 2018; XIONG et al., 2018; VILELA et al., 2019).

Em vista disso, a presença de perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a múltiplos antimicrobianos em *S. Infantis* isoladas de fontes diversas enfatizam o risco que linhagens desta sorovariedade possam representar nos âmbitos de saúde pública e segurança alimentar na disseminação da resistência a antibióticos.

Metodologias de tipagem molecular bacteriana vem sendo amplamente empregadas em substituição a técnicas de tipagem fenotípicas em razão de suas maiores reprodutibilidade e capacidade de diferenciação de subtipos entre linhagens, que permitiram ao longo dos anos a identificação e caracterização de diferentes microrganismos, detecção de surtos, interpretação de padrões de infecção e rotas de transmissão (OLIVE & BEAN, 1999; SACHSE & MOEBIUS, 2015). Para linhagens de *S. Infantis*, diversas técnicas vêm sendo empregadas com sucesso ao longo dos anos, desde metodologias tradicionais e amplamente empregadas por décadas, como o PFGE, até as mais modernas e que se baseiam na utilização dos dados gerados por WGS para sua realização, como as análises de SNPs, CRISPR e cgMLST (WEGENER & BAGGESEN, 1996; FONSECA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013; YOKOYAMA et al., 2014; YOKOYAMA et al., 2015; MARZEL et al., 2016; BROWN et al., 2018; GYMOESE et al., 2019; ALBA et al., 2020)

No presente estudo, as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas foram tipadas molecularmente pelas metodologias de PFGE e, a partir do WGS, pelas análises de SNPs, MLST, cgMLST e CRISPR.

A técnica de PFGE é considerada como umas das metodologias padrão-ouro para caracterização molecular de linhagens de *Salmonella*, sendo a mais utilizada ao longo dos anos no Brasil e no mundo para caracterizar diversas sorovariedades, incluindo *S. Infantis* (PESSOA-SILVA et al., 2002; FONSECA et al., 2006; NODA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; RAHMANI et al., 2013; PAPADOPOULOS et al., 2017; REALPE-QUINTERO et al., 2018). Neste estudo, o PFGE dividiu as 80 linhagens estudadas em 43 PFGE-tipos,

três grupos distintos com uma similaridade  $\geq 80\%$  entre as linhagens de cada grupo, e ainda uma similaridade geral  $\geq 78,2\%$  entre todas as linhagens estudadas, com um DI de 0,966 (Figura 3). O grupo PFGE-B agrupou o maior número de linhagens ( $n=40$ ) com similaridade  $\geq 80,1\%$  isoladas de alimentos, ambiente, humanos, animais e ração animal de 2013 a 2018 em estados de diferentes regiões do Brasil (Figura 3), o que sugere a ocorrência de um subtipo prevalente de *S. Infantis* que tem contaminado fontes diversas no país. Ademais, a relativa alta similaridade entre todas as linhagens alocadas nos três grupos obtidos ( $\geq 78,3\%$ ) reforçam esta hipótese.

Diversos estudos reportaram diferentes tipos de resultados obtidos por esta técnica na caracterização de linhagens de *S. Infantis* em diversas localidades no mundo (NODA et al., 2010; RAHMANI et al., 2013; PAPADOPOULOS et al., 2017; REALPE-QUINTERO et al., 2018). No estudo de Papadopoulos e colaboradores (2017), 40 linhagens de *S. Infantis* isoladas de humanos, alimentos e animais na Grécia entre 2007 e 2010 foram agrupadas pelo PFGE em 31 PFGE-tipos, quatro grupos com similaridade  $\geq 87\%$  entre o total de linhagens e um índice de discriminação de 0,965 (PAPADOPOULOS et al., 2017). Noda e colaboradores (2010) detectaram a presença de 24 PFGE-tipos e um índice de discriminação de 0,86 entre as 74 linhagens estudadas de *S. Infantis* isoladas durante surtos alimentares e casos esporádicos de 1996 e 2005 no Japão (NODA et al., 2010). Realpe-Quintero e colaboradores (2018) identificaram dois grupos distintos de linhagens de *S. Infantis* pela técnica de PFGE entre 19 isolados de carne bovina e humanos no México de 2008 a 2010 (REALPE-QUINTERO et al., 2018). Rahmani e colaboradores (2013) identificaram, entre 27 linhagens de *S. Infantis* isoladas de frangos entre 2007 e 2011 no Irã, a presença de apenas dois PFGE-tipos, sendo 26 linhagens consideradas indistinguíveis perante esta técnica (RAHMANI et al., 2013).

Ainda que poucos estudos tenham sido conduzidos no Brasil com *S. Infantis*, a metodologia de PFGE foi a mais utilizada, até o momento, na caracterização molecular de linhagens desta sorovariedade no país (PESSOA-SILVA et al., 2002; FONSECA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013). No estudo de Almeida e colaboradores (2013), embora o PFGE tenha sido capaz de dividir as 35 linhagens de *S. Infantis* isoladas de humanos e alimentos no estado de São Paulo entre 1984 e 2009 em diversos PFGE-tipos e com um índice de discriminação de 0,965, não foi observada nenhuma formação de grupos devido a uma similaridade geral  $\geq 80,7\%$  entre as linhagens, que sugeriu a presença de um subtipo prevalente de linhagens contaminando humanos e alimentos por 25 anos no estado de São

Paulo (ALMEIDA et al., 2013). No estudo conduzido por Pessoa-Silva (2002) e colaboradores, a metodologia caracterizou 27 linhagens de *S. Infantis* isoladas de fluidos humanos e do ambiente hospitalar de uma UTI neonatal no Rio de Janeiro - RJ como sendo geneticamente indistinguíveis (PESSOA-SILVA et al., 2002). Fonseca e colaboradores (2006) reportaram a presença de cinco subtipos de linhagens de *S. Infantis* apresentando uma alta similaridade de 85% pelo PFGE entre 35 isolados de sangue e fezes humanas de quatro hospitais públicos no Rio de Janeiro - RJ entre 1996 e 2001 (FONSECA et al., 2006). Estes trabalhos supra-citados também reforçam a possível ocorrência de um subtipo prevalente de *S. Infantis* no país. Deste modo, o presente estudo contribuiu para uma melhor caracterização de linhagens circulantes de *S. Infantis* de diferentes fontes e em anos mais recentes no país através desta metodologia.

A técnica de MLST, que foi realizada através da análise dos *assemblies* gerados pelo WGS, demonstrou que as 80 linhagens de *S. Infantis* estudadas pertenceram ao ST32. Similarmente a outros trabalhos, este ST demonstra uma alta predominância em linhagens desta sorovariedade, sendo o mais reportado em estudos conduzidos no Brasil e no mundo (HAUSER et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; RANJBAR et al., 2018; FUENTES-CASTILLO et al., 2019; MONTE et al., 2019; SODAGARI et al., 2019; MEJÍA et al., 2020). No entanto, como pode ser observado no diagrama gerado na comparação com os dados obtidos na plataforma *Enterobase* (Figura 5), outros STs derivados do ST32 também podem ser encontrados em linhagens de *S. Infantis*, ainda que em proporções reduzidas. No estudo de García-Soto e colaboradores (2020), entre 30 isolados *S. Infantis* provenientes de frangos na Alemanha, foram encontrados o ST2283 em linhagens isoladas entre 2014 e 2019 e o ST1032 em linhagens isoladas em 1995 e 1996, além do ST32 (GARCÍA-SOTO et al., 2020). Kürekci e colaboradores (2021) detectaram o ST7091 em uma única linhagem desta sorovariedade isolada de frangos em 2017 na Turquia (KÜREKCI et al., 2021).

Portanto, ainda que o MLST não possua uma capacidade adequada para permitir a diferenciação e subtipagem de linhagens de *S. Infantis*, a metodologia demonstra sua capacidade para caracterização de isolados desta sorovariedade devido à elevada dominância do ST32, demonstrando a capacidade da técnica em identificar STs específicos em linhagens desta sorovariedade e reforçando a possibilidade de seu uso como uma alternativa a sorotipagem tradicional (ACHTMAN et al., 2012).

Com o maior acesso às tecnologias de WGS, a análise de CRISPR foi uma das técnicas cuja realização foi facilitada em razão da rápida capacidade de detecção de

sequências de espaçadores em genomas bacterianos sequenciados através do uso de ferramentas online (COUVIN et al., 2018). Deste modo, análises filogenéticas baseadas na presença ou ausência destes espaçadores foram conduzidas e reportadas para diversos microrganismos, incluindo sorovariedades diversas de *Salmonella* (SHARIAT et al., 2013; DENG et al., 2015; ALMEIDA et al., 2017; VILELA et al., 2020b).

No presente estudo, a busca pelos espaçadores foi realizada através dos *assemblies* obtidos pelo WGS e revelou a presença de 35 tipos de espaçadores no CRISPR1 e 26 tipos no CRISPR2 entre as linhagens estudadas. No dendrograma de similaridade gerado para a análise de CRISPR, as linhagens foram agrupadas em 21 CRISPR-tipos e em único grupo com uma similaridade geral  $\geq 80.7\%$  entre todas as linhagens analisadas, com 43 linhagens de *S. Infantis* e a linhagem de referência utilizada consideradas como indistinguíveis perante a metodologia, além apresentar um índice de discriminação de 0,696 (Figura 7).

Estes resultados indicam que a técnica de CRISPR teve um poder de discriminação reduzido para caracterizar as linhagens estudadas. Até o presente momento, nenhum estudo conduzido no Brasil ou em outros países com linhagens de *S. Infantis* utilizou a análise de CRISPR com finalidades de tipagem molecular. No entanto, em razão da presença altamente conservada de espaçadores nesta sorovariedade, três trabalhos encontrados realizaram a busca de espaçadores pelo WGS para o desenvolvimento de esquemas de reação da polimerase em cadeia quantitativa (do inglês, *quantitative polymerase chain reaction*, ou qPCR) para detecção de linhagens de *S. Infantis* (RICHARDS et al. 2020; SHARIAT et al., 2020; DEAVEN et al., 2021). Deste modo, ainda que a análise de CRISPR demonstre um baixo poder discriminatório como metodologia de tipagem molecular em linhagens de *S. Infantis*, a presença altamente conservada dos espaçadores presentes nesta sorovariedade demonstram o potencial desta técnica para fins de detecção, que pode ser facilitada pelo uso do WGS, sendo necessários mais estudos para investigar esta possível função.

Com os avanços obtidos nos últimos anos que permitiram um maior acesso e barateamento de custos em tecnologias de sequenciamento de WGS, diferentes metodologias de tipagem molecular bacteriana puderam ser desenvolvidas visando a detecção, caracterização e vigilância de diferentes patógenos bacterianos (GILMOUR et al., 2013; ALLARD, 2016; TAGINI & GREUB, 2017). Embora poucos estudos conduzidos até o presente momento tenham utilizado estas metodologias para tipar linhagens de *S. Infantis*, estes trabalhos em sua maioria utilizaram o cgMLST e a análise de SNPs para caracterizar



estes isolados (YOKOYAMA et al., 2014; YOKOYAMA et al., 2015; BROWN et al., 2018; ACAR et al., 2019; GYMOESE et al., 2019; ALBA et al., 2020).

No presente estudo, as 80 linhagens estudadas desta sorovariedade também foram analisadas de acordo com estas duas metodologias. Na análise de SNPs, as linhagens foram agrupadas em dois grupos distintos, sendo o grupo SNP-A composto por 20 linhagens e o grupo SNP-B por 56 linhagens (Figura 4). Já pela análise de cgMLST, as linhagens foram agrupadas em três grupos distintos, sendo o grupo cgMLST-A formado por 60 linhagens, o grupo cgMLST-B por 14 e o grupo cgMLST-C por seis linhagens (Figura 6). Similarmente aos dados obtidos pelo PFGE, o cgMLST e a análise de SNPs sugerem a presença de um subtipo prevalente de linhagens *S. Infantis* no Brasil que vem contaminando fontes diversas em diferentes estados do país.

Pela literatura, até o momento, não foram encontrados estudos baseados nas análises de SNPs e cgMLST que tivessem caracterizado linhagens de *S. Infantis* isoladas no Brasil, sendo encontrados apenas trabalhos conduzidos em outros países que apresentam diferentes resultados por estas técnicas (YOKOYAMA et al., 2014; YOKOYAMA et al., 2015; BROWN et al., 2018; ACAR et al., 2019; GYMOESE et al., 2019; ALBA et al., 2020). Nos trabalhos de Yokoyama e colaboradores (2014; 2015), a análise de SNPs revelou a presença de cinco grupos geneticamente distintos em 67 linhagens de *S. Infantis* isoladas entre 1996 e 2015 de humanos, carne de frango e ambientes comerciais no Japão (YOKOYAMA et al., 2014), e ao comparar estes isolados com outras 19 linhagens de *S. Infantis* isoladas de carne de frango em 2011, o grupo também observou que estas também pertenciam a dois dos cinco grupos descritos anteriormente (YOKOYAMA et al., 2015). Brown e colaboradores (2018), em estudo com 34 linhagens de *S. Infantis* isoladas de humanos e uma linhagem de carne de frango isolados entre 2012 e 2015 nos Estados Unidos, reportaram a presença de dois grupos pela análise de SNPs entre todos os isolados analisados, sendo que o maior grupo conteve 32 isolados e exibiu uma elevada similaridade (BROWN et al., 2018). No trabalho de Acar e colaboradores (2019), foi observado que 23 linhagens de *S. Infantis* isoladas de carne de frango na Turquia entre 2012 e 2013 foram alocadas em um grupo com alta correlação genética em comparação com outros 234 genomas de linhagens de *S. Infantis* isoladas de nove países por esta mesma análise (ACAR et al., 2019). Finalmente, Alba e colaboradores (2020) reportaram a presença de nove grupos distintos de linhagens de *S. Infantis* ao comparar 382 linhagens isoladas de fontes diversas em nove países da Europa pela análise de SNPs (ALBA et al., 2020). No estudo de Gymoese e colaboradores (2019),

que comparou 56 linhagens isoladas de humanos na Dinamarca com outras 44 linhagens de outros países, foi observada a formação de oito grupos distintos entre estes isolados pela metodologia de cgMLST, o que demonstra que a metodologia conseguiu diferenciar adequadamente as linhagens estudadas (GYMOESE et al., 2019).

É importante notar que, no presente estudo, todas as metodologias utilizadas apresentaram diferentes capacidades de caracterizar e subtipar as linhagens de *S. Infantis* estudadas. No entanto, principalmente entre o PFGE, cgMLST e a análise de SNPs, pode-se notar que estas metodologias apresentaram resultados concordantes entre si, apesar de utilizarem diferentes abordagens em suas análises. Mesmo apresentando divisões em diferentes quantidades de grupos, as três técnicas puderam demonstrar características em comuns entre algumas das 80 linhagens estudadas nos três dendrogramas obtidos, como a prevalência de linhagens isoladas na região Sul do Brasil em determinados grupos e o agrupamento de linhagens com alta proximidade genotípica isoladas de fontes de humanos ou de animais, por exemplo. Deste modo, os resultados sugerem que estas metodologias apresentam uma boa capacidade para discriminar e caracterizar isolados de *S. Infantis*, sendo, portanto, adequadas e concordantes para uso em estudos de tipagem molecular. As metodologias de PFGE, MLST, cgMLST e as análises de SNPs e CRISPR sugerem a possível presença de um subtipo prevalente de *S. Infantis* circulantes em diferentes fontes de origem clínica e não-clínica e regiões do país. Tais resultados reforçam a importância da investigação e rastreamento de linhagens desta sorovariedade por autoridades de saúde pública e segurança alimentar no Brasil.

Em conjunto os resultados obtidos possibilitaram uma melhor caracterização quanto a diversidade genotípica, potencial patogênico e perfil genotípico e fenotípico de resistência a antimicrobianos de *S. Infantis* isoladas de diversas fontes de origem clínica e não-clínica em diferentes regiões do Brasil. Ademais, estes resultados reforçam o potencial perigo que linhagens de *S. Infantis* de origens diversas possam representar para os âmbitos de saúde pública e segurança alimentar do Brasil.

## 6. CONCLUSÕES

- A alta prevalência de genes cromossômicos de virulência detectados, relacionados à motilidade, invasão celular e sobrevivência em células fagocíticas, reforça o potencial patogênico desta sorovariedade em causar doença em humanos, assim como o risco de sua presença em alimentos, ambiente e fontes veterinárias;
- As altas taxas de linhagens apresentando perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos utilizados na área clínica alertam para o potencial risco de falha terapêutica nas infecções causadas por *S. Infantis* em humanos que requerem tratamento, bem como alertam para o potencial risco de linhagens resistentes em alimentos e no ambiente;
- A técnica de PFGE discriminou adequadamente as linhagens e os resultados sugerem a circulação de um subtipo prevalente de *S. Infantis* em diferentes fontes e regiões do país;
- A presença absoluta do ST32 revelada pelo MLST entre as linhagens estudadas reforça a dominância deste ST na sorovariedade *S. Infantis* em isolados do Brasil e de outros países, demonstrando a capacidade desta técnica em identificar linhagens desta sorovariedade em STs específicos;
- A alta similaridade e a ausência de grupos entre as linhagens estudadas pela análise de CRISPR demonstraram uma baixa capacidade discriminatória desta metodologia para subtipar linhagens de *S. Infantis*;
- As técnicas de cgMLST e análise de SNPs sugerem que a maioria das linhagens de *S. Infantis* estudadas descendem de um subtipo prevalente que tem contaminado humanos, animais, alimentos e ambiente em diferentes locais do Brasil, corroborando os achados de PFGE;
- Os resultados em conjunto reforçam o potencial perigo que linhagens de *S. Infantis* de origem clínica e não-clínica podem representar para os âmbitos de saúde pública e segurança alimentar no Brasil.

## 7. REFERÊNCIAS

ACAR, S.; BULUT, E.; STASIEWICZ, M. J.; SOYER, Y. Genome analysis of antimicrobial resistance, virulence, and plasmid presence in Turkish *Salmonella* serovar Infantis isolates. **International Journal of Food Microbiology**, 307, p. 108275, out. 2019.

ACHTMAN, M.; WAIN, J.; WEILL, F.-X.; NAIR, S. *et al.* Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. **PLOS Pathogens**, 8, n. 6, p. e1002776, 2012.

AGBAJE, M.; BEGUM, R. H.; OYEKUNLE, M. A.; OJO, O. E. *et al.* Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. **Folia Microbiologica**, 56, n. 6, p. 497-503, nov. 2011.

ALBA, P.; LEEKITCHAROENPHON, P.; CARFORA, V.; AMORUSO, R. *et al.* Molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasmid. **Microbial Genomics**, abr. 2020.

ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, 53, n. 10, p. 1565-1574, 2014.

ALLARD, M. W. The Future of Whole-Genome Sequencing for Public Health and the Clinic. **Journal of Clinical Microbiology**, 54, n. 8, p. 1946-1948, ago. 2016.

ALMEIDA, F.; PITONDO-SILVA, A.; OLIVEIRA, M. A.; FALCÃO, J. P. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, 19, p. 145-151, out. 2013.

ALMEIDA, F.; MEDEIROS, M. I. C.; RODRIGUES, D. D. P.; ALLARD, M. W. *et al.* Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium isolated in Brazil by CRISPR-MVLST. **Journal of Microbiological Methods**, 133, p. 55-61, fev. 2017.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de Ação dos Antibacterianos e Mecanismos de Resistência.

In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. p. 79-85.

AMMAR, A. M.; ABDEEN, E. E.; ABO-SHAMA, U. H.; FEKRY, E. *et al.* Molecular characterization of virulence and antibiotic resistance genes among *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. **Letters in Applied Microbiology**, 68, n. 2, p. 188-195, fev. 2019.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? **Journal of Infection Control**, 6, n. 1, p. 16-25, jan./mar. 2017.

ASGHARPOUR, F.; MAHMOUD, S.; MARASHI, A.; MOULANA, Z. Molecular detection of class 1, 2 and 3 integrons and some antimicrobial resistance genes in *Salmonella* Infantis isolates. **Iranian Journal of Microbiology**, 10, n. 2, p. 104-110, 2018.

AVIV, G.; TSYBA, K.; STECK, N.; SALMON-DIVON, M. *et al.* A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella* enterica serovar Infantis strain. **Environmental Microbiology**, 16, n. 4, p. 977-994, abr. 2014.

BHAN, M. K.; BAHL, R.; BHATNAGAR, S. Typhoid and paratyphoid fever. **The Lancet**, 366, n. 9487, p. 749-762, 2005.

BOGOMAZOVA, A. N.; GORDEEVA, V. D.; KRYLOVA, E. V.; SOLTYNSKAYA, I. V. *et al.* Mega-plasmid found worldwide confers multiple antimicrobial resistance in *Salmonella* Infantis of broiler origin in Russia. **International Journal of Food Microbiology**, 319, p. 108497, abr. 2020.

BORTOLAIA, V.; KAAS, R. S.; RUPPE, E.; ROBERTS, M. C. *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 75, n. 12, p. 3491-3500, dez. 2020.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. *et al.* *Salmonella*

Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, 38, n. 7, p. 2465, 2000.

BROWN, A. C.; CHEN, J. C.; WATKINS L. K. F.; CAMPBELL, D. *et al.* CTX-M-65 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Serotype Infantis, United States. **Emerging Infectious Diseases**, 24, n. 12, p. 2284, 2018.

BUZBY, J. C.; ROBERTS, T. The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. **Gastroenterology**, 136, n. 6, p. 1851-1862, mai. 2009.

CAETANO, F.; PAGANO; M. Prevalência de infecções causadas por *Salmonella* sp. no Brasil no período de 2013 a 2017. **Journal of Infection Control**, 8, n. 2, p. 56-62, abr./jun. 2019.

CAMPIONI, F.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. **APMIS**, 122, n. 3, p. 215-222, mar. 2014.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. p. 351-360.

CASTRO, F. A. D.; SANTOS, V. R. D.; MARTINS, C. H. G.; FERNANDES, S. A. *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 6, p. 244-251, 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Symptoms – *Salmonella* Homepage. Atlanta, GA: CDC, 2019a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/salmonella-symptoms.html>. Acesso em: 15 fev. 2021

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: CDC, 2019b.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Salmonella*. Atlanta, GA: CDC, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>. Acesso em: 15 fev. 2021

CHIRONNA, M.; TAFURI, S.; GALLONE, M. S.; SALLUSTIO, A. *et al.* Outbreak of *Salmonella* Infantis gastroenteritis among people who had eaten at a hash house in southern Italy. **Public Health**, 128, n. 5, p. 438-443, mai. 2014.

CHOI, D.; CHON, J. W.; KIM, H. S.; KIM, D. H. *et al.* Incidence, Antimicrobial Resistance, and Molecular Characteristics of Nontyphoidal *Salmonella* Including Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producers in Retail Chicken Meat. **Journal of Food Protection**, 78, n. 11, p. 1932-1937, nov. 2015.

CHRISTENSON, J. C. *Salmonella* infections. **Pediatrics in Review**, 34, n. 9, p. 375-383, set. 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition. **CLSI document M07-A10**. Wayne, PA: CLSI, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **CLSI**, 2019.

COUVIN, D.; BERNHEIM, A.; TOFFANO-NIOCHE, C.; TOUCHON, M. *et al.* CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. **Nucleic Acids Research**, 46, n. W1, p. W246-W251, jul. 2018.

CRIM, S. M.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R.; MARDER, E. P. *et al.* Preliminary incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. sites, 2006-2014. **Morbidity and Mortality**

**Weekly Report**, 64, n. 18, p. 495-499, mai. 2015.

CUNHA-NETO, A. D.; CARVALHO, L. A.; CARVALHO, R. C. T.; DOS PRAZERES RODRIGUES, D. *et al.* *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. **Poultry Science**, 97, n. 4, p. 1373-1381, abr. 2018.

DEAVEN, A. M.; FERREIRA, C. M.; REED, E. A.; CHEN SEE, J. R. *et al.* *Salmonella* genomics and population analyses reveal high inter- and intra- serovar diversity in freshwater. **Applied and Environmental Microbiology**, jan. 2021.

DENG, X.; SHARIAT, N.; DRIEBE, E. M.; ROE, C. C. *et al.* Comparative Analysis of Subtyping Methods against a Whole-Genome-Sequencing Standard for *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. **Journal of Clinical Microbiology**, 53, n. 1, p. 212-218, 2015.

DIEYE, Y.; AMEISS, K.; MELLATA, M.; CURTISS, R. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **BMC Microbiology**, 9, p. 3, jan. 2009.

EAVES, D. J.; RANDALL, L.; GRAY, D. T.; BUCKLEY, A. *et al.* Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48, n. 10, p. 4012-4015, out. 2004.

European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, 17, n. 12, p. e05926, dez. 2019.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, 9, n. 4, p. 430-440, jul. 2009.



FOLSTER, J. P.; GRASS, J. E.; BICKNESE, A.; TAYLOR, J. *et al.* Characterization of Resistance Genes and Plasmids from Outbreaks and Illness Clusters Caused by *Salmonella* Resistant to Ceftriaxone in the United States, 2011-2012. **Microbial Drug Resistance**, 23, n. 2, p. 188-193, mar. 2017.

FONSECA, E. L.; MYKYTCZUK, O. L.; ASENSI, M. D.; REIS, E. M. *et al.* Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, 44, n. 8, p. 2767-2772, ago. 2006.

FRANCO, A.; LEEKITCHAROENPHON, P.; FELTRIN, F.; ALBA, P. *et al.* Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant ESBL-Producing *Salmonella* Infantis Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014. **PLOS One**, 10, n. 12, p. e0144802, 2015.

FUENTES-CASTILLO, D.; FARFÁN-LÓPEZ, M.; ESPOSITO, F.; MOURA, Q. *et al.* Wild owls colonized by international clones of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* Infantis in the Southern Cone of America. **Science of the Total Environment**, 674, p. 554-562, jul. 2019.

GARCÍA-SOTO, S.; ABDEL-GLIL, M. Y.; TOMASO, H.; LINDE, J. *et al.* Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar Infantis of Multilocus Sequence Type 2283 in German Broiler Farms. **Frontiers in Microbiology**, 11, p. 1741, 2020.

GELAW, A. K.; NTHABA, P.; MATLE, I. Detection of *Salmonella* from animal sources in South Africa between 2007 and 2014. **Journal of the South African Veterinary Association**, 89, n. 0, p. e1-e10, nov. 2018.

GILMOUR, M. W.; GRAHAM, M.; REIMER, A.; VAN DOMSELAAR, G. Public health genomics and the new molecular epidemiology of bacterial pathogens. **Public Health Genomics**, 16, n. 1-2, p. 25-30, 2013.

GOSSNER, C. M.; LE HELLO, S.; DE JONG, B.; ROLFHAMRE, P. *et al.* Around the World in 1,475 *Salmonella* Geo-serotypes. **Emerging Infectious Diseases**, 22, n. 7, p. 1298-1302, 2016.

GOUDARZI, M.; AZAD, M.; SEYEDJAVADI, S. S. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants and OqxAB Efflux Pumps among Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Patients with Nosocomial Urinary Tract Infection in Tehran, Iran. **Scientifica**, 2015, p. 518167, 2015.

GUINEY, D. G.; FIERER, J. The Role of the *spv* Genes in *Salmonella* Pathogenesis. **Frontiers in Microbiology**, 2, p. 129, 2011.

GYMOESE, P.; KIIL, K.; TORPDAHL, M.; ØSTERLUND, M. T. *et al.* WGS based study of the population structure of *Salmonella enterica* serovar Infantis. **BMC Genomics**, 20, n. 1, p. 870, nov. 2019.

HAEUSLER, G. M.; CURTIS, N. Non-typhoidal *Salmonella* in children: microbiology, epidemiology and treatment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 764, p. 13-26, 2013.

HARA-KUDO, Y.; KONUMA, H.; KAMATA, Y.; MIYAHARA, M. *et al.* Prevalence of the main food-borne pathogens in retail food under the national food surveillance system in Japan. **Food Additives and Contaminants: Part A**, 30, n. 8, p. 1450-1458, 2013.

HAUSER, E.; TIETZE, E.; HELMUTH, R.; JUNKER, E. *et al.* Clonal dissemination of *Salmonella enterica* serovar Infantis in Germany. **Foodborne Pathogens and Disease**, 9, n. 4, p. 352-360, abr. 2012.

HAVELAAR, A. H.; KIRK, M. D.; TORGERSON, P. R.; GIBB, H. J. *et al.* World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. **PLOS Medicine**, 12, n. 12, p. e1001923, dez. 2015.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal of**

**Antimicrobial Chemotherapy**, 51, p. 29-35, 2003. Sup. S1.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, 107, n. 1, p. 1-8, jan. 2016.

HINDERMANN, D.; GOPINATH, G.; CHASE, H.; NEGRETE, F. *et al.* *Salmonella enterica* serovar Infantis from Food and Human Infections, Switzerland, 2010–2015: Poultry-Related Multidrug Resistant Clones and an Emerging ESBL Producing Clonal Lineage. **Frontiers in Microbiology**, 8, p. 1322, 2017.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. **Science**, 327, n. 5962, p. 167, 2010.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

IKWAP, K.; ERUME, J.; OWINY, D. O.; NASINYAMA, G. W. *et al.* *Salmonella* species in piglets and weaners from Uganda: prevalence, antimicrobial resistance and herd-level risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, 115, n. 1-2, p. 39-47, jul. 2014.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M. *et al.* Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, 165, n. 7, p. 526-530, 2014.

JAGADEESAN, B.; GERNER-SMIDT, P.; ALLARD, M. W.; LEUILLET, S. *et al.* The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. **Food Microbiology**, 79, p. 96-115, jun. 2019.

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

KAAS, R. S.; LEEKITCHAROENPHON, P.; AARESTRUP, F. M.; LUND, O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. **PLOS One**, 9, n. 8, p. e104984, 2014.

KARCZMARCZYK, M.; MARTINS, M.; MCCUSKER, M.; MATTAR, S. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: identification of a *qnrB19*-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. **FEMS Microbiology Letters**, 313, n. 1, p. 10-19, dez. 2010.

KEHRENBURG, C.; FRIEDERICHS, S.; DE JONG, A.; MICHAEL, G. B. *et al.* Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 58, n. 1, p. 18-22, jul. 2006.

KLIMKE, W.; AGARWALA, R.; BADRETDIN, A.; CHETVERNIN, S. *et al.* The National Center for Biotechnology Information's Protein Clusters Database. **Nucleic Acids Research**, 37, n. Database issue, p. D216-223, jan. 2009.

KRZYŻANOWSKI, F.; ZAPPELINI, L.; MARTONE-ROCHA, S.; DROPA, M. *et al.* Quantification and characterization of *Salmonella* spp. isolates in sewage sludge with potential usage in agriculture. **BMC Microbiology**, 14, p. 263, oct. 2014.

KÜREKCI, C.; SAHIN, S.; IWAN, E.; KWIT, R. *et al.* Whole-genome sequence analysis of *Salmonella* Infantis isolated from raw chicken meat samples and insights into pESI-like megaplasmid. **International Journal of Food Microbiology**, 337, p. 108956, jan. 2021.

LARSEN, M. V.; COSENTINO, S.; RASMUSSEN, S.; FRIIS, C. *et al.* Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, 50, n. 4, p. 1355-1361, abr. 2012.

LINDQVIST, N.; PELKONEN, S. Genetic surveillance of endemic bovine *Salmonella* Infantis infection. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 49, p. 15, mai. 2007.

LIU, F.; BARRANGOU, R.; GERNER-SMIDT, P.; RIBOT, E. M. *et al.* Novel Virulence

Gene and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Multilocus Sequence Typing Scheme for Subtyping of the Major Serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, 77, n. 6, p. 1946-1956, jan. 2011.

LIU, Y. Y.; CHIOU, C. S.; CHEN, C. C. PGAdb-builder: A web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing. **Scientific Reports**, 6, p. 36213, nov. 2016.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, 14, n. 9, p. 413-420, set. 2006.

LOMAN, N. J.; PALLEN, M. J. Twenty years of bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Microbiology**, 13, n. 12, p. 787-794, dez. 2015.

MACIEL, B. M.; ARGÔLO FILHO, R. C.; NOGUEIRA, S. S.; DIAS, J. C. *et al.* High prevalence of *Salmonella* in tegu lizards (*Tupinambis meriana*), and susceptibility of the serotypes to antibiotics. **Zoonoses and Public Health**, 57, n. 7-8, p. e26-32, dez. 2010.

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.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 95, n. 6, p. 3140-3145, mar. 1998.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J. *et al.* The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, 50, n. 6, p. 882-889, 2010.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. *Salmonella*

pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, 2, n. 2, p. 145-156, 2000.

MARZEL, A.; DESAI, P. T.; GOREN, A.; SCHORR, Y. I. *et al.* Persistent Infections by Nontyphoidal *Salmonella* in Humans: Epidemiology and Genetics. **Clinical Infectious Diseases**, 62, n. 7, p. 879-886, abr. 2016.

MASARIKOVA, M.; MANGA, I.; CIZEK, A.; DOLEJSKA, M. *et al.* *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012. **Science of the Total Environment**, 542, p. 102-107, jan. 2016.

MAZURKIEWICZ, P.; THOMAS, J.; THOMPSON, J. A.; LIU, M. *et al.* SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. **Molecular Microbiology**, 67, n. 6, p. 1371-1383, 2008.

McDERMOTT, P. F.; ZHAO, S.; TATE, H. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. **Microbiology Spectrum**, 6, n. 4, jul. 2018.

McGINN, S.; GUT, I. G. DNA sequencing - spanning the generations. **New Biotechnology**, 30, n. 4, p. 366-372, mai. 2013.

MEDEIROS, M. A.; OLIVEIRA, D. C.; RODRIGUES, D. O. P.; FREITAS, D. R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 30, n. 6, p. 555-560, dez. 2011.

MEJÍA, L.; MEDINA, J. L.; BAYAS, R.; SALAZAR, C. S. *et al.* Genomic Epidemiology of *Salmonella* Infantis in Ecuador: From Poultry Farms to Human Infections. **Frontiers in Veterinary Science**, 7, p. 547891, 2020.

MERINO, L. A.; RONCONI, M. C.; NAVIA, M. M.; RUIZ, J. *et al.* Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Infantis by different typing methods. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 45, n. 3, p. 119-123, mai./jun. 2003.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, 11, n. 1, p. 31-46, jan. 2010.

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 Transmitidas por Alimentos no Brasil - Informe 2018. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Ministério da Saúde**, mai. 2019.

MONTE, D. F.; LINCOPAN, N.; BERMAN, H.; CERDEIRA, L. *et al.* Genomic Features of High-Priority *Salmonella* enterica Serovars Circulating in the Food Production Chain, Brazil, 2000-2016. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 11058, jul. 2019.

MONTE, D. F.; SELLERA, F. *Salmonella*. **Emerging Infectious Disease**, 26, n. 12, p. 2955, 2020.

MORAES, B. A.; CRAVO, C. A.; LOUREIRO, M. M.; SOLARI, C. A. *et al.* Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a university hospital from Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 42, n. 4, p. 201-207, jul./ago. 2000.

NAKATSUCHI, A.; INAGAKI, M.; SUGIYAMA, M.; USUI, M. *et al.* Association of *Salmonella* Serotypes with Quinolone Resistance in Broilers. **Food Safety (Tokyo)**, 6, n. 4, p. 156-159, dez. 2018.

NODA, T.; MURAKAMI, K.; ISHIGURO, Y.; ASAI, T. Chicken meat is an infection source of *Salmonella* serovar Infantis for humans in Japan. **Foodborne Pathogens and**

**Disease**, 7, n. 6, p. 727-735, jun. 2010.

NÓGRÁDY, N.; GADÓ, I.; TÓTH, A.; PÁSZTI, J. Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26, n. 2, p. 126-132, ago. 2005.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, 37, n. 6, p. 1661-1669, jun. 1999.

OLSEN, A. R.; HAMMACK, T. S. Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. **Journal of Food Protection**, 63, n. 7, p. 958-960, jul. 2000.

OZDEMIR, K.; ACAR, S. Plasmid profile and pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Salmonella enterica* isolates from humans in Turkey. **PLOS One**, 9, n. 5, p. e95976, 2014.

PAIXÃO, T. A.; MALTA, M. C.; SOAVE, S. A.; TINOCO, H. P. *et al.* Hemorrhagic colitis associated with *Salmonella enterica* serotype Infantis infection in a captive western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) in Brazil. **Journal of Medical Primatology**, 43, n. 2, p. 118-121, abr. 2014.

PAPADOPOULOS, T.; PETRIDOU, E.; ZDRAGAS, A.; MANDILARA, G. *et al.* Multiple clones and low antimicrobial resistance rates for *Salmonella enterica* serovar Infantis populations in Greece. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 51, p. 54-58, abr. 2017.

PARK, C. H.; ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; SAHM, D. *et al.* Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50, n. 11, p. 3953-3955, 2006.

PESSOA-SILVA, C. L.; TOSCANO, C. M.; MOREIRA, B. M.; SANTOS, A. L. *et al.* Infection due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Infantis in a neonatal unit. **The Journal of Pediatrics**, 141, n. 3, p. 381-



387, set. 2002.

POULIKAKOS, P.; FALAGAS, M. E. Aminoglycoside therapy in infectious diseases. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 14, n. 12, p. 1585-1597, ago. 2013.

PÉREZ-LOSADA, M.; ARENAS, M.; CASTRO-NALLAR, E. Microbial sequence typing in the genomic era. **Infection, Genetics and Evolution**, 63, p. 346-359, set. 2018.

RAHMANI, M.; PEIGHAMBARI, S. M.; SVENDSEN, C. A.; CAVACO, L. M. *et al.* Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. **BMC Veterinary Research**, 9, p. 66, abr. 2013.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, 13, n. 6, p. 151-171, dez. 2010.

RANJBAR, R.; AHMADI, M.; MEMARIANI, M. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for genotyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Infantis isolated from human sources. **Microbial Pathogenesis**, 100, p. 299-304, nov. 2016.

RANJBAR, R.; RAHMATI, H.; SHOKOOHIZADEH, L. Detection of common clones of *Salmonella enterica* serotype Infantis from human sources in Tehran hospitals. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, 11, n. 1, p. 54-59, Winter 2018.

RAVI, R. K.; WALTON, K.; KHOSROHEIDARI, M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. **Methods in Molecular Biology**, 1706, p. 223-232, 2018.

REALPE-QUINTERO, M.; BARBA-LEÓN, J.; PÉREZ-MONTAÑO, J. A.; PACHECO-GALLARDO, C. *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes recovered throughout the beef production chain and from patients with salmonellosis. **PeerJ**, 6, p. e5482, 2018.

REEVES, P. Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. **Trends in Genetics**, 9, n. 1, p. 17-22, jan. 1993.

RIBEIRO-GONÇALVES, B.; FRANCISCO, A. P.; VAZ, C.; RAMIREZ, M. *et al.* PHYLOViZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. **Nucleic Acids Research**, 44, n. W1, p. W246-251, jul. 2016.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N. *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**, 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

RICHARDS, A. K.; HOPKINS, B. A.; SHARIAT, N. W. Conserved CRISPR arrays in *Salmonella enterica* serovar Infantis can serve as qPCR targets to detect Infantis in mixed serovar populations. **Letters in Applied Microbiology**, 71, n. 2, p. 138-145, ago. 2020.

ROBERTS, M. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Reviews**, 19, n. 1, p. 1-24, out. 1996.

RONHOLM, J.; NASHERI, N.; PETRONELLA, N.; PAGOTTO, F. Navigating Microbiological Food Safety in the Era of Whole-Genome Sequencing. **Clinical Microbiology Reviews**, 29, n. 4, p. 837-857, out. 2016.

ROWLANDS, R. E. G.; RISTORI, C. A.; IKUNO, A. A.; BARBOSA, M. L. *et al.* Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 56, n. 6, p. 461-467, nov./dec. 2014.

RYAN, M. P.; O'DWYER, J.; ADLEY, C. C. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. **BioMed Research International**, 2017, p. 3782182, 2017.

RYCHLIK, I.; KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; VOLF, J. *et al.* Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology**, 9, p. 268, dez. 2009.

SACHSE, K.; MOEBIUS, P. Molecular typing tools: from pattern recognition to genome-based algorithms. **Methods in Molecular Biology**, 1247, p. 287-310, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **The Quarterly Review of Biology**, 76, n. 3, p. 348-349, 2001.

SCHNAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of Microbiology**, 165, n. 6, p. 359-369, jun. 1996.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, 37, n. 1, p. 67-75, mai. 1984.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, 28, n. 5, p. 519-542, nov. 2004.

SEVER, N. K.; AKAN, M. Molecular analysis of virulence genes of *Salmonella* Infantis isolated from chickens and turkeys. **Microbial Pathogenesis**, 126, p. 199-204, jan. 2019.

SHAH, D. H.; ZHOU, X.; ADDWEBI, T.; DAVIS, M. A. *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 (Reading, England)**, 157, n. Pt 5, p. 1428-1445, 2011.

SHAHADA, F.; SUGIYAMA, H.; CHUMA, T.; SUEYOSHI, M. *et al.* Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of beta-lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. **Veterinary Microbiology**, 140, n. 1-2, p. 136-141, jan. 2010.

SHAHADA, F.; CHUMA, T.; KOSUGI, G.; KUSUMOTO, M. *et al.* Distribution of extended-spectrum cephalosporin resistance determinants in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan. **Poultry Science**, 92, n. 6, p. 1641-1649, jun. 2013.

SHARIAT, N.; KIRCHNER, M. K.; SANDT, C. H.; TREES, E. *et al.* Subtyping of *Salmonella enterica* Serovar Newport Outbreak Isolates by CRISPR-MVLST and Determination of the Relationship between CRISPR-MVLST and PFGE Results. **Journal of Clinical Microbiology**, 51, n. 7, p. 2328-2336, 2013.

SHARIAT, N. W.; FEYE, K. M.; RICHARDS, A. K.; BOOHER, B. *et al.* Incidence of *Salmonella* serovars isolated from commercial animal feed mills in the United States and serovar identification using CRISPR analysis. **Journal of Applied Microbiology**, nov. 2020.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, 163, p. 688, abr. 1949.

SKÖLD, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. **Veterinary Research**, 32, n. 3-4, p. 261-273, mai./ago. 2001.

SODAGARI, H. R.; MOHAMMED, A. B.; WANG, P.; O'DEA, M. *et al.* Non-typhoidal *Salmonella* contamination in egg shells and contents from retail in Western Australia: Serovar diversity, multilocus sequence types, and phenotypic and genomic characterizations of antimicrobial resistance. **International Journal of Food Microbiology**, 308, p. 108305, nov. 2019.

SOREK, R.; LAWRENCE, C. M.; WIEDENHEFT, B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. **Annual Review of Biochemistry**, 82, p. 237-266, 2013.

SOUVOROV, A.; AGARWALA, R.; LIPMAN, D. J. SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. **Genome Biology**, 19, n. 1, p. 153, out. 2018.

SZMOLKA, A.; SZABÓ, M.; KISS, J.; PÁSZTI, J. *et al.* Molecular epidemiology of the

endemic multiresistance plasmid pSI54/04 of *Salmonella* Infantis in broiler and human population in Hungary. **Food Microbiology**, 71, p. 25-31, mai. 2018.

TAGINI, F.; GREUB, G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 36, n. 11, p. 2007-2020, nov. 2017.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M. P.; KUCHENMÜLLER, T.; SCHLUNDT, J. *et al.* Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, 139 Suppl 1, p. S16-28, mai. 2010.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, 33, n. 9, p. 2233-2239, sep. 1995.

THAI, T. H.; HIRAI, T.; LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, 156, n. 2, p. 147-151, mai. 2012.

TOUCHON, M.; ROCHA, E. P. C. The Small, Slow and Specialized CRISPR and Anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. **PLOS One**, 5, n. 6, p. e11126, 2010.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S. *et al.* Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology and Infection**, 125, n. 2, p. 229-255, 2000.

VAN DIJK, E. L.; AUGER, H.; JASZCZYSZYN, Y.; THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, 30, n. 9, p. 418-426, set. 2014.

VELHNER, M.; KOZODEROVIĆ, G.; GREGO, E.; GALIĆ, N. *et al.* Clonal spread of *Salmonella enterica* serovar Infantis in Serbia: acquisition of mutations in the topoisomerase genes *gyrA* and *parC* leads to increased resistance to fluoroquinolones. **Zoonoses and Public Health**, 61, n. 5, p. 364-370, ago. 2014.

VILELA, F. P.; GOMES, C. N.; PASSAGLIA, J.; RODRIGUES, D. P. *et al.* Genotypic Resistance to Quinolone and Tetracycline in *Salmonella* Dublin Strains Isolated from Humans and Animals in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, 25, n. 2, p. 143-151, mar. 2019.

VILELA, F. P.; FALCÃO, J. P.; CAMPIONI, F. Analysis of Resistance Gene Prevalence in Whole-Genome Sequenced *Enterobacterales* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, 26, n. 6, p. 594-604, jun. 2020a.

VILELA, F. P.; DOS PRAZERES RODRIGUES, D.; COSTA, R. G.; CASAS, M. R. T. *et al.* High similarity and high frequency of virulence genes among *Salmonella* Dublin strains isolated over a 33-year period in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 51, n. 2, p. 497-509, nov. 2020b.

VINUEZA-BURGOS, C.; CEVALLOS, M.; RON-GARRIDO, L.; BERTRAND, S. *et al.* Prevalence and Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter Age. **PLOS One**, 11, n. 7, p. e0159567, 2016.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A. *et al.* A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, 94, n. 3, p. 433-441, mar. 2015.

WAJID, M.; SALEEMI, M. K.; SARWAR, Y.; ALI, A. Detection and characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis as an emerging threat in poultry farms of Faisalabad, Pakistan. **Journal of Applied Microbiology**, 127, n. 1, p. 248-261, jul. 2019.

WEGENER, H. C.; BAGGESEN, D. L. Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Infantis by use of pulsed field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, 32, n. 1, p. 125-131, set. 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Salmonella* (non-typhoidal) - Fact Sheet. WHO, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 15 fev. 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Food Safety – Fact Sheet. WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 15 fev. 2021

WOZNIAK, C. E.; CHEVANCE, F. F.; HUGHES, K. T. Multiple promoters contribute to swarming and the coordination of transcription with flagellar assembly in *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, 192, n. 18, p. 4752-4762, sep. 2010.

XIONG, W.; SUN, Y.; ZENG, Z. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. **Environmental Science and Pollution Research**, 25, n. 19, p. 18377-18384, jul. 2018.

YOKOYAMA, E.; MURAKAMI, K.; SHIWA, Y.; ISHIGE, T. *et al.* Phylogenetic and population genetic analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis strains isolated in Japan using whole genome sequence data. **Infection, Genetics and Evolution**, 27, p. 62-68, out. 2014.

YOKOYAMA, E.; ANDO, N.; OHTA, T.; KANADA, A. *et al.* A novel subpopulation of *Salmonella enterica* serovar Infantis strains isolated from broiler chicken organs other than the gastrointestinal tract. **Veterinary Microbiology**, 175, n. 2-4, p. 312-318, feb. 2015.

**Apêndice A** - Perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos das 80 linhagens estudadas de *Salmonella* Infantis, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.

<b>Linhagem</b>	<b>Estado</b>	<b>Material de isolamento</b>	<b>Fonte</b>	<b>Perfis fenotípicos de resistência</b>	<b>Perfis de genotípicos de resistência*<sup>1</sup></b>
1348/13	PR	Fezes	HU	KZ, CRO(i), CTX, CAZ, NA(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
2385/13	PR	Soja	AL	S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
2950/13	AL	Fezes	HU	KZ, S(i), NA(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
2951/13	AL	Fezes	HU	S(i), NA(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
3156/13	SC	Propé	AMB	AMP, PRL, KZ, CTX(i), S(i)	<i>aac(6')-Iaa, aadA12, bla<sub>TEM-1</sub></i>
5025/13	SC	Fezes	HU	S(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
124/14* <sup>2</sup>	RS	Fezes de suíno	AL	AMP, PRL(i), AMC, KZ, FOZ, CRO, CTX, CAZ, S(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CMY-2</sub></i>
210/14	SC	Swab de arrasto	AMB	AMP, PRL, KZ(i), CRO(i), CTX(i), S(i), TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
212/14	SC	Swab de arrasto	AMB	AMP, PRL, KZ(i), S(i), TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, aadA12, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
388/14	SP	Farelo de soja	RA	PRL(i), S(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
583/14	SC	Carcaça de frango	AL	AMP, PRL(i), KZ(i), S(i), TET, NA(i), CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
584/14	SC	Massa contendo presunto	AL	AMP, PRL, KZ, IPM, S, TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
677/14	SC	Chiffonette de carcaça	AL	AMP, PRL, KZ(i), CTX(i), CAZ(i), S(i), NA(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub></i>
723/14	SC	Swab de arrasto	AMB	KZ(i), CTX(i), FEP(i), IPM(i), S(i), NA(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
982/14	RS	Fezes de frango	AL	AMP, PRL, AMC, KZ, FOX, CRO, CTX, CAZ, FEP(i), S(i), NA(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CMY-2</sub></i>
1143/14	RS	Fezes de frango	AL	AMP, PRL, AMC, KZ, FOX, CRO, CTX, CAZ, NA(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CMY-2</sub></i>
1284/14	SC	Swab de arrasto	AMB	AMP, PRL, KZ(i), S(i), TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
1380/14	RS	Fezes de frango	AL	AMP, AMC, KZ, FOX, CRO, CTX, CAZ, S(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CMY-2</sub>, bla<sub>CMY-61</sub></i>

Continua



<b>Linhagem</b>	<b>Estado</b>	<b>Material de isolamento</b>	<b>Fonte</b>	<b>Perfis fenotípicos de resistência</b>	<b>Perfis de genotípicos de resistência*<sup>1</sup></b>
<b>1408/14</b>	RS	Fezes	HU	KZ, FOX, CRO, CTX, FEP, S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>1409/14</b>	RS	Fezes	HU	KZ, FOX, CRO, CTX, FEP, S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>1441/14</b>	RS	Maionese	AL	KZ(i), S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>1711/14</b>	RS	Fezes de frango	AL	AMP, AMC, KZ(i), FEP(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CMY-2</sub></i>
<b>2378/14</b>	SC	Swab de caminhão	AMB	AMP, PRL(i), KZ, FOX, CRO, CTX, CAZ, S(i), TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>2430/14</b>	SC	Linguixa mista	AL	AMP, PRL(i), S(i), TET, NA(i), CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>2461/14</b>	SC	Carcaça de frango	AL	AMP, PRL, S(i), TET, NA(i), CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>CTX-M-8</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>2463/14</b>	SC	Carcaça de frango	AL	AMP, PRL, TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>CTX-M-8</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>2548/14</b>	RS	Fezes de frango	AL	AMP, PRL(i), AMC(i), KZ(i), S(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CMY-2</sub></i>
<b>3836/14</b>	RS	Swab de arrasto	AMB	S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>4882/14</b>	MG	Carcaça de frango	AL	AMP, PRL, AMC(i), KZ, CRO, CTX, FEP(i), S(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CTX-M-8</sub></i>
<b>4892/14</b>	MG	Asa de frango	AL	AMP, PRL, KZ, CRO, CTX, FEP, S(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CTX-M-8</sub></i>
<b>4895/14</b>	MG	Carcaça de frango	AL	AMP, PRL, KZ, CRO, CTX, FEP, S(i), AK(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>4901/14</b>	MG	Focinho suíno	AL	AMP, PRL, KZ, CRO, CTX, FEP	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CTX-M-8</sub></i>
<b>5247/14</b>	MG	Coxa e sobrecoxa de frango	AL	AMP, PRL, KZ, CTX, FEP(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CTX-M-8</sub></i>
<b>342/15</b>	SC	Coração suíno	AL	AMP, PRL, KZ(i), CTX, S(i), TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>444/15</b>	SC	Filé suíno	AL	AMP, PRL, CTX(i), TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>447/15</b>	SC	Copa suína	AL	AMP, PRL, AMC(i), KZ(i), CTX(i), TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>1809/15</b>	SC	Farinha de carne	RA	AMP, PRL, KZ(i), CTX(i), S(i), TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>

Continua

<b>Linhagem</b>	<b>Estado</b>	<b>Material de isolamento</b>	<b>Fonte</b>	<b>Perfis fenotípicos de resistência</b>	<b>Perfis de genotípicos de resistência*<sup>1</sup></b>
<b>1816/15</b>	SC	Farinha de víceras	RA	AMP, PRL, KZ(i), CTX(i), S(i), TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>2280/15</b>	SC	Carcaça de frango	AL	AMP, PRL, KZ(i), CTX(i), S(i), TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>2302/15</b>	SC	<i>Chiffonette</i>	AMB	CTX(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>2370/15</b>	SC	<i>Chiffonette</i> de carcaça	AL	CTX(i), S(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>2869/15</b>	MG	Sobrecoxa de frango	AL	KZ(i), CTX, S(i), AK(i), NA, CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>3056/15</b>	MG	Carcaça de frango	AL	AMP, PRL, KZ, CRO, CTX, CAZ(i), FEP	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CTX-M-8</sub></i>
<b>4764/15</b>	SC	<i>Chiffonette</i>	AMB	AMP, PRL, KZ(i), CTX, CAZ(i), S(i), TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>5391/15</b>	SC	Propé	AMB	AMP, PRL, AMC, KZ, FOX, CRO, CTX, CAZ	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CMY-2</sub></i>
<b>5837/15</b>	SC	Propé	AMB	-	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>5853/15</b>	SC	Propé	AMB	-	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>5859/15</b>	SC	Propé	AMB	CTX, CAZ, S(i), AK, CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>5911/15</b>	SC	<i>Chiffonette</i>	AMB	AMP, PRL, KZ(i), S(i), TET, SXT(i), CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>5912/15</b>	SC	<i>Chiffonette</i>	AMB	AMP, PRL, TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>5915/15</b>	SC	<i>Chiffonette</i>	AMB	AMP, PRL, TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>5923/15</b>	SC	<i>Chiffonette</i>	AMB	AMP, PRL, TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>220/16</b>	SC	<i>Chiffonette</i>	AMB	AMP, PRL, KZ(i), S(i), TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>3687/16</b>	SC	Carcaça de frango	AL	AMP, PRL, KZ(i), CTX(i), FEP(i), TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>4447/16</b>	SC	Linguiça suína	AL	AMP, PRL, KZ(i), CTX(i), CAZ(i), IPM(i), S(i), TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>5946/16</b>	SC	Costelinha Suína	AL	AMP, PRL, KZ(i), TET, SXT(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>6987/16</b>	MA	Fezes	HU	AMP, PRL, KZ(i), S(i), AK(i), SXT, CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, dfrA8, sul2</i>

Continua

<b>Linhagem</b>	<b>Estado</b>	<b>Material de isolamento</b>	<b>Fonte</b>	<b>Perfis fenotípicos de resistência</b>	<b>Perfis de genotípicos de resistência*<sup>1</sup></b>
<b>7876/16</b>	RS	Fezes	HU	AMP, PRL, KZ, CRO, CTX, FEP, TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>CTX-M-8</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>11/17</b>	PR	Swab de arrasto	AMB	S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>23/17</b>	PR	Swab de arrasto	AMB	S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>238/17</b>	PR	Swab de arrasto	AMB	-	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>872/17</b>	MG	Carcaça de frango	AL	IPM(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>1171/17</b>	SP	Solo	AMB	CTX(i), S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>1256/17</b>	SP	Solo	AMB	-	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>2580/17*<sup>3</sup></b>	SC	Fezes	HU	S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>2953/17</b>	GO	Swab fecal	HU	-	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>2954/17</b>	GO	Swab fecal	HU	KZ(i), S(i), CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>3380/17</b>	GO	Swab fecal	HU	S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>3877/17</b>	MG	Asa de frango	AL	CTX(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>3906/17</b>	SP	Resíduo de peneira	AMB	AMP, PRL, KZ(i), CTX, CAZ, FEP(i), S(i), TET, SXT(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>4065/17</b>	PR	Fezes	HU	AMP, PRL, KZ(i), S(i), TET, C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>4067/17</b>	PR	Fezes	HU	AMP, PRL, S, TET, CIP(i), C	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>TEM-1</sub>, floR, dfrA8, tet(A)</i>
<b>4069/17</b>	PR	Sangue	HU	S(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>52/18</b>	MG	Carcaça de frango	AL	AMP, PRL, KZ, FOX, CTX, FEP	<i>aac(6')-Iaa, bla<sub>CTX-M-8</sub></i>
<b>331/18</b>	GO	Swab fecal	HU	-	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>623/18</b>	SC	Fezes	HU	-	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>661/18</b>	MS	Fezes	HU	-	<i>aac(6')-Iaa</i>

Continua

<b>Linhagem</b>	<b>Estado</b>	<b>Material de isolamento</b>	<b>Fonte</b>	<b>Perfis fenotípicos de resistência</b>	<b>Perfis de genotípicos de resistência*<sup>1</sup></b>
<b>942/18</b>	RS	Swab fecal	HU	AMP, PRL, KZ(i), CTX(i), S(i), TET	<i>aac(6')-Iaa</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>floR</i> , <i>dfrA8</i> , <i>tet(A)</i>
<b>1634/18</b>	SC	Carne de peixe olhete	AL	CIP(i)	<i>aac(6')-Iaa</i>
<b>2676/18</b>	GO	Matriz avícola de reprodução	AL	AMP, PRL, AMC, KZ, FOX, CRO, CAZ, CTX	<i>aac(6')-Iaa</i> , <i>bla<sub>CMY-2</sub></i>

Alagoas, AL; Goiás, GO; Maranhão, MA; Mato Grosso do Sul, MS; Minas Gerais, MG; Paraná, PR; Rio Grande do Sul, RS; Santa Catarina, SC; São Paulo, SP.

*Chiffonette*: material similar a um tecido de limpeza sintético, utilizado na indústria alimentícia e granjas para coleta de material para cultura microbiana.

(i), perfil intermediário de resistência.

AMC, Amoxicilina-ácido clavulânico; AMP, Ampicilina; AK, Amicacina; C, Cloranfenicol; CAZ, Ceftazidime; CIP, Ciprofloxacina; CN, Gentamicina; CRO, Ceftriaxona; CTX, Cefotaxime; FEP, Cefepime; FOX, Cefotaxime; IPM, Imipenem; KZ, Cefazolina; NA, Ácido nalidíxico; PRL, Piperacilina; S, Estreptomicina; SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; TE, Tetraciclina.

\*<sup>1</sup> Todas as linhagens estudadas apresentaram mutações pontuais nos seguintes genes: *gyrB* (Gln624-Lys), *parC* (Thr57-Ser e Thr255-Ser).

\*<sup>2</sup> A linhagem 124/14 apresentou adicionalmente uma mutação pontual no gene *pmrA* (Asp28-Tyr).

\*<sup>3</sup> A linhagem 2580/17 apresentou adicionalmente uma mutação pontual no gene *parC* (Val702-Ala).

**Apêndice B** - Dados dos *assemblies* gerados pelo sequenciamento do genoma completo das 80 linhagens de *Salmonella* *Infantis* estudadas, isoladas de alimentos (n=27), ambiente (n=24), humanos (n=19), animais (n=7) e ração animal (n=3) entre 2013 e 2018 no Brasil.

<b>Linhagem</b>	<b>N° CFSAN</b>	<b>N° de acesso do GenBank</b>	<b>N° de Contigs</b>	<b>Tamanho (Mb)</b>	<b>Cobertura</b>
1348/13	CFSAN107127	<a href="#">AAWRHH000000000.1</a>	30	4.685.354	72X
2385/13	CFSAN107129	<a href="#">AAWRGU000000000.1</a>	39	4.639.975	35X
2950/13	CFSAN107130	<a href="#">AAWRHS000000000.1</a>	37	4.694.965	62X
2951/13	CFSAN107131	<a href="#">AAWRHN000000000.1</a>	35	4.619.292	75X
3156/13	CFSAN107132	<a href="#">AAWRGH000000000.1</a>	57	4.849.812	82X
5025/13	CFSAN107133	<a href="#">AAWRGA000000000.1</a>	45	4.730.564	59X
124/14	CFSAN107134	<a href="#">AAWRDW000000000.1</a>	67	4.796.946	43X
210/14	CFSAN107136	<a href="#">AAWREM000000000.1</a>	60	4.745.933	34X
212/14	CFSAN107137	<a href="#">AAWRDZ000000000.1</a>	66	4.887.562	88X
388/14	CFSAN107138	<a href="#">AAWRER000000000.1</a>	31	4.756.799	58X
583/14	CFSAN107139	<a href="#">AAWREP000000000.1</a>	53	4.785.260	66X
584/14	CFSAN107140	<a href="#">AAWREX000000000.1</a>	51	4.761.334	50X
677/14	CFSAN107141	<a href="#">AAWRFG000000000.1</a>	53	4.785.741	35X
723/14	CFSAN107142	<a href="#">AAWRFD000000000.1</a>	47	4.739.027	60X
982/14	CFSAN107143	<a href="#">AAWRHV000000000.1</a>	67	4.843.644	55X
1143/14	CFSAN107144	<a href="#">AAWRHU000000000.1</a>	45	4.935.012	108X
1284/14	CFSAN107145	<a href="#">AAWRIM000000000.1</a>	60	4.839.954	68X
1380/14	CFSAN107146	<a href="#">AAWRIF000000000.1</a>	48	4.747.908	52X
1408/14	CFSAN107148	<a href="#">AAWRIL000000000.1</a>	31	4.639.197	66X
1409/14	CFSAN107149	<a href="#">AAWRHF000000000.1</a>	34	4.624.103	52X
1441/14	CFSAN107150	<a href="#">AAWRHL000000000.1</a>	32	4.696.002	66X
1711/14	CFSAN107151	<a href="#">AAYKFJ000000000.1</a>	96	5.114.771	119X
2378/14	CFSAN107152	<a href="#">AAWRHR000000000.1</a>	70	4.879.261	89X
2430/14	CFSAN107153	<a href="#">AAWRHO000000000.1</a>	56	4.884.337	73X
2461/14	CFSAN107154	<a href="#">AAWRGI000000000.1</a>	65	4.883.413	68X
2463/14	CFSAN107155	<a href="#">AAYKFK000000000.1</a>	68	4.914.689	77X
2548/14	CFSAN107156	<a href="#">AAWRDS000000000.1</a>	42	4.920.125	96X
3836/14	CFSAN107160	<a href="#">AAXBHC000000000.1</a>	33	4.757.086	86X
4882/14	CFSAN107164	<a href="#">AAXBHW000000000.1</a>	61	4.896.419	173X
4892/14	CFSAN107165	<a href="#">AAXAKM000000000.1</a>	62	4.834.947	133X
4895/14	CFSAN107166	<a href="#">AAXAKH000000000.1</a>	51	4.758.951	79X
4901/14	CFSAN107167	<a href="#">AAXAKN000000000.1</a>	60	4.812.020	95X
5247/14	CFSAN107168	<a href="#">AAXAKJ000000000.1</a>	67	4.785.236	88X
342/15	CFSAN107171	<a href="#">AAXHSY000000000.1</a>	83	4.877.593	111X
444/15	CFSAN107172	<a href="#">AAXHRH000000000.1</a>	78	4.841.826	97X
447/15	CFSAN107173	<a href="#">AAXHRI000000000.1</a>	87	4.948.504	121X
1809/15	CFSAN107179	<a href="#">AAXHSE000000000.1</a>	70	4.854.355	118X
1816/15	CFSAN107180	<a href="#">AAXHVG000000000.1</a>	90	4.813.298	79X
2280/15	CFSAN107182	<a href="#">AAXHUK000000000.1</a>	78	4.868.375	85X

Continua

<b>Linhagem</b>	<b>N° CFSAN</b>	<b>N° de acesso do GenBank</b>	<b>N° de Contigs</b>	<b>Tamanho (Mb)</b>	<b>Cobertura</b>
2302/15	CFSAN107183	<a href="#">AAXHUC000000000.1</a>	52	4.676.437	84X
2370/15	CFSAN107185	<a href="#">AAXHUH000000000.1</a>	58	4.703.025	77X
2869/15	CFSAN107190	<a href="#">AAXHUP000000000.1</a>	35	4.684.214	70X
3056/15	CFSAN107193	<a href="#">AAXHUI000000000.1</a>	57	4.842.379	97X
4764/15	CFSAN107197	<a href="#">AAXHVV000000000.1</a>	73	4.809.343	54X
5391/15	CFSAN107200	<a href="#">AAXHUD000000000.1</a>	52	4.816.351	79X
5837/15	CFSAN107201	<a href="#">AAXHTN000000000.1</a>	53	4.682.394	72X
5853/15	CFSAN107202	<a href="#">AAXJLL000000000.1</a>	31	4.646.034	36X
5859/15	CFSAN107203	<a href="#">AAXHWB000000000.1</a>	34	4.826.566	89X
5911/15	CFSAN107204	<a href="#">AAXHVK000000000.1</a>	56	4.785.749	64X
5912/15	CFSAN107205	<a href="#">AAYKGL000000000.1</a>	60	5.039.845	161X
5915/15	CFSAN107206	<a href="#">AAYKGJ000000000.1</a>	60	5.048.568	141X
5923/15	CFSAN107207	<a href="#">AAYKGQ000000000.1</a>	58	5.084.316	185X
220/16	CFSAN107212	<a href="#">AAYKGB000000000.1</a>	91	4.808.674	83X
3687/16	CFSAN107222	<a href="#">AAYKGA000000000.1</a>	73	5.193.987	206X
4447/16	CFSAN107224	<a href="#">AAYKGC000000000.1</a>	60	4.741.274	44X
5946/16	CFSAN107226	<a href="#">AAYAAA000000000.1</a>	71	4.781.146	89X
6987/16	CFSAN107229	<a href="#">AAYAIC000000000.1</a>	49	4.849.107	99X
7876/16	CFSAN107233	<a href="#">AAYAFO000000000.1</a>	94	4.961.253	109X
11/17	CFSAN107235	<a href="#">AAYARD000000000.1</a>	51	4.712.369	127X
23/17	CFSAN107237	<a href="#">AAYAFK000000000.1</a>	52	4.696.020	94X
238/17	CFSAN107238	<a href="#">AAYAFN000000000.1</a>	48	4.762.239	96X
872/17	CFSAN107239	<a href="#">AAYAFR000000000.1</a>	37	4.641.528	61X
1171/17	CFSAN107242	<a href="#">AAYAFL000000000.1</a>	52	4.596.651	49X
1256/17	CFSAN107243	<a href="#">AAYAFP000000000.1</a>	54	4.580.506	39X
2580/17	CFSAN107259	<a href="#">AAYKFO000000000.1</a>	72	4.866.248	140X
2953/17	CFSAN107261	<a href="#">AAYKFZ000000000.1</a>	39	4.843.782	126X
2954/17	CFSAN107262	<a href="#">AAYKFE000000000.1</a>	38	4.916.543	223X
3380/17	CFSAN107263	<a href="#">AAYKFP000000000.1</a>	51	4.691.340	112X
3877/17	CFSAN107264	<a href="#">AAYKFX000000000.1</a>	38	4.958.292	205X
3906/17	CFSAN107265	<a href="#">AAYKFS000000000.1</a>	59	4.695.925	57X
4065/17	CFSAN107266	<a href="#">AAYKFR000000000.1</a>	60	4.845.749	102X
4067/17	CFSAN107267	<a href="#">AAYKGD000000000.1</a>	84	5.080.992	296X
4069/17	CFSAN107268	<a href="#">AAYKFD000000000.1</a>	39	4.692.193	95X
52/18	CFSAN107270	<a href="#">AAYKFI000000000.1</a>	48	4.767.821	96X
331/18	CFSAN107273	<a href="#">AAYKFT000000000.1</a>	57	4.586.964	86X
623/18	CFSAN107279	<a href="#">AAYKFY000000000.1</a>	82	4.604.903	52X
661/18	CFSAN107280	<a href="#">AAYKFW000000000.1</a>	52	4.596.946	47X
942/18	CFSAN107281	<a href="#">AAYKFM000000000.1</a>	68	4.981.050	128X
1634/18	CFSAN107284	<a href="#">AAYKFQ000000000.1</a>	35	4.641.031	84X
2676/18	CFSAN107285	<a href="#">AAYKFF000000000.1</a>	56	4.803.122	84X