

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Leandro Leão Faúla

**BIODIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Salmonella* spp. ISOLADAS
DE ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS
POR ALIMENTOS (DTA) EM MINAS GERAIS/BRASIL**

Belo Horizonte

2021

Leandro Leão Faúla

**BIODIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Salmonella* spp. ISOLADAS
DE ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS
POR ALIMENTOS (DTA) EM MINAS GERAIS/BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal. Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Coorientadora: Jovita Eugênia Gazinelli da Cruz Madeira

Coorientador: Marcelo Resende de Souza

Belo Horizonte

2021

F261b Faula, Leandro Leao, 1980 -
Biodiversidade fenotípica e genotípica de Salmonella spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil/ Leandro Leao Faula. - 2021.
153 f.:il

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Coorientadores: Jovita Eugênia Gazinelli da Cruz Madeira
Marcelo Resende de Souza.

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Bibliografias: f. 34 – 45; f. 67 - 74; f. 100 – 112; f. 139 - 146.

1. Alimentos – Contaminação - Teses – 2. Salmonella – Teses - 3. Ciência animal – Teses – I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho – II. Madeira, Jovita Eugênia Gazinelli da Cruz – III. Souza, Marcelo Resende de – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária V. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO**LEANDRO LEÃO FAÚLA**

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 05 de abril de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Fernando Nogueira de Souza

Dr.(a). Cláudia Freire de Andrade Moraes Penna

Dr.(a). Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro

Dr.(a). Elisa Helena Paz Andrade



Documento assinado eletronicamente por Monica Maria Oliveira Pinho Cerqueira, Presidente de comissão, em 05/04/2021, às 18:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro, Usuário Externo, em 06/04/2021, às 13:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fernando Nogueira de Souza, Usuário Externo, em 06/04/2021, às 13:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Elisa Helena Paz Andrade, Membro de comissão, em 06/04/2021, às 14:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Claudia Freire de Andrade Moraes Penna, Coordenador(a) de curso, em 08/04/2021, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0645670 e o código CRC 6FCEB774.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por reiteradamente, conceder-me oportunidade de aprender;

Aos meus queridos pais, irmãos e familiares pelo suporte e amor incondicional;

Ao Fernando pelo encorajamento e acolhimento nos momentos difíceis e nas incertezas;

Às professoras Mônica e Jovita e ao professor Marcelo pelo respeito, confiança, e generosidade e preciosos ensinamentos dedicados durante esta jornada, muitas vezes, marcada pelo imprevisto, mas também de aprazíveis frutos;

Aos membros da banca examinadora, professoras Cláudia, Clarice e Elisa e ao professor Fernando pelas relevantes considerações durante a avaliação desta Tese;

A colega Glaucia pela transmissão de seus conhecimentos;

À Fundação Ezequiel Dias por abrir as portas para a consecução deste trabalho.

RESUMO

Salmonella spp. é um dos principais patógenos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no mundo. Neste estudo, analisamos 70 amostras de *Salmonella* spp., isoladas de alimentos implicados em casos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017, em relação à sorotipagem bacteriana, à susceptibilidade a 16 antimicrobianos (oito classes terapêuticas), à presença dos genes de virulência *avrA*, *flgL*, *flgK*, *hilA*, *invA*, *iroB*, *lfpA*, *sefA*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *sivH*, *sopB*, *sopE*, *spvB* e *spvC* e do gene *PT4* e ao polimorfismo genético, por meio das sequências de elementos repetitivos REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*). Treze sorotipos foram identificados neste estudo. As frequências de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram estatisticamente maiores ($p \leq 0,05$) que os demais sorotipos, ambas correspondendo a 74,2%. Produtos de origem animal ou com algum ingrediente de origem animal representaram 90% dos alimentos envolvidos nos surtos de salmonelose. *S. Enteritidis* apresentou maior associação ($p \leq 0,05$) com os produtos de origem animal. Cerca de 94,3% das amostras de *Salmonella* spp. demonstraram ser resistentes a pelo menos um dos 16 antimicrobianos avaliados. Percentual estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) de resistência antimicrobiana foi identificado para nitrofurantoína (71,4%), ácido nalidíxico (68,6%) e ciprofloxacina (40%), principalmente nas amostras de *S. Enteritidis*. O fenótipo de resistência a múltiplos antimicrobianos variou de 10 a 12,8%, com predominância no sorotipo *S. Typhimurium*. A presença dos genes de virulência oscilou de 75,7 a 100% nas 70 amostras de *Salmonella* spp.. Maior associação entre os genes de virulência e os sorotipos, após decomposição das variáveis pela Análise de Componentes Principais, foi observada em *S. Enteritidis*. O fagotipo *PT4* foi observado em 90% das amostras de *S. Enteritidis*. Na análise de diversidade genética, *S. Enteritidis* (n = 40) subdividiu-se em três *clusters* que compartilharam mais de 80% de similaridade e 14 padrões eletroforéticos (ID = 0,80), um deles composto por 17 amostras (42,5%) indistinguíveis procedentes de diferentes surtos de salmonelose. O agrupamento formado por *S. Typhimurium* (n=12) apresentou dois *clusters* e seis perfis distintos (ID=0,74). O grupo “Outros sorotipos”, composto por vários sorotipos, caracterizou-se por três *clusters* e 11 perfis com impressão digital única (ID=0,89). Neste experimento, REP-PCR apresentou reprodutibilidade, tipabilidade e potencial discriminatório. Conclui-se que as amostras de *Salmonella* spp., isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017, apresentam padrão sorológico similar àquele reportado pelos principais centros de Saúde Pública mundial. Caracterizam-se por elevada prevalência de resistência às classes terapêuticas quinolona e nitrofurano, demonstram

significativo potencial patogênico, em especial o sorotipo *S. Enteritidis* e, embora algumas amostras de *Salmonella* spp. possuam um genoma relativamente variável, é comum uma elevada similaridade genética entre as mesmas, em alguns casos, com impressões *digitais* idênticas. Por meio deste experimento foi possível também observar a circulação de perfis genéticos únicos, constantes e predominantes, em várias mesorregiões estaduais e em períodos distintos, corroborando, dessa forma, a hipótese de circulação clonal de alguns sorotipos no Estado de Minas Gerais/Brasil.

Palavras chaves: *Salmonella* spp.. Sorotipagem. Suscetibilidade Antimicrobiana. Genes de Virulência. Diversidade Genética. REP-PCR.

ABSTRACT

Salmonella spp. is one of the main pathogens that cause foodborne diseases (DTA) in the world. In this study, we analyzed 70 samples of *Salmonella* spp., isolated from foods implicated in cases of human salmonellosis in Minas Gerais State / Brazil, from 2003 to 2017, for bacterial serotyping, antimicrobial susceptibility to 16 antimicrobials (eight therapeutic classes), presence of the virulence genes *avrA*, *flgL*, *flgK*, *hilA*, *invA*, *iroB*, *lfpA*, *sefA*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *sivH*, *sopB*, *sopE*, *spvB* e *spvC* and the *PT4* gene and genetic polymorphism, using the sequences of repetitive elements REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic). Thirteen serotypes were identified in this study. The frequencies of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* were significantly higher ($p \leq 0.05$) than the other serotypes, both corresponding to 74.2% of those. Products of animal origin or with any ingredient of animal origin accounted for 90% of those involved in salmonellosis outbreaks. *S. Enteritidis* showed a greater association ($p \leq 0.05$) with products of animal origin. About 94.3% of the samples of *Salmonella* spp. demonstrated to be resistant to at least one of the 16 evaluated antimicrobials. Statistically significant percentage ($p \leq 0.05$) of antimicrobial resistance was identified for nitrofurantoin (71.4%), nalidixic acid (68.6%) and ciprofloxacin (40%), mainly in the samples of *S. Enteritidis*. The phenotype of resistance to multiple antimicrobials varied from 10 to 12.8%, with predominance in the *S. Typhimurium* serotype. The presence of virulence genes ranged from 75.7% to 100% in the 70 samples of *Salmonella* spp.. Greater association between virulence genes and serotypes, after decomposition of the variables by Principal Component Analysis, was observed in *S. Enteritidis*. The *PT4* phagotype was observed in 90% of *S. Enteritidis* samples. In the analysis of genetic diversity, *S. Enteritidis* ($n = 40$) was subdivided into three clusters that shared more than 80% similarity and 14 electrophoretic patterns (ID = 0.80), the largest consisting of 17 samples (42.5%) indistinguishable originated from different outbreaks of salmonellosis. The *cluster* formed by *S. Typhimurium* ($n = 12$) had two clusters and six distinct profiles (ID = 0.74). The group “Other serotypes”, composed of several serotypes, was characterized by three clusters and 11 profiles with a unique fingerprint (ID = 0.89). In this experiment, REP-PCR showed reproducibility, typability and discriminatory potential. We concluded that the samples of *Salmonella* spp., isolated from food in outbreaks of DTA in Minas Gerais/Brazil, from 2003 to 2017, feature a serological pattern similar to that reported by the main centers of Public Health worldwide, are characterized by a high prevalence of resistance to therapeutic classes quinolone and nitrofurantoin, demonstrate significant pathogenic potential, especially the serotype *S. Enteritidis* and, although some samples of *Salmonella* spp. have a

relatively variable genome, a high genetic similarity between them is common, in some cases, with identical *fingerprints*. According to this experiment, it was also possible to observe the circulation of unique, constant and predominant genetic profiles, in several State mesoregions and in different periods, thus corroborating the hypothesis of clonal circulation of some serotypes in the Minas Gerais/Brazil.

Keywords: *Salmonella* spp.. Serotyping. Antimicrobial Susceptibility. Virulence Genes. Genetic Diversity. REP-PCR.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	13
CAPÍTULO I	14
IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> spp. E SUA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL NOS SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA) OCORRIDOS EM MINAS GERAIS/BRASIL.....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Origem das amostras.....	18
2.2 Ativação, confirmação da pureza e identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	19
2.3 Sorotipagem.....	19
2.4 Análise estatística	20
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÃO.....	34
AGRADECIMENTOS	34
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II.....	43
SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>SALMONELLA</i> spp. ISOLADAS DE SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA) OCORRIDOS EM MINAS GERAIS/BRASIL	43
RESUMO.....	44
ABSTRACT	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Origem das amostras.....	47
2.2 Determinação do perfil fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana.....	47
2.3 Análise estatística	48

3. RESULTADOS	48
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÃO	63
AGRADECIMENTOS	63
REFERÊNCIAS	64

CAPÍTULO III **70**

PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA EM *SALMONELLA* spp. E DO GENE *PT4* EM *SALMONELLA* ENTERITIDIS ISOLADAS DE SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA) OCORRIDOS EM MINAS GERAIS/BRASIL..... **70**

RESUMO..... **71**

ABSTRACT
 72 |

1. INTRODUÇÃO
 73 |

2. MATERIAL E MÉTODOS
 74 |

2.1 Origem das amostras..... **74**

2.2 Detecção dos genes codificadores de fatores de virulência..... **74**

2.3 Análise estatística
 78 |

3. RESULTADOS
 78 |

4. DISCUSSÃO
 85 |

5. CONCLUSÃO..... **95**

AGRADECIMENTOS..... **96**

REFERÊNCIAS
 96 |

CAPÍTULO IV..... **105**

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *SALMONELLA* spp. ISOLADAS DE SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA) OCORRIDOS EM MINAS GERAIS/BRASIL..... **105**

RESUMO..... **106**

ABSTRACT
 107 |

1. INTRODUÇÃO
 108 |

2. MATERIAL E MÉTODOS
 109 |

2.1 Origem das amostras..... **109**

2.2 Análise molecular
 109 |

2.3 Análise estatística
 110 |

2.4 Análise conjunta dos dados.....	110
3. RESULTADOS	111
4. DISCUSSÃO	120
5. CONCLUSÃO.....	130
AGRADECIMENTOS	130
REFERÊNCIAS	130
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
ANEXO A.....	138
ANEXOS B e C.....	142

INTRODUÇÃO GERAL

Salmonella spp. é um dos principais causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e relevante agravo à Saúde Pública mundial. Desde que foi descoberta, tornou-se um dos microrganismos mais pesquisados, haja vista os significantes índices de morbidade e mortalidade, relacionados, principalmente, com o consumo de alimentos de origem animal. Para compreender a dinâmica epidemiológica desse patógeno, é necessário dispor de várias frentes de pesquisa.

A caracterização da biodiversidade fenotípica e genotípica de *Salmonella* spp., isoladas das mais diversas fontes (alimentos, água e amostras biológicas), representa uma abordagem laboratorial essencial na elucidação de surtos de DTA pois permite identificar a prevalência de determinados sorotipos e/ou *clusters* genéticos, o padrão de susceptibilidade antimicrobiana e o perfil de virulência dos mesmos, associando-os a informações temporais e espaciais do patógeno.

A compreensão sobre a biodiversidade é imprescindível para uma efetiva Vigilância em Saúde e para o controle da salmonelose no país. No Brasil, há muitas pesquisas sobre *Salmonella* spp., todavia, não existe estudo disponível ou dados oficiais reportados pelas Agências de Saúde humana e animal, que tratem dessa caracterização microbiana. Em Minas Gerais, esses dados também praticamente inexistem. As poucas informações disponíveis sobre as amostras de *Salmonella* spp., isoladas de alimentos ao longo dos anos, não contemplam detalhes sobre o fenótipo e genótipo, limitando-se à identificação apenas do gênero. Dessa forma, há uma constante limitação na elucidação dos surtos e direcionamento das medidas de prevenção e controle.

Diante dessa escassez de informações, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar, por métodos fenotípicos e genotípicos, amostras de *Salmonella* spp. de origem alimentar implicadas nos eventos de DTA ocorridos no Estado de Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017. Este estudo está dividido em quatro capítulos. O primeiro contempla a identificação dos principais sorotipos de *Salmonella* spp. e sua dispersão espacial e temporal nos surtos de DTA no Estado. O segundo caracteriza as amostras de *Salmonella* spp. segundo seu perfil de susceptibilidade antimicrobiana e o terceiro o potencial patogênico das mesmas, após análise molecular dos principais genes de virulência. O último reúne informações sobre a genotipagem das amostras de *Salmonella* spp. e os resultados contidos em capítulos anteriores.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar, por meio de métodos fenotípicos e genotípicos, amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados nos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos em Minas Gerais/Brasil ao longo de mais de uma década (2003 a 2017).

Objetivos Específicos

- ✓ Realizar a sorotipagem das amostras de *Salmonella* spp.;
- ✓ Determinar a susceptibilidade antimicrobiana frente a diversas classes terapêuticas;
- ✓ Pesquisar os principais genes de virulência implicados na patogenicidade de *Salmonella* spp.;
- ✓ Pesquisar o gene *PT4*, marcador característico do fagotipo *PT4* em *S. Enteritidis*;
- ✓ Realizar a tipagem bacteriana via REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*) e analisar a similaridade genética entre as mesmas;
- ✓ Correlacionar os *clusters* de *Salmonella* spp. segundo seus sorotipos, padrões de susceptibilidade antimicrobiana, fatores de virulência, perfis genotípicos, fonte de transmissão (tipo de alimento), regiões e períodos de isolamento das mesmas, para fins de elucidar a circulação clonal ou não desse patógeno.

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS DE *SALMONELLA* spp. E SUA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL NOS SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA) OCORRIDOS EM MINAS GERAIS/BRASIL

RESUMO

Salmonella spp. é um dos principais patógenos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no mundo. No Brasil e em Minas Gerais o cenário não é diferente, pois notificações de surtos por este patógeno são constantes e representam importante agravo à Saúde Pública. Neste estudo, realizamos a sorotipagem de 70 amostras de *Salmonella* spp., procedentes de alimentos implicados em casos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil ao longo dos anos de 2003 a 2017. Analisamos sua dispersão geográfica e temporal e estabelecemos associações dos principais sorotipos de *Salmonella* spp. e alimentos envolvidos nos eventos. As frequências dos sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* nos surtos de DTA foram significativamente maiores ($p \leq 0,05$) que os demais sorotipos, ambas correspondendo a 74,2% destes. Treze sorotipos foram identificados neste estudo. Maior número de notificações (47,2%) por *Salmonella* spp. foi identificada nas mesorregiões Sul de Minas e Metropolitana e maior índice de diversidade de sorotipos (ID 0,77) na região de Campo das Vertentes. A associação estatística entre sorotipos e as mesorregiões não foi conclusiva, devido a limitações do número amostral de sorotipo por regiões. A análise de frequência de *Salmonella* spp. nos surtos de DTA ao longo dos anos demonstrou que o principal sorotipo encontrado, *S. Enteritidis*, tende à redução (0,73% ao ano) no decurso dos próximos anos. Produtos de origem animal ou com algum ingrediente de origem animal representaram 78,4% das quatorze categorias de alimentos identificadas e 90% daqueles envolvidos nos surtos de salmonelose no Estado de Minas Gerais. O sorotipo *S. Enteritidis* está fortemente associado ($p \leq 0,05$) com os produtos de origem animal ou com alimentos contendo ingredientes de origem animal. Diferentemente, *S. Typhimurium*, outro sorotipo de relevância, não demonstrou associação significativa ($p \leq 0,05$) com quaisquer dos grupos de alimentos. Conclui-se que o padrão sorológico de *Salmonella* spp., isoladas de alimentos nos surtos de DTA em Minas Gerais, de 2003 a 2017, não divergiu daquele reportado pelos principais centros de Saúde Pública mundial. Associação de *Salmonella* spp. com produtos de origem animal, em especial creme de maionese artesanal, também foi observada neste estudo e acompanha outros relatos da literatura.

Palavras-chaves: *Salmonella* spp.. Sorotipos. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).

ABSTRACT

Salmonella spp. is one of the main pathogens that cause foodborne diseases (DTA) in the world. In Brazil and Minas Gerais State, the scenario is no different, as outbreak notifications for this pathogen are constant and represent an important public health problem. In this study, we performed the serotyping of 70 samples of *Salmonella* spp. from foods implicated in human salmonellosis cases in Minas Gerais/Brazil over the years from 2003 to 2017. We analyzed their geographic and temporal dispersion and established associations of the main serotypes of *Salmonella* spp. and food involved in the events. The frequencies of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* serotypes in outbreaks were significantly ($p \leq 0.05$) higher than the other serotypes, both corresponding to 74.2% of those. Thirteen serotypes were identified in this study. Higher number of notifications (47.2%) by *Salmonella* spp. was identified in the Southern and Metropolitana regions of Minas Gerais State and the highest index of diversity of serotypes (ID 0.77) was noted in the region of Campo das Vertentes. The statistical association between serotypes and mesoregions was not conclusive, due to limitations of the serotype sample number by region. *Salmonella* spp. frequency analysis in the outbreaks of DTA over the years has shown that *S. Enteritidis*, the main serotype found, showed a tendency to decrease (0.73% per year) during the period. Products of animal origin or with any ingredient of animal origin represented 78.4% of the 14 food categories identified and 90% of all those involved in the outbreaks salmonellosis in Minas Gerais State. *S. Enteritidis* serotype is strongly associated ($p \leq 0.05$) with products of animal origin or with foods containing ingredients of animal origin. In contrast, *S. Typhimurium*, another relevant serotype, showed no significant association ($p \leq 0.05$) with any of the food groups. In conclusion, it is highlighted that the serological pattern of *Salmonella* spp., isolated in outbreaks in Minas Gerais State, from 2003 to 2017, did not differ from that reported by the main public health centers worldwide. The association of *Salmonella* spp. with products of animal origin, especially handmade mayonnaise cream, was also observed in this study as well as other reports in the literature.

Keywords: *Salmonella* ssp.. Serotypes. Foodborne Diseases.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella spp. é uma das principais causas de Doenças de Transmitidas por Alimentos (DTA) no mundo (Fardsanei *et al.*, 2016; Kerketta *et al.*, 2016; Borges *et al.*, 2019; Diep *et al.*, 2019), responsável por importantes índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países emergentes quanto nos desenvolvidos (Majowicz *et al.*, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde, *Salmonella* spp. é considerada um dos 31 principais patógenos que desencadeiam doença gastrointestinal e, às vezes, sistêmica, entre os mais comuns agentes virais, bactérias, protozoários, helmintos e produtos químicos (WHO, 2015).

Anualmente, estima-se cerca de 93 milhões de casos de gastroenterite por *Salmonella* spp., dos quais, aproximadamente 80 milhões são de origem alimentar (Ke *et al.*, 2014). Segundo Ferrari *et al.* (2019), *Salmonella* spp. é considerada a terceira causa mundial de mortalidade entre as DTA. Na União Europeia, o Centro de Prevenção e Controle de Doenças Europeu (ECDC) notificou, em 2018, quase 94 mil casos de salmonelose humana e, aproximadamente, 20.1 casos/100.000 habitantes (EFSA, 2019). Nos EUA, no mesmo período, o Centro de Prevenção e Controle de Doenças Norte Americano (CDC) reportou 1 milhão e 350 mil casos, 26.500 hospitalizações e 420 mortes (CDC, 2019), com prevalência de 17.1 casos/100.000 habitantes (Tack *et al.*, 2020).

No Brasil, embora sejam escassos os dados oficiais (sob ponto de vista estatístico e epidemiológico) sobre as Doenças Transmitidas por Alimentos (Câmara *et al.*, 2011), acredita-se que *Salmonella* spp. seja responsável por quase 30% detes eventos no país (Borges *et al.*, 2019), representando o segundo patógeno mais prevalente no país (SVS/MS, 2018). Segundo Mesquita (2016), entre 2008 a 2016, foram notificados 389 surtos de salmonelose no Brasil. Estes foram responsáveis pelo adoecimento de 9.914 pessoas (menos de 1,0 caso/100.000 habitantes), hospitalização de 2.594, oito óbitos e um gasto estimado de 3,7 milhões de reais entre custos com tratamentos e perdas na produtividade humana.

Devido ao impacto mundial na saúde pública, a vigilância epidemiológica dos sorotipos de *Salmonella* spp. é uma importante ferramenta de monitoramento para identificar possíveis fontes de infecção e implementar medidas de prevenção e controle (Tegegne, 2019). A regularidade na caracterização dos sorotipos permite acompanhar a prevalência e incidência dos mesmos, bem como identificar a introdução daqueles considerados atípicos em determinada região (Loureiro *et al.*, 2010).

A sorotipagem de *Salmonella* spp., aprimorada pelos estudos de White - Kauffmann - Le Minor (Silva *et al.*, 2017a), é empregada pelos centros mundiais de Saúde Pública desde 1950 (CDC, 2020) e baseia-se na utilização de anti-soros específicos para antígenos da parede celular ou somático (O), flagelares (H), que podem ser expressos em duas fases (H1 e H2), e capsulares (Vi) (Carneiro, 2009; Tegegne, 2019). São conhecidos 67 antígenos “O” e 117 antígenos “H” distribuídos entre vários sorotipos de *Salmonella* spp. (Sanderson e Satheesh, 2013; Silva *et al.*, 2017b). Até o momento estão descritos mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella* spp. (Cox *et al.*, 2015; Gossener *et al.*, 2016; Ferrari *et al.*, 2019; Judd *et al.*, 2019; Silveira *et al.*, 2019).

O sistema proposto por White - Kauffmann - Le Minor contém informações quanto às espécies e subespécies de *Salmonella* spp. e apresenta uma lista das fórmulas antigênicas de todos os sorotipos. Sua editoração é efetuada pelo Centro Colaborador para Referência e Pesquisa em *Salmonella* spp. da Organização Mundial de Saúde (Instituto Pasteur-Paris), sendo revisada periodicamente quanto à caracterização de novos sorotipos (MS/SVS, 2011; Gossner *et al.*, 2016; Silva, 2017b).

Embora a sorotipagem não forneça perfis suficientemente diferentes para discriminar amostras de bactérias intimamente relacionadas (Ungvari *et al.*, 2007), a mesma é considerada, mundialmente, o primeiro passo para identificação de *Salmonella* spp. (Diep *et al.*, 2019), sendo em seguida complementada pela subtipagem e sequenciamento genético como alternativas para caracterização desse patógeno (CDC, 2020). Recentemente, Yamasaki *et al.*, (2021) descreveram a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por meio da pesquisa do gene *stn*, como método rápido de sorotipagem, substituindo o procedimento convencional que utiliza diversos anti-soros.

Neste trabalho, a sorotipagem foi utilizada como método inicial de caracterização fenotípica de *Salmonella* spp. Para compreensão epidemiológica da salmonelose ocorrida em Minas Gerais/Brasil, entre 2003 e 2017, foi realizada a análise da dispersão geográfica e temporal do padrão sorológico identificado nas amostras de *Salmonella* spp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras

Um total de 70 amostras de *Salmonella* spp. foi obtido junto a coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Fundação Ezequiel Dias para este estudo. Todas as amostras foram isoladas de alimentos implicados em surtos de salmonelose humana em Minas

Gerais/Brasil, de 2003 a 2017, por meio do método APHA (2001) e mantidas em criopreservação em glicerol 20% à temperatura de - 80°C. Os dados epidemiológicos relacionados a estas amostras, tais como região de coleta, período de isolamento, tipo de alimento e outros foram obtidos no referido Laboratório/Instituição por meio das plataformas digitais *Harpya* e *SGA 2000*.

2.2 Ativação, confirmação da pureza e identificação das amostras de *Salmonella* spp.

As amostras de *Salmonella* spp. encontravam-se criopreservadas em glicerol 20% e temperatura de - 80°C. Para ativação das culturas, as mesmas foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, homogeneizadas e, posteriormente, inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (Kasvi K25 1048 – Madri, Espanha) para incubação em aerobiose a 37°C por 18-24 horas.

Após esse período, uma alíquota de 10 µL (micro-litros) de cada amostra foi espalhada na superfície de placas de Petri contendo ágar MacConkey (Difco 212123 – Nova Jersey, EUA), ágar Xilose Lisina Desoxicolato (Oxoid CM 469 – Hampshire, Reino Unido) e ágar Hektoen Entérico (Difco 285340 – Nova Jersey, EUA) e, novamente, incubadas em aerobiose a 37°C por 18-24 horas, para avaliação da pureza e características morfológicas.

As colônias de cada amostra foram submetidas à confirmação bioquímica por meio da identificação no meio Rugai & Araújo Modificado - IAL (Pessôa, Silva, 1974), no sistema automatizado VITEK® 2 compact (BIOMERIEUX S.A – Craponne, França) e no sistema MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) - Time of Flight (TOF) Mass Spectrometry (MS)*), utilizando o espectrofotômetro de massa FlexFlex MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA).

As culturas com características bioquímicas compatíveis com *Salmonella* spp. no meio IAL e escores indicativos deste microrganismo nos dois sistemas, ou seja, identificação com probabilidade superior a 90% no sistema VITEK® 2 compact e faixa de massa superior a 2.000 Da. no MALDI-TOF (ANEXOS B e C, página 151) foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (Kasvi K25 1048 – Madri, Espanha) e, após incubação, criopreservadas em glicerol 20% a temperatura de - 80°C, para experimentação futura.

2.3 Sorotipagem

A identificação dos sorotipos de *Salmonella* spp. foi realizada pelo método de aglutinação em lâmina, que avalia as diferenças antigênicas presentes na cápsula celular (antígenos capsulares

“Vi”), na parede celular (antígenos somáticos “O”) e nos flagelos (antígenos flagelares “H), conforme proposto por White - Kauffmann - Le Minor (Cox *et al.*, 2017). Este procedimento foi realizado pelo Laboratório Nacional de Referência em Enterobactérias, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

2.4 Análise estatística

Para compreender a prevalência e monitorar o comportamento dos sorotipos de *Salmonella* spp. circulantes no Estado de Minas Gerais/Brasil, entre 2003 e 2017, foram utilizados o teste estatístico não paramétrico Qui-quadrado (χ^2) por Aderência, com significância menor que 5% ($p \leq 0,05$) e a Análise de Regressão Linear, respectivamente, conforme Sampaio (2015).

O georreferenciamento Municipal dos casos de salmonelose no Estado de Minas Gerais foi realizado com auxílio do *software* QGIS, versão 2.14 e informações do Instituto Brasileiro de Geografia (2019). A biodiversidade sorológica em cada região foi aferida pelo coeficiente de Simpson's, utilizando a fórmula descrita por Hunter e Gaston (1988).

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

D indica o índice de dominância de Simpson, N o número de sorotipos de *Salmonella* spp. por região e n número de amostras de um sorotipo exclusivo. O valor estimado de D varia de 0 (zero) a 1 (um), sendo que, para valores próximos de 1, a dominância é maior e a biodiversidade considerada menor.

3. RESULTADOS

Entre os anos 2003 e 2017 foram identificados 13 sorotipos de *Salmonella* spp. nos alimentos provenientes de 50 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil (Tabela 1). Observou-se significância estatística ($p \leq 0,05$) entre as frequências dos sorotipos, principalmente, devido ao predomínio de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Ambos corresponderam a 74,2% do total de sorotipos e foram a causa de 39 (78%) surtos no período.

Duas amostras de *Salmonella* spp. (2,8%) não foram totalmente sorotipadas. Em uma amostra somente foi possível a tipagem parcial do antígeno “O” (*S. enterica* subespécie *enterica* O:4,5) e na outra, devido à morfologia rugosa, nenhum tipo de caracterização antigênica foi observada. Todos os 13 sorotipos foram classificados na espécie *S. enterica* subespécie *enterica* (categoria I) e sete destes no sorogrupo O:4 (53,8%), três no O:7 (23,1%), dois no O:9 (15,4%) e apenas

uma no sorogrupo O:8 (7,7%). O sorogrupo O:9, composto pelos sorotipos *S. Enteritidis* (40) e *S. Panama* (01), compreendeu 58,6% das amostras bacterianas.

Tabela 1: Frequência relativa dos sorotipos e sorogrupos de *Salmonella* spp. e de *Salmonella* spp. não sorotipáveis, isolados nos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ocorridos em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2003 a 2017

Sorotipos de <i>Salmonella</i> spp. e de <i>Salmonella</i> spp. não sorotipáveis	Sorogrupo	Distribuição (%)
<i>S. Abony</i>	O:4 (B)	1 (1,4)
<i>S. Agona</i>	O:4 (B)	1 (1,4)
<i>S. Derby</i>	O:4 (B)	1 (1,4)
<i>S. Heidelberg</i>	O:4 (B)	4 (5,8)
<i>S. Saintpaul</i>	O:4 (B)	1 (1,4)
<i>S. Schwarzengrund</i>	O:4 (B)	1 (1,4)
<i>S. Typhimurium</i>	O:4 (B)	12 (17,2)
<i>S. Braenderup</i>	O:7 (C ₁)	1 (1,4)
<i>S. Infantis</i>	O:7 (C ₁)	1 (1,4)
<i>S. Rissen</i>	O:7 (C ₁)	1 (1,4)
<i>S. Corvallis</i>	O:8 (C ₂)	3 (4,4)
<i>S. Enteritidis</i>	O:9 (D ₁)	40 (57,2)
<i>S. Panama</i>	O:9 (D ₁)	1 (1,4)
* <i>Salmonella</i> spp.	O:4,5 (B)	1 (1,4)
* <i>Salmonella</i> spp.	-----	1 (1,4)
TOTAL	-----	70 (100)

Teste do Qui-Quadrado por Aderência ($\chi^2 = 0,00$; $p \leq 0,05$)

(B), (C₁), (D₁): Grupos somáticos – são designados pelas letras do alfabeto (A a Z). Cada grupo somático detém um ou mais fatores somáticos (antígenos maiores e menores).

O:4, O:7, O:8, O:9, O4,5: Fatores somáticos

* *Salmonella* spp: amostras não sorotipáveis na prova de algultinação em lâmina

A diferença estatística significativa entre as frequências dos sorotipos ($p \leq 0,05$) não permitiu uma associação destes com a sua distribuição espacial no Estado. Observou-se que as amostras foram isoladas em 36 municípios (Figura 1) e quase a metade delas (47,2%) em municípios localizados nas mesorregiões Sul de Minas e Metropolitana. O Estado de Minas Gerais é

composto por 12 mesorregiões fixadas por critérios sociais, geográficos e de articulação espacial, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Ciências - IBGE/2019.

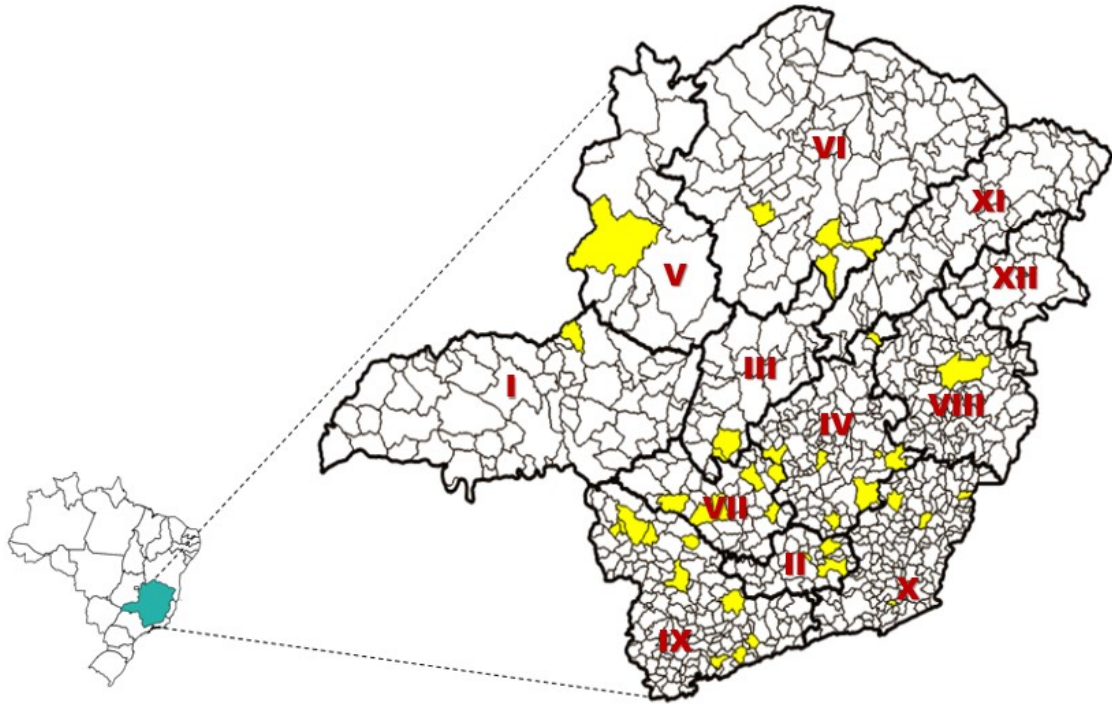


Figura 1: Mesorregiões e Municípios de Minas Gerais com caso notificado de salmonelose entre anos 2003 e 2017.

Legenda: **I - Alto Paranaíba/Triângulo** (Abadia dos Dourados e Ibiá); **II - Campo das Vertentes** (Barbacena, Carandaí e Tiradentes); **III - Central de Minas** (Bom Despacho, Itaúna e Moema); **IV - Metropolitana** (Belo Horizonte, Conselheiro Lafaiete, João Monlevade, Mariana, Pará de Minas, São Domingos do Prata, Serra Azul de Minas); **V - Noroeste** (Paracatu); **VI - Norte** (Bocaiuva); **VII - Oeste** (Carmópolis de Minas, Divinópolis, Formiga, Pium-i); **VIII - Vale do Rio Doce** (Governador Valadares); **IX - Sul de Minas** (Alfenas, Alpinópolis, Ilícinea, Itajubá, Itaú de Minas, Passos, Pouso Alegre, Pratápolis, Três corações, Virgínia); **X - Zona da Mata** (Araponga, Manhumirim, Maripá de Minas, Ponte Nova); **XI - Vale do Jequitinhonha** e **XII - Vale do Mucuri**. Georreferenciamento Municipal realizado conforme definições espaciais do IBGE 2019.

A mesorregião de Campo das Vertentes foi a que apresentou maior índice de diversidade (ID 0,77) de sorotipos (*S. Braenderup*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Rissen*) e a Oeste de Minas, o maior número de sorotipos distintos (*S. Agona*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* e *S. Panama*) (Tabela 2). Metade dos isolamentos de *Salmonella* spp. ocorreu nas regiões Sul de Minas e Metropolitana.

S. Enteritidis foi o sorotipo mais prevalente em sete (58,5%) mesorregiões do Estado, independentemente da alta ou baixa diversidade naquele território. Nestas regiões, o percentual

de *S. Enteritidis* oscilou entre 50 e 100%. No Vale do Jequitinhonha e Vale do Mucuri, nenhuma amostra de *Salmonella* spp. foi isolada nos eventos de DTA entre 2003 e 2017.

Tabela 2: Frequência de municípios em que foram notificados surtos de *Salmonella* spp., de sorotipos e índice de diversidade, por mesorregião do Estado de Minas Gerais entre os anos de 2003 a 2017

Regiões de Minas Gerais		Sorotipos de <i>Salmonella</i> spp.		Diversidade
Mesorregião	Notificações (%)	Nº amostras (%)	Sorotipos	ID Simpson
Central de Minas	3 (10,0)	7 (10)	SE e ST	0.41
Oeste de Minas	4 (9,1)	12 (17,1)	SAg, SE, SH, SI, ST e SP	0.62
Campo das Vertentes	3 (8,3)	6 (8,6)	SB, SE, SH, SR	0.77
Sul de Minas	10 (6,8)	17 (24,3)	SD, SE, Se e SSc	0.31
Metropolitana	7 (6,7)	18 (25,7)	SAb, SC, SE, SH, ST	0.72
Noroeste de Minas	1 (5,3)	1 (1,4)	SSa	-----
Alto Paranaíba/Triângulo	2 (3,0)	2 (2,9)	SE	-----
Zona da Mata	4 (2,8)	5 (7,1)	SE e Se	0.32
Norte de Minas	1 (1,1)	1 (1,4)	SE	-----
Vale do Rio Doce	1 (1,0)	1 (1,4)	ST	-----
Vale do Jequitinhonha	0	0	0	-----
Vale do Mucuri	0	0	0	-----

Legenda: SAg – *S. Agona*; SAb – *S. Abony*; SB – *S. Braenderup*, SC – *S. Corvallis*; SD – *S. Derby*; SE – *S. Enteritidis*; Se – *S. enterica*; SP – *S. Panama*; SH – *S. Heidelberg*; SR – *S. Rissen*; SSa – *S. Saintpaul*; SSc – *S. Schwarzengrund*; ST – *S. Typhimurium*; □ sorotipo mais frequente na mesorregião; ----- índice de diversidade não calculado devido a ocorrência de apenas um ou nenhum sorotipo.

Por meio da análise temporal da frequência dos sorotipos, observou-se que nos anos 2003, 2011, 2015 e 2016, não ocorreu o isolamento de *S. Enteritidis*, diferentemente de 2009, 2010 e 2017, quando apenas este sorotipo não foi detectado (Figura 2). Embora *S. Enteritidis* se destaque como principal sorotipo (57,1%) nos eventos de DTA entre 2003 e 2017, há uma tendência para declínio de sua frequência ao longo deste período. Por outro lado, os outros sorotipos, quando analisados em conjunto, tendem a aumentar com o tempo. De acordo com a análise de regressão linear, para cada ano que se passa é prevista uma redução de 0,73% na frequência de *S. Enteritidis* nos eventos de DTA em Minas Gerais. Para os demais sorotipos, a previsão é de ascensão no mesmo percentual (0,73%), pois o estudo adota apenas duas variáveis (*S. Enteritidis* x outros sorotipos).

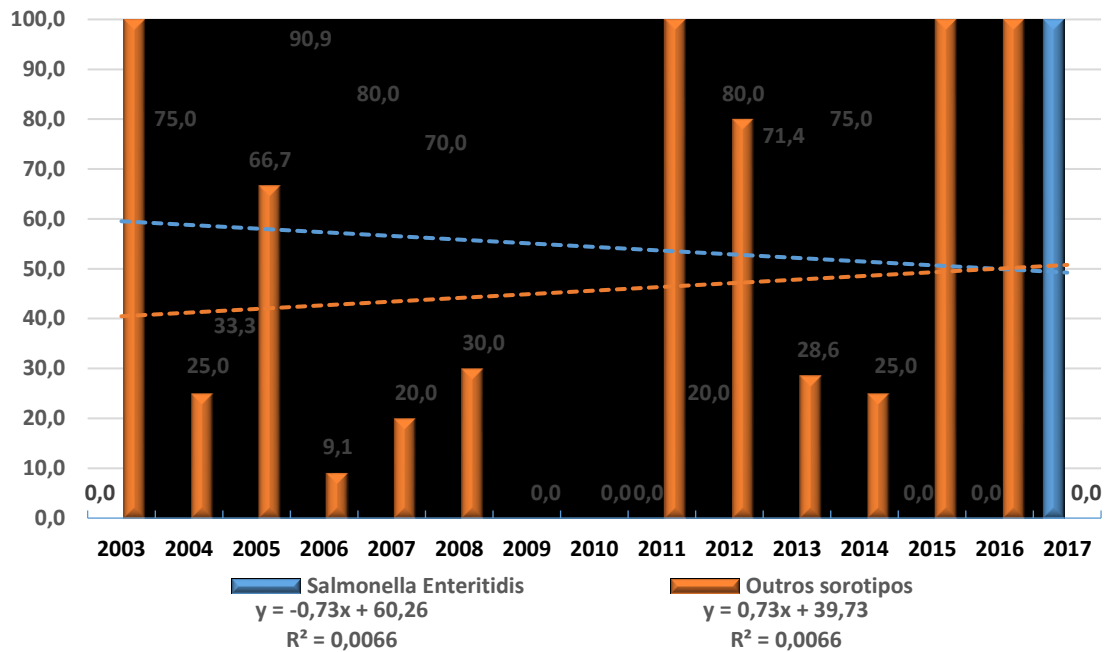


Figura 2: Avaliação anual da frequência relativa e da tendência linear de *S. Enteritidis* e outros sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017.

Salmonella spp. foi identificada em vários tipos de alimentos, que foram agrupados em 14 categorias de acordo com seu modo de preparo, processo produtivo e/ou composição nutricional (Figura 3). Os produtos de origem animal (*) ou alimentos com algum ingrediente de origem animal (∞) representaram 78,4% destas categorias e 90% de todos os alimentos envolvidos nos surtos de DTA no Estado de Minas Gerais. Um total de 63 (90%) sorotipos de *Salmonella* spp. foi identificado em alimentos de produtos de origem animal (*) ou com algum ingrediente de origem animal (∞).

Observou-se que, independentemente do sorotipo, a frequência deste patógeno em alguns alimentos foi altamente significativa ($p \leq 0,05$), notadamente, em maionese artesanal (25,7%), tortas tipo sobremesa (17,1%) e carnes cozidas (12,9%), corroborando o potencial risco destes alimentos na veiculação de *Salmonella* spp.

S. Enteritidis, sorotipo mais comum nos eventos, foi veiculada, em grande parte (72,5%), pelos produtos de origem animal ou com algum ingrediente de origem animal, sendo creme de maionese artesanal responsável por 35% destes produtos. Entre as categorias de alimentos estudadas, observou-se forte associação significativa ($p \leq 0,05$) de *S. Enteritidis* e sua presença em creme de maionese artesanal. Embora presente em vários produtos de origem animal, é

interessante o fato de que em nosso laboratório, até hoje, nenhuma amostra de *S. Enteritidis* foi identificada em amostras de ovos e leite. *S. Typhimurium*, outro sorotipo de relevância, não demonstrou associação significativa ($p \leq 0,05$) com quaisquer dos grupos de alimentos. Devido à limitação amostral, não foi possível fazer inferências estatísticas entre a frequência e a presença dos demais sorotipos nos alimentos.

<i>Alimentos</i>	<i>Sorotipos</i>														TOTAL	Freq. Relativa %	
	<i>S. Abony</i>	<i>S. Agona</i>	<i>S. Braenderup</i>	<i>S. Corvallis</i>	<i>S. Derby</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Heidelberg</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Panama</i>	<i>S. Rissen</i>	<i>S. Saintpaul</i>	<i>S. Schwarzengrund</i>	<i>S. Typhimurium</i>			
Pratos à base de arroz							1								1	1,4	
Bolo confeitado ∞			1									1			1	3	4,3
Carne cozida *				1			4	1							3	9	12,9
Embutido cozido *							2									2	2,9
Farofa ∞				1												1	1,4
Pratos à base de feijão								1							1	2	2,9
Massas recheadas ∞					1		2	1							1	5	7,1
Maionese artesanal ∞		1					14		1	1					1	18	25,7
Pratos à base de carne ∞	1						1								1	3	4,3
Queijo Minas frescal *															2	2	2,9
Salada de vegetais				1		1	1					1				4	5,7
Salgado/Lanche ∞							2									2	2,9
Sanduiche ∞							6									6	8,6
Torta tipo sobremesa ∞						1	7	1					1	2	12	17,1	
TOTAL	1	1	1	3	1	2	40	4	1	1	1	1	1	12	70	100	

Teste do Qui Quadrado por Aderência ($\chi^2 = 0,00$; $p \leq 0,05$)

* produtos de origem animal; ∞ alimentos com ingrediente de origem animal

Figura 3: Frequência relativa dos alimentos contaminados por diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. isolados nos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais /Brasil, entre os de 2003 e 2017.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos o padrão sorológico de 70 amostras de *Salmonella* spp. de origem alimentar implicadas em surtos de DTA ocorridos em Minas Gerais/Brasil de 2003 a 2017, sua

distribuição espacial e temporal e os principais alimentos envolvidos nos surtos. Foram identificados 13 sorotipos de *Salmonella* spp., todos pertencentes à subespécie enterica (categoria I). Esta categoria contempla mais de 60% dos sorotipos descritos na literatura (Machado, 2013) e 99% daqueles causadores de infecções em humanos (CDC, 2011; Eng *et al.*, 2015; Silva *et al.* 2017b; Carstens *et al.*, 2019). Mais da metade das amostras bacterianas (58,5%) foram soroadgrupadas com antígeno O:9 (D₁), representados por *S. Enteritidis* (97,5%) e *S. Panama* (2,5%). Esse elevado percentual de amostras do sorogrupo O:9 já era esperado, pois *S. Enteritidis* é o sorotipo mais comum em surtos de DTA na África, Ásia, Europa, América Latina (Loureiro *et al.*; 2010, EFSA 2019) e no Brasil (Fardsanei *et al.*, 2016).

A predominância do sorogrupo O:9 (68,1%) também foi reportada no Estado do Pará/Brasil, após análise de 890 amostras de *Salmonella* spp. de origem humana isoladas entre os anos 1999 e 2008. Nesta ocasião, os principais sorotipos identificados no sorogrupo O:9 foram *S. Typhi* e *S. Enteritidis* (Loureiro *et al.*; 2010). O conhecimento dos principais sorogrupos e sorotipos que circulam em determinadas regiões, bem como sua evolução ao longo dos anos, é uma ferramenta epidemiológica essencial para adoção de medidas profiláticas e controle da salmonelose humana.

Duas amostras de *Salmonella* spp. (2,9%) não foram totalmente sorotipadas. A evidência de amostras bacterianas não tipáveis não é incomum e, normalmente, ocorre devido à autoaglutinação da amostra ou perda de sua expressão antigênica, como o observado em amostras rugosas, imóveis e mucoides (Diep *et al.*, 2019). Amostras autoaglutináveis são facilmente fagocitáveis e sensíveis à ação do complemento e, como consequência, perdem sua capacidade patogênica, corroborando sua pouca expressão epidemiológica (MS/SVS, 2011; Tegegne, 2019).

Embora o quantitativo de sorotipos de *Salmonella* spp. identificados nos alimentos causadores de DTA em Minas Gerais entre 2003 e 2017 seja considerado discreto (n=13) frente aos mais de 2.500 sorotipos descritos na literatura (Almeida *et al.*, 2013; Pulford *et al.*, 2019; Qi *et al.*, 2019; Silveira *et al.*, 2019) é preciso considerar que apenas uma pequena porção destes causam doenças em seres humanos (Jackson *et al.*, 2013). Segundo o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), os 20 sorotipos de *Salmonella* spp. que mais acometem seres humanos correspondem a 70% do total de amostras isoladas e os 100 principais sorotipos, quase 98% das mesmas (CDC, 2011). Keerthirathne *et al.* (2016) também afirmam que a maioria dos casos de salmonelose são atribuídos a aproximadamente 20 sorotipos. Judd *et al.* (2019), em estudo mais

recente, observaram que dos 1.300 sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de humanos nos EUA, mais de 90% era composto por apenas 39 sorotipos.

Em Minas Gerais, quase metade dos sorotipos (47,2%) de *Salmonella* spp. predominaram nas mesorregiões Sul de Minas e Metropolitana, esta última acompanhada por um dos maiores índices de diversidade (ID 0,72) de sorotipo entre as doze regiões analisadas. A distribuição dos sorotipos de *Salmonella* spp. pode diferir entre os países e suas regiões (Tegegne, 2019). É possível que variações demográficas, geográficas e sazonais auxiliem na compreensão dos sorotipos encontrados nestas mesorregiões, bem como seus diferentes índices de diversidade de sorotipos. Aspectos relativos à diversidade local de atividades econômicas tais como a produção animal (bovinos, suínos e aves) e a presença de abatedouros também podem ter influenciado a circulação de determinados sorotipos em algumas regiões. Todavia, é necessária precaução no aprofundamento desta hipótese, visto que a subnotificação em algumas regiões comprometeu a análise acurada dos dados. A baixa notificação no Estado é uma realidade, uma vez que entre 2010 e 2018, quase 80% dos municípios não realizaram coleta de alimentos para investigação de surtos de DTA. Por ano, em média, apenas 5% dos municípios realizaram essas coletas (Faula *et al.*, 2019). No Brasil, estima-se que apenas 10% dos surtos são notificados (Mesquita, 2016).

De acordo com Judd *et al.* (2019), as variações demográficas, geográficas e sazonais podem contribuir para o risco de infecções e para ocorrência de sorotipos incomuns em algumas áreas. Mudanças na dinâmica populacional, modificações produtivas na agroindústria e proximidade de reservatórios (animais de companhia ou de produção) também são fatores que justificam a presença de alguns sorotipos em seres humanos e em determinadas regiões (Prasertesse *et al.*, 2019). Sanjana *et al.* (2019), por exemplo, em seu modelo de avaliação epidemiológica, observaram que infecções pelo sorotipo *S. Typhimurium* eram significativamente mais comuns em pacientes que relatavam contato com animais do que aqueles sem contato prévio. Segundo os autores, maior diversidade de sorotipo nos casos de salmonelose foi identificada no período do inverno, embora o maior número de infecções tenha ocorrido no verão.

Os principais sorotipos encontrados no Estado de Minas Gerais entre os anos de 2003 a 2017, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, representaram 74,2% das amostras bacterianas. Estes dois sorotipos têm sido considerados, há mais de uma década, como os mais prevalentes no mundo (Ungvari *et al.*, 2007; FSAI, 2011; Sadkowska-Todys, Czarkowisk 2013; Fardsanei *et al.*, 2016; Keerthirathne *et al.*, 2016; Tejada *et al.*, 2016; Kalaba *et al.*, 2017; Rahman, Othman 2017;

Milczarek *et al.*, 2018; Powell *et al.*, 2018; Reis *et al.*, 2018; Simon *et al.*, 2018; Simpson *et al.*, 2018; EFSA, 2019). Na Europa, ambos representaram 71% dos 79.698 casos humanos de salmonelose em 2018, sendo *S. Enteritidis* a causa de dois terços das infecções naquele continente (EFSA, 2019). Nos EUA, estes dois sorotipos, juntamente com *S. Newport*, representaram 40% de todas as amostras de *Salmonella* spp. sorotipadas entre 1996 e 2014 (Powell *et al.*, 2018). Neste país, *S. Typhimurium*, diferentemente do observado na Europa, destaca-se como o mais prevalente (Almeida *et al.*, 2015; Tegegne, 2019).

No Brasil, levantamento realizado pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde entre os anos de 2000 a 2005 reportou a predominância (72,6%) de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* nas 3.554 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de diferentes origens e regiões geográficas (Carneiro, 2009; Machado, 2013). Desde 1990, *S. Enteritidis* é o sorotipo mais notificado entre casos de gastroenterite no território brasileiro (Fardsanei *et al.*, 2016) e em países da África, Ásia, Europa e América Latina e o segundo mais prevalente na América do Norte e Oceania, representando 43,5% de todos os sorotipos descritos no mundo (Campioni *et al.*, 2012).

As notificações mundiais de gastroenterite humana por *S. Enteritidis* tornaram-se mais evidentes na década de 1980 (Simões *et al.*, 2010). No Brasil, sua primeira descrição em alimentos ocorreu em 1983 (Campioni, 2013). Até então, sua identificação era considerada insignificante no país e até 1990 esse sorotipo somente havia sido identificado em 0,37% das 28.658 amostras de humanos e 0,85% das 14.345 oriundas de outras fontes. Com o passar dos anos, o cenário mudou e, entre 1991 e 1995, seu isolamento passou de 1,2% para 64,9% nas amostras de humanos e de zero para 40,7% naquelas de outras origens (Silva, Duarte 2002; Kottwiz, 2009; Campioni *et al.*, 2018).

S. Typhimurium, segundo sorotipo mais prevalente em Minas Gerais (17,1%), de 2003 a 2017, destaca-se como principal sorotipo na Ásia e Oceania (Campioni *et al.*, 2012). Na Austrália, este sorotipo predomina em fontes humana (56%) e não humana (alimentos para consumo humano e animal, animais de produção, companhia e selvagens e diversos ambientes) (Simpson *et al.*, 2018). Neste país, 84% dos 990 surtos de salmonelose ocorridos ao longo de 2001 até 2016 tiveram como causa *S. Typhimurium*. Neste mesmo período, observou-se um aumento progressivo anual de 15 surtos para quase 90, causados por este sorotipo (Ford *et al.*, 2018). Na China, *S. Typhimurium* foi o sorotipo mais prevalente (21,6%) em 32.000 pacientes com diarreia aguda, procedentes de casos gastroenterite alimentar entre 1998 e 2017 (Qi *et al.*, 2019).

No Brasil/Rio Grande do Sul, quase a metade (48,3%) das 307 bactérias isoladas de amostras clínicas entre 2010 e 2015 pertenciam ao sorotipo *S. Typhimurium* (Reis *et al.*, 2018).

Embora *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* se destaquem como principais causadores de DTA em Minas Gerais, Brasil, e em vários países como exposto anteriormente, outros sorotipos também são importantes causas de salmonelose humana (Simon *et al.*, 2018). Em Minas Gerais, além *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, foram identificados os sorotipos Abony, Agona, Braenderup, Corvallis, Derby, Heidelberg, Infantis, Panama, Saintpaul, Schwarzengrund e Rissen. É possível que estes tenham ganhado destaque no Estado devido ao declínio na frequência *S. Enteritidis* (0,73% ao ano). Sabe-se que quando um sorotipo diminui em um nicho ecológico, independentemente das causas, outros emergem para ocupar este habitat (Voss-Rech *et al.*, 2015). Esse fato vem sendo reportado no Brasil após a implantação do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) para controle de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em plantéis avícolas e do Programa Nacional de Redução de Patógenos (PNRP) em indústria de alimentos (Carbonera, 2018).

A ausência do sorotipo *S. Enteritidis* em plantéis avícolas em vários estados brasileiros e em amostras de *Salmonella* spp. isoladas de humanos nos estudos de Voss-Rech *et al.*, (2015) e Tejada *et al.*, (2016) é atribuída à implantação do PNSA em 2003. Fato similar também é relatado em plantéis avícolas de outros países. Na Bélgica, vários sorotipos emergiram após implementação da vacinação contra *S. Enteritidis*, em especial *S. Minnesota*, cuja frequência ampliou de 2% para 17,6% em apenas três anos (Coda-Cerva, 2014). Segundo Kalaba *et al.*, (2017) a prevalência de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em aves diminuiu pela metade nos últimos anos.

A tendência de redução na prevalência de *S. Enteritidis* em fontes animais, como citado anteriormente, parece refletir diretamente nos casos de salmonelose humana. Em amostras bacterianas isoladas de humanos, a frequência de *S. Enteritidis* diminuiu progressivamente de 64,1 para 37,5% nos últimos anos (Rabsch *et al.*, 2012). Nos EUA, a análise de 1.328 surtos ocasionados por *S. Enteritidis* entre 1973 e 2009 demonstrou aumento acentuado de surtos por este sorotipo entre 1970 e 1980, atingindo o pico em 1990 (84 surtos/ano) e significativa queda a partir de desta data. A análise de regressão demonstrou uma mudança na trajetória dos surtos por *S. Enteritidis*, com queda de 0,4% ao ano após 1990 (Wright *et al.*, 2016). Em Minas Gerais, a taxa de declínio no período de 2003 a 2017 foi de 0,7%.

Os sorotipos Abony, Agona, Braenderup, Corvallis, Derby, Heidelberg, Infantis, Panama, Saintpaul, Schwarzengrund e Rissen, identificados em Minas Gerais, ainda que em baixas prevalências (1,4 a 5,7%), também são reportados com regularidade em fontes humana e não humana (alimentos, animais e ambiente), bem como causa de diversos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em vários países, conforme descrições a seguir.

Em 2016, *S. Abony* foi a causa de um surto de DTA em nove Estados Norte Americanos após o consumo de brotos de alface (CDC, 2016; Carstens *et al.*, 2019). No Brasil, 18,2% das amostras isoladas de carcaças suínas, utensílios, equipamentos água e ambiente em abatedouro suíno apresentaram este sorotipo (Cabral *et al.*, 2017). *S. Agona*, outro sorotipo identificado em Minas Gerais, está entre os dez mais prevalentes na Europa, principalmente, no Reino Unido (30%), Alemanha (16%) e França (14%). Em 2016, este sorotipo foi a causa de 13 surtos de DTA neste continente, veiculado, principalmente, por carne de aves (EFSA, 2019). Nos EUA, em 2011, um surto de DTA de grandes proporções ocasionado por *S. Agona*, proveniente do consumo de mamão papaia, difundiu-se em vários Estados do país (Mba-Jonas *et al.*, 2018).

S. Braenderup, identificada em uma amostra de bolo confeitado em Minas Gerais, também foi a causa de um grande surto de DTA nos EUA após o consumo de ovos contaminados (CDC, 2018). Na ocasião, sua presença foi confirmada em todas as etapas da cadeia produtiva das aves de postura e na coprocultura dos indivíduos expostos ao patógeno, resultando no recolhimento de 207 milhões de unidades de ovos, o maior já reportado naquele país (FDA, 2018). *S. Corvallis*, outro sorotipo presente em três amostras deste estudo (carne cozida, prato pronto a base de carnes e farofa), também foi detectado em cortes cárneos de peru coletados na Turquia, correspondendo a 46,3% dos 169 sorotipos de *Salmonella* spp. identificados nas amostras à época.

S. Derby, encontrada em um prato de massa recheada, é considerada um dos principais sorotipos isolados de seres humanos e é veiculado, principalmente, por carne suína (Simon *et al.*, 2018). Na Europa, este sorotipo está entre os dez principais sorotipos de *Salmonella* spp. causadores de infecção gastrointestinal e é o mais abundante em carne suína (Sevellec *et al.*, 2018). Na China, *S. Derby* figura entre os três mais comuns sorotipos em pacientes com diarreia (Xu *et al.*, 2019). No Brasil, o isolamento deste sorotipo tem ocorrido, principalmente em abatedouros e carcaças de suíno (Simon *et al.*, 2018).

S. Heidelberg, terceiro sorotipo mais prevalente (5,7%) nos surtos em Minas Gerais, encontra-se amplamente distribuído no mundo. Nos últimos anos, programas de controle do governo

brasileiro detectaram um aumento desse sorotipo em abatedouros de aves (Webber *et al.*, 2019). No Paraná, um estudo detectou sua circulação em 98,4% das amostras de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de aves (Carbonera, 2018). Na União Europeia, *S. Heidelberg* já se destacou entre os mais frequentes sorotipos detectados nos anos de 2013, 2014 e 2016 (RASFF, 2017). Nos EUA, entre 1970 e 2009, *S. Heidelberg* foi reportado como um dos quatro mais comuns sorotipos em amostras de frango e de seres humanos (Voss-Rech *et al.*, 2015).

S. Infantis, identificado neste estudo em um prato a base de carne, tem como principal reservatório animal as aves. Em Israel, seu isolamento foi observado em 26,8% das aves de corte (Kabala, *et al.*, 2017). Na Europa, é um sorotipo detectado com frequência em propriedades avícolas, correspondendo a 50,6% das amostras de *Salmonella* spp. (Pate *et al.*, 2019). Na África, Ásia, Europa, América do Norte, Oceania e América Latina este sorotipo é considerado um dos 15 mais prevalentes (Hindermann *et al.*, 2017). No Brasil, o sorotipo *S. Infantis* destacou-se como terceiro mais prevalente (6,2%) em amostras clínicas de humanos (Reis *et al.*, 2018).

S. Panama, também reportada em nossos estudos, pode ser isolado de humanos, animais, alimentos e ambientes. Em humanos, além de gastroenterite, apresenta grande habilidade invasiva, causando doenças sistêmicas (meningite, sepse, etc.) (Carneiro *et al.*, 2019). Este sorotipo não parece estar amplamente difundido nos casos de DTA, já que menos de 1% dos casos de salmonelose reportados no mundo são atribuídos ao mesmo (Parry *et al.*, 2019). No Caribe e América Latina, porém, *S. Panama* é considerada a principal causa de salmonelose não tifoide invasiva (Pulford *et al.*, 2019).

S. Saintpaul, sorotipo amplamente distribuído no ambiente, foi identificada em um prato a base de saladas em Minas Gerais. Nos EUA, vários alimentos crus, em especial tomates, também foram associados a um surto causado por este sorotipo que se difundiu por 45 estados. Na ocasião, aproximadamente 1.500 casos foram confirmados e dois óbitos registrados (Behravesht *et al.*, 2011). *S. Rissen*, identificado entre os 13 sorotipos deste estudo, é um dos mais comuns em humanos e na suinocultura em diferentes partes do mundo, especialmente na Ásia. Na Tailândia, é o sorotipo mais prevalente em carcaças suínas (80%) e produtos prontos para consumo (Pornsukarom *et al.*, 2015). Em outros países, sua prevalência é baixa e a epidemiologia desconhecida. Em Portugal, por exemplo, somente 31 casos de salmonelose foram associados a este sorotipo em 12 anos (Joana *et al.*, 2019).

S. Schwarzengrund, identificado em uma sobremesa tipo pavê, não é reportado com frequência entre os sorotipos mais comuns em casos de DTA. Nos países da União Europeia, por exemplo, esse sorotipo não está entre os 20 principais causadores de salmonelose humana desde 2012 (EFSA 2015 e EFSA 2019). Muitos estudos sugerem as aves como principal reservatório desse sorotipo (Chen *et al.*, 2010). No Brasil, um estudo interestadual identificou *S. Schwarzengrund* como o quinto sorotipo mais frequente (11,5%) em amostras isoladas de produtos avícolas em 2010 e 2011 (Silva, 2012).

Os produtos de origem animal e alimentos com algum ingrediente de origem animal corresponderam a 90% dos alimentos veiculadores de *Salmonella* spp. em Minas Gerais, entre 2003 e 2017. Vários autores afirmam que mais de 95% das salmoneloses humanas têm origem no consumo de alimentos (Holmann, 2001; Yamatogi *et al.*, 2011; Mesquita, 2016), principalmente, de origem animal e, dentre estes, especialmente carnes, ovos e leite (Kerketta *et al.*, 2016, Carvalho *et al.*, 2017). No Brasil, 17,5% dos 12.503 surtos de DTA notificados entre 2000 e 2017 por variados microrganismos, tiveram como causa produtos de origem animal (MS/SVS, 2018). Com relação aos surtos por *Salmonella* spp. ocorridos entre 2008 e 2016, 90,4% (352/389) tiveram como veículo algum produto de origem animal. Outros países também reportam alta prevalência de surtos ocasionados por produtos de origem animal. Na Austrália, por exemplo, entre 2000 e 2016, 79% dos casos de salmonelose foram oriundos do consumo de alimentos e o restante teve como causas, o consumo de água, contato pessoa a pessoa, pessoa-animais ou fonte desconhecida (Ford *et al.*, 2018).

Embora os produtos de origem animal, tais como carne, produtos lácteos e ovos, sejam os principais veículos desse agente, não é rara a sua associação a produtos de origem vegetal, tais como frutas, cereais, especiarias e hortaliças (Cox, *et al.* 2015). Em Minas Gerais, entre 2003 e 2017, 5,7% (4/70) dos surtos foram ocasionados por produtos vegetais (saladas diversas). Segundo Giaccone *et al.* (2012), surtos de DTA por produtos vegetais têm como principal desencadeador o consumo de alimentos frescos ou malcozidos. De acordo com Guillier *et al.* (2020), o risco de humanos serem acometidos por salmonelose é cerca de 1,54 vezes maior após o consumo de vegetais inadequadamente cozidos. Mesquita (2016) relata que alguns produtos vegetais são altamente sujeitos à contaminação por meio da água de irrigação poluída por dejetos fecais. Giaccone *et al.* (2012), por sua vez, associam a contaminação de produtos vegetais por *Salmonella* spp. à habilidade deste patógeno se aderir fortemente às raízes e folhagem dos vegetais. Segundo os autores, esse processo é mediado por flagelos e sorotipo-

dependente. *S. Senftenberg*, por exemplo, apresenta este mecanismo mais desenvolvido que *S. Typhimurium*.

Neste estudo, observou-se forte associação significativa ($p \leq 0,05$) entre a frequência das categorias de alimentos implicadas nos surtos de salmonelose, principalmente, quanto ao consumo de creme de maionese artesanal, causa de 25% dos surtos das DTA ocorridas no Estado de Minas Gerais, entre 2003 e 2017. No Brasil, 7,4% das DTA estão associadas ao consumo de ovos e seus derivados (MS/SVS 2018), possivelmente pela utilização de matéria-prima não inspecionada pelo Serviço de Inspeção local. Segundo Keerthirathne *et al.* (2016), alimentos que utilizam creme de maionese artesanal (produzida com ovos crus não inspecionados) são mais implicados em surtos de salmonelose.

Outros Estados brasileiros também já comprovaram a associação deste alimento com episódios de salmonelose. Em São Paulo, 58,2% dos 167 surtos ocorridos entre 1995 e 2008 tiveram como veículo a maionese artesanal (Simões *et al.*, 2010). No Rio Grande do Sul, produtos à base de ovos e maionese artesanal foram os alimentos incriminados em 39,7% dos 1.148 surtos notificados entre 2000 e 2014 (Klein *et al.*, 2017). Outro estudo, realizado no mesmo Estado, aponta este alimento como principal (17,8%) veículo de DTA por *S. Enteritidis* entre 2007 e 2012 (Capalonga *et al.*, 2014). No Paraná, 45,0% dos alimentos implicados em surtos de salmonelose humana foram associados a preparações a base de ovos, dentre estes, 20,7% correspondiam a maionese artesanal (Kowitz *et al.*, 2010).

Com relação à associação entre os sorotipos e as categorias de alimentos identificados nos surtos de salmonelose ocorridos em Minas Gerais, somente foi identificada correlação positiva ($p \leq 0,05$) entre *S. Enteritidis* e maionese artesanal, sendo este sorotipo identificado em 77,7% (14/18) das amostras de maionese caseira contaminadas pelo gênero *Salmonella* spp. É de amplo conhecimento que a presença de *S. Enteritidis* neste alimento deve-se, principalmente, à contaminação dos ovos, em especial aqueles não inspecionados. Esta contaminação pode ocorrer durante diferentes estágios de sua formação, de seu processamento e embalagem (Keerthirathne *et al.*, 2016). Na transmissão vertical (transovariana), a contaminação ocorre pela passagem direta do patógeno para a gema e o albúmen antes da ovoposição devido à infecção dos órgãos reprodutivos das aves com *Salmonella* spp. Já na transmissão horizontal, a contaminação da bactéria ocorre via casca do ovo, durante ou após a ovoposição (Gantois *et al.*, 2009). Em vários países, ovos são o principal veículo de origem animal na transmissão de *Salmonella* spp. nos surtos de DTA (Gantois *et al.*, 2009; Samilullah, 2013). Na Austrália, este

alimento está associado a 50% dos surtos de salmonelose; no Canadá, a 39% e nos EUA, a 28% (Ford *et al.*, 2018) na União Europeia, a 39,4% (EFSA, 2019); e no Brasil a 38,3% (Mesquita, 2016). Segundo Guillier *et al.* (2020), o risco de humanos serem acometidos por salmonelose veiculada por ovos é, cerca de 2,1 vezes maior para o consumo de ovos inadequadamente cozidos; 3,6 vezes para ovos crus e 1,6 para produtos à base de ovos.

5. CONCLUSÃO

O padrão sorológico das amostras de *Salmonella* ssp. isoladas de alimentos em surtos de DTA em Minas Gerais de 2003 a 2017, não divergiu daquele reportado pelos principais centros de Saúde Pública mundial (CDC, ECDC, EFSA e FDA) e por pesquisas da área, haja vista a predominância de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* dentre os sorotipos identificados. Houve tendência de declínio de *S. Enteritidis* ao longo dos anos, e também associação dos sorotipos de *Salmonella* spp. com produtos de origem animal, em especial creme de maionese artesanal.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Ezequiel Dias (Laboratório de Microbiologia de Alimentos) pela cessão do material biológico alvo deste estudo e estrutura laboratorial para realização dos ensaios biológicos e à Fundação Oswaldo Cruz (Laboratório Nacional de Referência em Enterobactérias) pela sorotipagem das amostras.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.; MEDEIROS, M.I.C.; RODRIGUES, D.P.; FALCÃO, J.P. Genotypic diversity, pathogenic potential and the resistance profile of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983 to 2013 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p.1395–1407, 2015.
- ALMEIDA, F.; SILVA, A.P.; 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**, v. 19, p.145 -151, 2013.
- APHA – American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. In: ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. Capítulo 37, 7ª ed., 2001, 676p.
- BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; SOUZA, S.N; SALLE, S.T.P.; MORAES H.L.S.; NASCIMENTO V.P. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotypes isolated from poultry sources in Brazil. **Brazilian Journal Poultry Science**, v.21, n.1, p.1-8, 2019.
- BEHRAVESH, C.B.; MODY, R.K.; JUNGK, J.; GAUL, L.; REDD, J.T; CHEN, S.; COSGROVE, S.; HEDICAN, E.; SWEAT, D.; HAUSER-CHAVEZ, L.; SNOW, S.L.; HANSON, H.; NGUEN, T.; SODHA, B.; RUSSO, E.; MIKOLEIT, M.; THEOBALD, L.;

- GERNER-SMIDT, P.; HOEKSTRA, R.; ANGULO, F.J.; SWERDLOW, D.; TAUXE, R.; GRIFFIN, P.M, WILLIAMS, I. 2008 Outbreak of *Salmonella* Saintpaul infectious associated with raw produce. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n.10, p.918-927, 2011.
- CABRAL, C.C.; PANZENHAGEN, P.H.N.; DELGADO, K.F.; SILVA, G.R.A.; FRANCO, R.M.; CONTE-JUNIOR, C.A. Contamination of carcasses and utensils in small swine slaughterhouses by *Salmonella* in the northwestern region of the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.80, n.7, p.1128-1132, 2017.
- CÂMARA, S.R.; PORTO, A.L.F.; LAVOR, C.T.B.; SOBRAL, M.H.N.R Salmonelose: fatores envolvidos no processo de diagnóstico e importância para saúde pública. **Ciência Animal**, v. 21, n.1, p.54-64, 2011.
- CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A.M.M.; FALCAO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v.32, p.254-264, 2012.
- CAMPIONI, F.; CAO, G.; KASTANIS, G.; JANIES, D.A.; BERGAMINI, A.M.M.; RODRIGUES, D.P.; STONES, R.; BROWN, E. ALLARD, M.W. Changing of the Genomic Pattern of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in Brazil over a 48 year-period revealed by Whole Genome SNP Analyses. **Scientific Reports**, v. 8, p.1-7, 2018.
- CAMPIONI, F. **Tipagem molecular e análise da diversidade genética de linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, alimentos e frangos no Brasil**. Tese [Doutorado em Genética] - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013. 116p.
- CAPALONGA, R.; RAMOS, R.C.; BOTH, J.M.C.; SOEIRO, M.L.T.; LONGARAY, S.L.M.; HASS, S.; TODNO, E.C. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, n.7, p.811-817, 2014.
- CARBONERA, N.R. **Caracterização fenotípica e genotípica e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* sp. isolada em linha de abate e processamento de frango de corte**. Dissertação [Mestrado em Ciência Animal] - Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2018. 72p.
- CARNEIRO, M.R.P. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* Panama isoladas de fontes humana e não humana na região nordeste do Brasil**. Tese [Doutorado em Ciências Biológicas- Microbiologia] - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009. 75p.
- CARNEIRO, M.R.P.; BERTO, L.H.; OLIVEIRA, J.G.S.; SANTOS, A.F.M.; JAIN, S.; RODRIGUES, D.P.; LONGO, S.E. *Salmonella* Panama: Genetic Diversity of the Isolates Collected from Human and Non-human Sources. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.52, p.1-5, 2019.
- CARTENS, C.K.; SALZAR, J.K.; DARKOH, C. Multistate Outbreaks of Foodborne Illness in the United States Associated with Fresh Produce From 2010 to 2017. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.1-15, 2019.
- CARVALHO, F.C.T.; RODRIGUEZ, M.T.T., MENEZES, F.G.R.; SOUSA, O.V.; HOFER, E.; VIEIRA, R.H.S.F. (2017). Ecotypes and virulence factors of *Salmonella* spp. detected in shrimp farms in State of Ceara, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.39, n.4, p.469-474, 2017.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Surveillance Overview**. 2011. Disponível em: https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf Acesso em março de 2020.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>. Acesso em março de 2020

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Serotypes and the Importance of Serotyping Salmonella**. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/Salmonella/reportspubs/Salmonella-atlas/serotyping importance.html>. Acesso em março de 2020.

CHEN, H.M; WANG, S.W.; HWANG, W.Z.; HSIS, Y.C.; CHIOU, C.S.; TSEN, H.Y. Contamination of *Salmonella* Schwarzengrund cells in chicken meat from traditional marketplaces in Taiwan and comparison of their antibiograms with those of the human isolates. **Poultry Science**, v.89, p.359–365, 2010.

CODA-CERVA - Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie, Centre d'Etude et des Recherches Veterinaires et Agrochimiques. 2014. **Salmonella Serotypes Analyzed at the CODA-CERVA in 2013**. Federal Public Service Health, Food Chain Security 348and Environment, Brussels, Belgium, 2014.

COX, N.A, FRYE, J.G., MCMAHON, W., JACKSON, R.C., RICHARDSON, J., COSBY, D.E., MEAD, G., DOYLE, M.P. **Salmonella**. In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M.L. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 15th ed. Washington: APHA Press, 2015, p.445-475.

DIEP, B.; BARRETO, C.; PORTAMANN, A.C.; FOURNIER, A.; KARCZMAREK, A.; VOETS, G.; LI, S.; DENG, X.; KLIJN, A. *Salmonella* serotyping: comparison of the traditional method to a microarray-based method and an *in silicon* platform using whole genome sequencing data. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.1-8, 2019.

EFSA – European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. **EFSA Journal**, v.13, n.12, p.190, 2015.

EFSA – European Food Safety Authority. The European Union One Health 2018 Zoonosis Report. **EFSA Journal**. v.17, n.12, 2019. 216p.

ENG, S.K.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N.S.A.; SER, H.L.; CHAN, K.G.; LEE, L.H. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v.8, n.3, p.284-293, 2015.

FARDSANEI, F. NIKKHAHI, F., BAKHSHI, B., ZAHRAI SALEIHI, T., ASRAFI TAMAI, I., SOLTAN DALLAL, M.M. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food in human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG)5-PCR and ERIC-PCR. **New Microbes and New Infections**, v. 14, p.24-30, 2016.

FAULA, L.L.; CARLOS, G.A.; MASCARENHAS, L.R.S.; OLIVEIRA, J.V. **A realidade sobre a notificação dos surtos de DTA em Minas Gerais**. 8º Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária. Belo Horizonte, 2019.

FDA – U.S Food and Drug Administration (2018). **FDA investigated multistate outbreak of *Salmonella* Braenderup linked to shell eggs from rose acre farms**. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/fda-investigated-multistate-outbreak-salmonella-braenderup-linked-shell-eggs-rose-acre-farms> Acesso: março de 2019.

FERRARI, R.G.; ROSARIO, D.K.A.; CUNHA-NETO, A.; FIGUEIREDO E.E.S.; CONTE-JUNIOR, C.A. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in AnimalBased Foods: a Meta-analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.85, n.14, p.1-21, 2019.

FORD, L. MOFFARTT, C.R.M.; FEARNLEY, E.; MILLER, M.; GREGORY, J.; SLOAN-GARDNER, T.S.; POLKINGHORNE, B.G.; BELL, R.; FRANKLIN, N.; WILLIAMSON, D.A.; GLASS, K.; KIK, M.D. The Epidemiology of *Salmonella enterica* Outbreaks in Australia, 2001–2016. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v.2, p.1-8, 2018.

FSAI – Food Safety Authority Irland. *Salmonella* species. **Microbial factsheet series**, v.1, 2011. 5p.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F. GAST, R.; HUMPHERY, J.T.; IMMERSEEL, F.V. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, n.4, p.718–738, 2009.

GIACCONE, V.; CATELLANI, P.; ALBERGHINI, L. **Food as cause of Human Salmonellosis**. In: MAHMOUD, B. *Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. Edited by Barakat Mahmoud, Intechopen, 2012. 28p.

GOSSNER, C.M.; HELLO, S.L.; JONG, B.; ROLFHAMRE, P.; FAENSEN, D.; XAVIER-FRANCOIS, W.; GIESECKE. Around the World in 1,475 *Salmonella* Geo-serotypes. **Emerging Infectious Diseases**, v.22, n.7, p.1298-1302, 2016.

GUILIER, L.; THEBAULT, A.; FRAVALO, P.; MUGHINI-GRAS, L.; SILVA, N.J.; DAVID, J.; KOOH, P.; CADAVEZ, V.; GONZALES-BARRON, U. Risk factors for sporadic salmonellosis: a systematic review and meta-analysis. **Microbial Risk Analysis**. p.1-11, 2020.

HINDERMANN, D.; GOPINTH, G.; CHASE, H.; NEGRETE, F.; ALTHUS, D.; ZURFLUH, K.; TALL, B.D.; STEPHAN, R.; NUESCH-INDERBINEN, M. *Salmonella enterica* serovar Infantis de Alimentos e infecções humanas, Suíça, 2010–2015: clones resistentes a múltiplas drogas relacionadas a aves domésticas e uma ESBL emergente produzindo linhagem clonal. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1-9, 2017.

HOLMANN, E. Nontyphoidal Salmonellosis. **Food Safety**, v.32, p.263-269, 2001.

HUNTER, P.; GASTON, M. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: An Application of Simpson's Index of Diversity. **Journal of Clinical Microbiology**. v.26, n.11, p.2465-2466, 1988.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. **Portal de Mapas do IBGE**. Disponível em: <https://portaldemapas.ibge.gov.br/portal.php#mapa222646>. Acesso: julho de 2020.

JACKSON, B.R.; GRIFFIN, P.M.; COLE, D.; WALSH, K.; CHAI, S.J.; Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.8, p.1239-1244, 2013.

JOANA, P.; ISIDRO, A.; PISTA, P.; THEMUDO, P.; VIEIRA, L.; MACHADO, J.; GOMES, J.P. Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Rissen Clusters Detected in Azores Archipelago, Portugal. **International Journal of Genomics**, v. 2019, p.1-9, 2019.

JUDD, M.C.; HOEKSTRA, R.M.; MAHON, B.E.; FIELDS, P.I.; WONG, K.K. Epidemiologic patterns of human *Salmonella* serotype diversity in the USA, 1996–2016. **Epidemiology and Infection**, v.147, n.187, p.1–9, 2019.

KALABA, V.; GOLIC, B.; SLADOJEVIC, Z.; KALABA, D. **Incidence of *Salmonella* Infantis in poultry meat and products and the resistance of isolates to antimicrobials.** 59th International Meat Industry Conference. Earth and Environmental Science, 85, 2017.

KE, B.; SUN, J. HE, D. LI, X. LIANG, Z.; KE, C. Serovar distribution, antimicrobial resistance profiles, and PFGE typing of *Salmonella enterica* strains isolated from 2007–2012 in Guangdong, China. **BMC Infectious Diseases**, v.14, p.1-10, 2014.

KEERTHIRATHNE, T.P.; ROSS, K.; FALLOWFIELD, H.; WHILEY, H. A Review of Temperature, pH, and Other Factors that Influence the Survival of *Salmonella* in Mayonnaise and Other Raw Egg Products. **Pathogens**, v.5, n.63, p.1-11, 2016.

KERKETTA, P.; AGARWAL, R.K. SAILO, B.; KUMAR, P.P.; GOYAL, R.; KATARIA, J.L.; KUMAR, A. Evaluation of ERIC and (GTG)5 fingerprinting to differentiate various serotypes of *Salmonella* from diverse sources. **Indian Journal of Animal Research**, v.51, p.1-7, 2016.

KLEIN, L.R.; BISOGNIN, R.P.; FIGUEIREDO, D.M.S. Study of the epidemiological profile of surveys of water transmission and food diseases in Rio Grande do Sul: a review of records in the state. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v.13, n.25, p.48-64, 2017.

KOTTWIZ, L.B.M.; OLIVERIRA, T.C.R.M.; ALOCER, I.; FARAH, S.M.S.S.; ABRAÃO, W.S.M.; RODRIGUES, D.P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 32, n. 1, p.9-15, 2010.

KOTTWIZ, L.B.M. ***Salmonella* spp.: avaliação epidemiológica de surtos notificados no Paraná e caracterização de amostras epidêmicos e de origem avícola.** Tese [Doutorado em Ciências de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009. 124p.

LOUREIRO, E.C.B.; MARQUES, N.D.B.; RAMOS, F.L.P.; REIS, E.M.F.; RODRIGUES, D.P.; HOFER, E. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.1, p.93-100, 2010.

MACHADO, A.S.R. **Caracterização fenotípica e genotípica de salmonelas isoladas de área rural e urbana de Manaus, Amazonas.** Dissertação [Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia] - Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2013. 106p.

MAJOWICZ, E.C.; MUSTO, J. SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M. O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Food Safety**, v.50, n.6, p.882- 889, 2010.

MBA-JONAS, A.; CULPEPPER, W.; HILL, T.; CANTU, V.; LOERA, J.; BORDERS, J.; SAATHOFF-HUBER, L.; NSUBUGA, J.; ZAMBRANA, I.; DALTON, S.; WILLIAMS, I.; NEIL, K.P. A Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Agona Infections Associated With

Consumption of Fresh, Whole Papayas Imported From Mexico—United States, 2011. **Clinical Infectious Diseases**, v.66, n.11, p.1756-1761, 2018.

MESQUITA, F.B. **Estimativa dos custos associados a surtos de salmonelose veiculada por produtos de origem animal para o Sistema Único de Saúde do Brasil**. Dissertação [Mestrado em Ciência Animal] – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2016. 91p.

MILCZAREK, M.; CZARKOWSKI, M.P.; SADKOWSKA-TODYS, M. Salmonellosis in Poland in 2015 and 2016. **Przegląd Epidemiology**, v.72, n.4, p.419-431, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (MS/SVS). **Manual Técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.** Brasília, 2011. 60p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (MS/SVS). **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília, 2018. Disponível em www.saude.gov.br/svs. Acesso: março de 2020.

PATE, M.; MILUNOVIL, J.; GOLOB, M.; VESTBY, L.K.; OCEPEK, M. *Salmonella* Infantis in Broiler Flocks in Slovenia: The Prevalence of Multidrug Resistant Strains with High Genetic Homogeneity and Low Biofilm-Forming Ability. **BioMed Research International**, p.1-13, 2019.

PARRY, M.S.; ALDRICH, A.A.; CARLSON, A.V.; TROTTER, S.A.; IWEN, P.C.; CIESLAK, T.J. *Salmonella enterica* serotype Panama: An exceptionally virulent cause of illness in children? **SAGE Open Medical Case Reports**, v.7, p.1-7, 2019.

PESSÔA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. **Milieu pour l'identification présomptive rapide des entérobactéries, des aeromonas et des vibrions**. Annales de Microbiologie, 125^a, p.341-347, 1974.

PORNSUKAROM, S.; PATCHANEE, P.; ERDMAN, M.; CRAY, P.F.; WITTUM, T.; LEE, J.; GEBREYES, W.A. Comparative Phenotypic and Genotypic Analyses of *Salmonella* Rissen that Originated from Food Animals in Thailand and United States. **Zoonosis and Public Health**, v.62, p.151–158, 2015.

POWELL, M.R.; CRIM, S.M.; HOEKSTRA, R.M.; WILLIAM, M.S.; GU, W. Temporal patterns in principal *Salmonella* serotypes in the USA; 1996–2014. **Epidemiology and Infection**, v.146, p.437–441, 2018.

PRASERTSSE, T.; CHOKESAJJAWATEZZ, N.; SANTIYANONT, P.; CHUAMMITRI, P.; DEEUDOM, M.; TADEE, P.; PATCHANEE, P. Quantification and rep-PCR characterization of *Salmonella* spp. in retail meats and hospital patients in Northern Thailand. **Zoonosis Public Health**, v.66, n.3, p.301-309, 2019.

PULFORD, C.V.; PEREZ-SEPULVEDA, B.M.; RODWELL, E.V.; WEILL, F.X.; BAKER, K.S.; HINTON, J. (2019). *Salmonella enterica* Serovar Panama, an Understudied Serovar Responsible for Extraintestinal Salmonellosis Worldwide. **Infection and Immunity**, v.87, n.9, p.1-10, 2019.

QI, X.; LI, P.; XIAOGANG, X.; YIQUN, Y. SURRUI, B.; DONGFANG, L. Epidemiological and molecular investigations on *Salmonella* responsible for gastrointestinal Infections in the southwest of Shanghai from 1998 to 2017. **Frontiers Microbiology**, v. 10, p.1-9, 2019.

- RABSCH, W.; SIMON, S.; HUMPHREY, T. **Public health aspects of Salmonella infections**. In: BARROW, P.A.; METHNER, U. *Salmonella* in Domestic Animal. 2^a ed. Boston: CAB International, 2013. 547p.
- RAHMAN, H.S.; OTHMAN H.H. *Salmonella* Infection: The Common Cause of Human Food Poisoning. **Progress in Bioscience and Bioengineering**, v.1, n.1, p.5–10, 2017.
- RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed. The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual report 2016. **European Commission. Health and Food Safety**, 2017. 68p.
- REIS, R.O.; SOUZA, M.N.; CECCONI, M.C.P.; TIMM, L.; IKUTA, N.; SIMON, D.; WOLF, J.M.; LUNGE, V.R. Increasing prevalence and dissemination of invasive nontyphoidal *Salmonella* serotype Typhimurium with multidrug resistance in hospitalized patients from southern Brazil. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, v. 22, n.5, p.424-432, 2018.
- SADKOWSKA-TODYS, M.; CZARKOWISK, M. Salmonellosis in Poland in 2011. **Przegląd Epidemiology**, v.67, n.3, p.467-472, 2013.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 4^a ed. Belo Horizonte, 2015. 256p.
- SAMILULLAH, S. *Salmonella* Infantis, a pothencial human pathogen has association with table eggs. **International Journal of Poultry Science**, v.12, n.13, p.185-191, 2013.
- SANDERSON. K. E., SATHEESH, N. **Taxonomy and Species Concepts in the Genus Salmonella**. In: BARROW, P.A.; METHNER, U. *Salmonella* in Domestic Animal. 2^a ed. Boston: CAB International, 2013. 547p.
- SANJANA, M.; ANDERSON, C.M. MOSCI, R.E.; NEWTON, D.W.; LEPHART, P.; SALIMNIA, H.; KHALIFE, W.; RUDRIK, J.T.; MANNING, S.D. Increasing Frequencies of Antibiotic Resistant Non-typhoidal *Salmonella* Infections in Michigan and Risk Factors for Disease. **Frontiers in Medicine**, v.6, p.1-12, 2019.
- SEVELLEC, Y.; VIGNAUD, M.L.; GRANIER, S.A.; LAILLER, R.; FEURER, C.; HELLO, S.L.; MISTOU, M.Y.; SIXL-CADEL, S. Polyphyletic Nature of *Salmonella enterica* Serotype Derby and Lineage-Specific Host-Association Revealed by Genome-Wide Analysis. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p.1-13, 2018.
- SILVA, C.; PUENTE, J.L.; CALVA, E. *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. **Pathogens and Disease**, v.75, p.1-5, 2017a.
- SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.2, p.88-100, 2002.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A, TANIWAKI, M.H., GOMES, R.A.R., OKAZAKI, M.M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**, 5^aed. São Paulo: Blucher, 2017b. 560p.
- SILVA, Q.M. **Epidemiologia molecular das salmonelas de sete Estados Brasileiros**. Dissertação [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2012. 97p.
- SILVEIRA, L.; PINTO, M.; ISIDRO, J.; PISTA, A.; THEMUDO, P. VIEIRA, L. MACHADO, J. GOMES, J.P. Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* serovar Rissen clusters detected in Azores Archipelago, Portugal. **International Journal of Genomics**, p.1-9, 2019.

SIMÕES, M. ROCHA, M.M.M.; PISANI, B., PRANDI, M.A.G.; LEMES-MARQUES, E.G. *Salmonella* Enteritidis: the significance of the epidemiological investigation, analysis of food and fecal culture for elucidating 167 foodborne outbreaks. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.4, p.497-205, 2010.

SIMON, S.; TROST, E.; BENDER, J.; FUCHS, S.; MALORNY, B.; RABSCH, W.; PRAGER, R.; TIETZE, E.; FLIEGER, A. Evaluation of WGS based approaches for investigating a food-borne outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Derby in Germany. **Food Microbiology**, v.71, p.46-54, 2018.

SIMPSON, K.M.J.; HILL-CAWTHORNE, G.A.; MICHAEL, P.; WARD, M.P.; MOR, S.M. Diversity of *Salmonella* serotypes from humans, food, domestic animals and wildlife in New South Wales, Australia. **Infectious Diseases**, v.18, n. 623, p.2-11, 2018.

TACK, D.M.; RAY, L.; GRIFFIN, P.M.; CIESLAK, P.R.; DUNN, J.; RISSMAN, T.; JERVIS, R.; LATHROP, S.; MUSE, A.; DUWELL, M.; SMITH, K.; TOBIN'D ANGEL, M.; VUGIA, D.J.; KUFEL, J.Z.; WOLPERT, B.J.; TAUXE, R.; PAYNE, D.C. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016–2019. **Center for Diseases Control and Prevention MMWR**. v.169, n.67, p.509-514, 2020.

TEGEGNE, F.M. Epidemiology of *Salmonella* and its serotypes in human, food animals, foods of animal origin, animal feed and environment. **Journal of Food Nutrition Health**, v.2, n.1, p.7-14, 2019.

TEJADA, T.S.; SILVA, C.S.J.; LOPES, N.A.; SILVA, D.T.; AGOSTINETTO, A.; SILVA, E.F.; MENEZES, B.D.; TIMM, C.D. DNA Profiles of *Salmonella* spp. isolated from chicken products and from broiler and human feces. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.18, n.4, p.693-700, 2016.

UNGVARI, A. KARDOS, G., NOEMI, N, IBOLYA, T. PASTZI, J., KISS, I. P.; SPINU, M. DNA Fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis of *Salmonella enterica* serotype Infantis strains isolated from poultry. **Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara**, v.XL, 2007.

VOSS RECH, D., VAZ, C.S.L., ALVES, L. COLDEBELLA, A., LEÃO, A.J. RODRIGUES, D.P.; BACK, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science Association**, v.94, p.433-441, 2015.

XU, Z.; SONG, Q.; LI, C. ZHAN, Y. Characterization of ciprofloxacin-resistant and ESBL-producing *Salmonella enterica* serotype Derby in Eastern China. **BMC Microbiology**, v.19, n.61, p.1-6, 2019.

WEBBER, B.; BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; RIZZO, N.N.; TONDO, E.C.; SANTOS, R.S.; RODRIGUES, L.B.; NASCIMENTO, V.P. Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.61, n.36, p.1-7, 2019.

WHO – World Health Organization (2015). **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. World Health Organization, 255p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>. Acesso em outubro de 2020.

WRIGHT, A.P.; RICHARDSON, L.; MAHON, B.E.; ROTHENBERG, R.; COLE, D.J. The rise and decline in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis outbreaks attributed to egg-

containing foods in the United States, 1973–2009. **Epidemiology & Infection**, v.144, p.810–819, 2016.

YAMASAKI, E.; MATSUZAWA, S.; TAKEUCHI, K.; MORIMOTO, Y.; IKEDA, T.; OKUMURA, K.; KURAZONO, H. Rapid Serotyping of *Salmonella* Isolates Based on Single Nucleotide Polymorphism-Like Sequence Profiles of a *Salmonella*-Specific Gene. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 18, n.1, p.31-40, 2021.

YAMATOIGI, R.S.; GALVÃO, J.A.; BALDINI, E.D.; SOUZA JUNIOR, L.C.T., RODRIGUES, M.V.; PINTO, J.P.A.N. Avaliação da unidade analítica na detecção de *Salmonella* spp. em frangos a varejo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.70, n.4, p.637-640, 2011.

CAPÍTULO II

SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *SALMONELLA* spp. ISOLADAS DE SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA) OCORRIDOS EM MINAS GERAIS/BRASIL

RESUMO

Salmonella spp. é um importante patógeno de origem alimentar em todo o mundo. Nos últimos anos, vários estudos relataram um aumento nas taxas de resistência a antimicrobianos em *Salmonella* spp. procedentes de alimentos. Neste estudo, avaliamos o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 70 amostras de *Salmonella* spp., isoladas de casos de salmonelose humana no Estado de Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2003 a 2017. Um total de 94,3% das amostras de *Salmonella* spp. demonstrou ser resistentes a pelo menos um dos 16 antimicrobianos avaliados. Percentual estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) corroborou a prevalência de resistência aos antimicrobianos nitrofurantoína (71,4%) e ácido nalidíxico (68,6%) e a susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina (40%). Sensibilidade total (100%) foi evidenciada à fosfomicina e imipenem. O principal padrão de resistência (CIP-NAL-NIT), evidenciado em 37,5% das amostras, demonstrou ser fortemente associado ao sorotipo *S. Enteritidis* ($f = 0,0009$; $p \leq 0,05$). O fenótipo de resistência a múltiplos antimicrobianos variou de 10 a 12,8%, dependendo, da metodologia empregada e o principal sorotipo associado foi *S. Typhimurium*. A resistência aos antimicrobianos ampicilina, cefoxitina, ceftazidima e estreptomicina foi significativamente associada ($p \leq 0,05$) com o sorotipo *S. Typhimurium* e a ciprofloxacina com *S. Enteritidis*. Considerando os quatro principais antimicrobianos (nitrofurantoína, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e estreptomicina), frequentemente alvos de resistência por *Salmonella* spp., observou-se uma tendência anual de aumento da resistência à nitrofurantoína (0,56%) e ao ácido nalidíxico (0,46%) e uma expectativa de redução à resistência de ciprofloxacina (-1,18%) e estreptomicina (-1,60%). Concluímos que *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em casos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil, no período de 2003 a 2017, caracterizaram-se por elevada prevalência de resistência às classes terapêuticas quinolona e nitrofurano. A presença de fenótipos resistentes a pelo menos um antimicrobiano (94,3%) e com resistência múltipla, ainda que não expressiva (10 a 12,8%), merece destaque, pois microrganismos resistentes impactam nas respostas das ações terapêuticas e aumentam os índices de morbidade. Esta pesquisa também demonstrou a importância e necessidade de constante vigilância da resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp., um dos principais causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Estado.

Palavras chaves: *Salmonella* spp.. Resistência Antimicrobiana.

ABSTRACT

Salmonella spp. is an important foodborne pathogen worldwide. In recent years, several studies have reported an increase in antimicrobial resistance rates among *Salmonella* spp. isolated from food. In this study, we evaluated the antimicrobial susceptibility profile of 70 samples of *Salmonella* spp., Isolated from cases of human salmonellosis in the state of Minas Gerais/Brazil, from 2003 to 2017. About 94.3% of the bacterial samples demonstrated to be resistant to at least one of the 16 evaluated antimicrobials. Statistically significant percentage ($p \leq 0.05$) corroborated the prevalence of resistance to nitrofurantoin (71.4%) and nalidixic acid (68.6%) antimicrobials and reduced susceptibility to ciprofloxacin (40%). Total sensitivity (100%) was found to imipenem and fosfomycin. The main resistance pattern (CIP-NAL-NIT), evidenced among 37.5% of the samples, proved to be strongly associated with the *S. Enteritidis* serotype ($f = 0.0009$; $p \leq 0.05$). The multidrug resistance phenotype varied from 10 to 12.8%, depending on the methodology used and the main associated serotype was *S. Typhimurium*. Antimicrobial resistance to ampicillin, cefoxitin, ceftazidime and streptomycin was significantly associated ($p \leq 0.05$) with *S. Typhimurium* serotype and ciprofloxacin with *S. Enteritidis*. Among the four main antimicrobials, often subject to resistance by *Salmonella* spp., nitrofurantoin, nalidixic acid, ciprofloxacin and streptomycin, there was an annual tendency towards an increase in the resistance to nitrofurantoin (0.56%) and to nalidixic acid (0.46%) and an expectation of decrease of resistance to ciprofloxacin (-1.18%) and streptomycin (-1.60%). We conclude that *Salmonella* spp. isolated from foods implicated in human salmonellosis in Minas Gerais State were characterized by a high prevalence of resistance to the therapeutic quinolone and nitrofurantoin classes. The presence of resistant phenotypes resistant to at least one antimicrobial (94.3%) and multiple resistant, although not significant (10 to 12.8%) deserves to be highlighted, since resistant microorganism's impact on therapeutic actions and increase morbidity rates. This research also demonstrated the importance and the need for constant surveillance of antimicrobial resistance among *Salmonella* spp., one of the main causes of foodborne disease in the State.

Keywords: *Salmonella* spp.. Antimicrobial Resistance.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella spp. é um importante patógeno de origem alimentar em todo o mundo. Nos últimos anos, alguns estudos relataram um aumento da taxa de resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. procedentes de alimentos (Ejo *et al.*, 2016), principalmente devido ao uso abusivo de antimicrobianos, tanto na terapêutica humana como na utilização em animais (Quesada *et al.*, 2016). Acredita-se que até 2030, o consumo global de antimicrobianos na agricultura deve aumentar 67% e, no Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, esse aumento será de 99%, quase sete vezes mais do que o crescimento populacional humano (Boeckel *et al.*, 2015).

A crescente resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. e outros patógenos em alimentos representa um grave problema de saúde pública (Silva *et al.*, 2018), pois amostras resistentes ou multi-resistentes podem limitar as possibilidades terapêuticas, aumentar os índices de morbidade e agravar quadros de hospitalização (Li *et al.*; 2019; Mukherjee *et al.*, 2019). Segundo Fardsanei *et al.* (2016), ainda que a maioria das infecções por *Salmonella* spp. se caracterizem por uma enfermidade gastrointestinal leve à moderada e auto-limitante, em pacientes de grupo de risco, a infecção pode ser grave e o microrganismo pode se disseminar do sítio intestinal para outros tecidos, ocasionando quadros de bacteremia, septicemia, endocardite ou meningite. Nesta situação, o uso de antimicrobianos eficazes é essencial para o tratamento.

Segundo O'Neill (2016), aproximadamente 700.000 pessoas morrem, anualmente, no mundo, de infecções associadas a microrganismos resistentes a antimicrobianos e, até 2050, estima-se que ocorrerão cerca de 10 milhões de mortes/ano em consequência desta resistência. Diante dessa realidade, estudos epidemiológicos e clínicos regulares podem ajudar na vigilância da resistência dos principais patógenos humanos e na determinação de quando e quais classes terapêuticas devem ser empregadas na terapia antimicrobiana (Abatcha *et al.*, 2014). Neste sentido, o teste *in vitro* de susceptibilidade aos antimicrobianos é uma ferramenta importante para monitorar as tendências de resistência em microrganismos e para orientar a terapia mais adequada (Wang *et al.*, 2019).

Infelizmente, o Brasil não possui um sistema integrado para monitorar a resistência antimicrobiana dos principais patógenos de origem humana e animal (Borges *et al.*, 2019). Frente a este cenário, diversos estudos tentam suprir a ausência de fontes oficiais de informações. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), dados de vigilância sobre o uso

de antimicrobianos são informações de grande valor para orientar as políticas sobre o seu uso desde o nível local ao global (WHO, 2012).

Neste estudo, avaliamos o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 70 amostras de *Salmonella* spp., isoladas de casos de salmonelose humana no Estado de Minas Gerais/Brasil, entre os anos 2003 e 2017, frente a 16 antimicrobianos pertencentes a oito classes terapêuticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras

Um total de 70 amostras de *Salmonella* spp. foi obtido da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Fundação Ezequiel Dias para este estudo. Todas as amostras foram isoladas de alimentos implicados em surtos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017, por meio do método APHA (2001) e mantidas em criopreservação em glicerol 20% à temperatura de - 80°C.

2.2 Determinação do perfil fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana

A caracterização fenotípica da susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Salmonella* spp. foi realizada por meio da técnica de disco-difusão, conforme proposto por Bauer *et al.* (1966). Foram testados os antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) ácido nalidíxico (30µg), ampicilina (10µg), azitromicina (15µg), aztreonam (30µg), cefoxitina (30µg), ceftazidima (30µg), ciprofloxacina (10µg) cloranfenicol (30µg), estreptomicina (5µg), fosfomicina (200µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), nitrofurantoína, (300µg), sulfametoxazol-trimetoprim, (1,25µg/23,75µg) e tetraciclina (30µg).

Previamente ao teste, as amostras de *Salmonella* spp., criopreservadas em glicerol 20% e temperatura de - 80°C, foram submetidas ao cultivo em caldo *Brain Heart Infusion* (Kasvi K25 1048 – Madri, Espanha) e incubação a 37°C em aerobiose por 24-48h. Em seguida, uma alíquota de 10 µL da cultura foi estriada em ágar *Plate Count Agar* (Difco 247940 – Nova Jersey, EUA) e as placas incubadas a 37°C em aerobiose por 18-24h. Colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em 3mL de solução de cloreto de sódio 0,9% até a obtenção da concentração correspondente a 0,5 na escala nefelométrica de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Após esta etapa, um *swab* estéril foi imerso na solução e seu volume dispensado sobre toda a placa de *Muller Hinton Agar* (Difco 98654 – Nova Jersey, EUA) em três diferentes sentidos e nas bordas. Os discos de antimicrobianos foram aplicados a uma distância mínima de 24 mm entre si, e as placas incubadas a 37°C em aerobiose por 18-24h. Os

halos de inibição de crescimento foram aferidos com auxílio de um paquímetro calibrado e os resultados classificados em resistente, parcialmente sensíveis (intermediário) e sensível, conforme orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). O controle interno de qualidade do experimento foi assegurado pelo uso da amostra padrão *Escherichia coli* (ATCC 25922) e por meio de duas repetições do teste.

2.3 Análise estatística

Para determinar a prevalência de *Salmonella* spp. resistentes, amostras classificadas como parcialmente sensíveis (intermediárias) foram incluídas no grupo de resistentes ou não completamente susceptíveis (CDC, 2020a). A multirresistência antimicrobiana foi determinada por meio da identificação de resistência a três ou mais classes terapêuticas (CDC, 2020a) e por meio índice *MAR* (Múltipla Resistência a Antimicrobianos), definido a partir da relação a/b, em que “a” representa o número de antimicrobianos para qual o isolado foi resistente e “b” o quantitativo de antimicrobianos testados. Valores de *MAR* acima de 0,2 caracterizam multirresistência (Krumperman, 1983; Silva *et al.*, 2012; Jaja *et al.*, 2019). Para monitorar a tendência anual de resistência aos principais antimicrobianos, utilizou-se a análise de regressão linear simples (Sampaio, 2015). Os testes Qui-quadrado (χ^2) por aderência e Exato de Fischer foram usados para a frequência das variáveis dicotômicas (resistência ou não) e para identificar associações significativas entre os perfis de resistência e os sorotipos de *Salmonella* spp., respectivamente, conforme proposto por Sampaio (2015). Para ambos os ensaios estatísticos, o nível de significância menor que 5% ($p \leq 0,05$) foi considerado significativo.

3. RESULTADOS

A susceptibilidade antimicrobiana das 70 amostras de *Salmonella* spp. (13 sorotipos) procedentes de alimentos implicados em DTA em Minas Gerais/Brasil, entre 2003 e 2017, foi monitorada frente a 16 antimicrobianos (oito classes terapêuticas), conforme tabela 1.

Tabela 1: Frequência de susceptibilidade antimicrobiana pelo teste de disco-difusão de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/ Brasil, entre 2003 e 2017

ANTIMICROBIANO	Frequência absoluta (%)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Estreptomicina – EST	60 (85,6)	5 (7,2)	5 (7,2)
Gentamicina – GEN	69 (98,6)	1 (1,4)	---
Ampicilina – AMP	69 (98,6)	1 (1,4)	---
Aztreonam – ATM	69 (98,6)	---	1 (1,4)
Cefepime – CPM	68 (97,2)	---	2 (2,8)
Cefoxitina – CFO	67 (95,8)	---	3 (4,2)
Ceftazidima – CAZ	66 (94,4)	---	4 (5,6)
Imipenem – IMP	70 (100)	---	---
Cloranfenicol – CLO	69 (98,6)	---	1 (1,4)
Sulfametoxazol/Trim – SUT	69 (98,6)	---	1 (1,4)
Azitromicina – AZI	68 (97,2)	---	2 (2,8)
Nitrofurantoína – NIT	11 (15,7)	9 (12,9)	50 (71,4)
Fosfomicina – FOS	70 (100)	---	---
Ácido Nalidixílico – NAL	22 (31,4)	---	48 (68,6)
Ciprofloxacina – CIP	42 (60,0)	28 (40,0)	---
Tetraciclina – TET	66 (94,4)	---	4 (5,6)

Um percentual significativo ($p \leq 0,05$) de amostras resistentes foi identificado para os antimicrobianos nitrofurantoína (71,4%) e ácido nalidixílico (68,6%). Susceptibilidade reduzida foi, principalmente, identificada para a ciprofloxacina (40%). Entretanto, nenhuma das amostras apresentou resistência ao mesmo. Sensibilidade total (100%) foi evidenciada ao imipenem e à fosfomicina. Com relação aos demais antimicrobianos, observou-se que a taxa de sensibilidade de *Salmonella* spp. oscilou entre 85,5 a 98,6%.

Os resultados dos antibiogramas, considerando os quatro antimicrobianos com mais relato de resistência por *Salmonella* spp., nitrofurantoína (84,3%), ácido nalidixílico (68,6%), ciprofloxacina (40%) e estreptomicina (14,4%), apresentaram diferentes oscilações na tendência linear de resistência ao longo do período analisado. De acordo com a análise de regressão linear, para cada ano que se passou, foi previsto um aumento percentual de 0,56% e

0,46% na frequência de *Salmonella* spp. resistentes à nitrofurantoína e ácido nalidíxico, respectivamente. Para ciprofloxacina e estreptomicina, a expectativa é de redução, -1,18% e -1,60%, respectivamente (Figura 1).

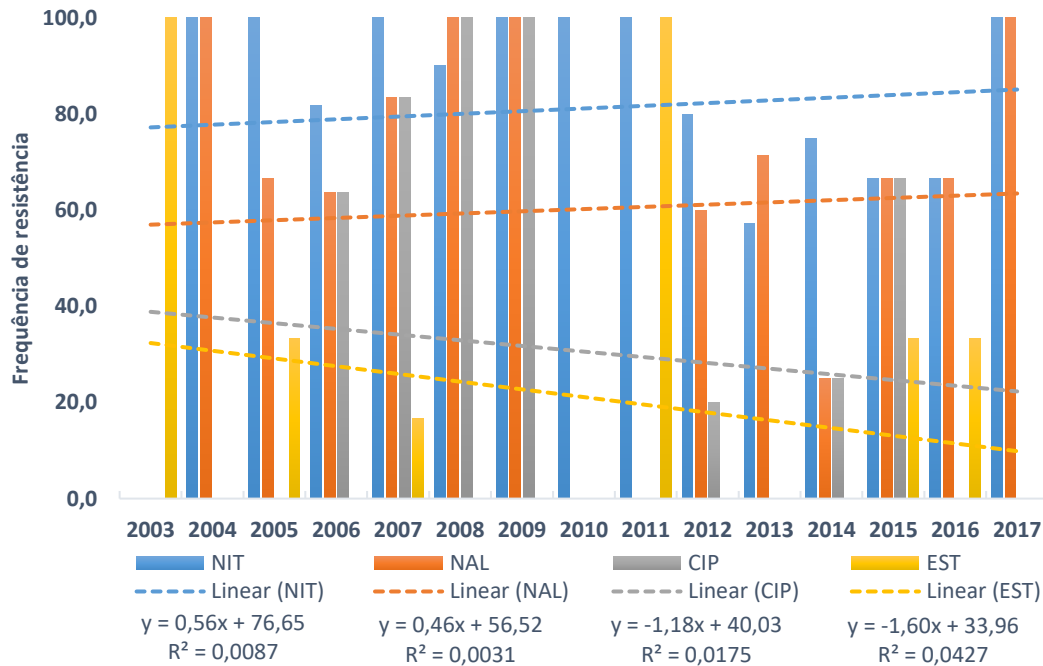


Figura 1: Avaliação anual da frequência relativa e da tendência linear de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, ao longo dos anos 2003 a 2017, resistentes à NIT (nitrofurantoína), NAL (ácido nalidíxico), CIP (ciprofloxacina) e EST (estreptomicina).

Um total de 94,3% das amostras de *Salmonella* spp. demonstrou ser resistentes a pelo menos um dos 16 antimicrobianos avaliados (Tabela 2). Após estratificarmos as amostras de *Salmonella* spp. em 13 sorotipos, observamos a presença de resistência antimicrobiana em 12 (92,3%). Sensibilidade a todos os antimicrobianos somente foi observada em uma amostra de *S. Infantis* e duas de *S. Enteritidis* e uma de *S. Heidelberg*. O perfil de resistência (CIP-NAL-NIT), extremamente significativo ($p \leq 0,05$), foi evidenciado em 37,5% das amostras, e fortemente associado ao sorotipo *S. Enteritidis* ($f = 0,0009$; $p \leq 0,05$). Sete amostras (10%) apresentaram fenótipo de múltipla resistência, segundo índice *MAR* (*MAR* 0,25 a 0,44) e nove (12,8%) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano de três classes distintas. Entre as bactérias com fenótipo de múltipla resistência antimicrobiana, destaca-se uma amostra de *S. Typhimurium*, cuja resistência foi associada a sete antimicrobianos e cinco classes terapêuticas.

Tabela 2: Perfil de susceptibilidade antimicrobiana pelo teste de disco-difusão de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/ Brasil, entre 2003 e 2017

Perfil de susceptibilidade	n (%)	MAR	Sorotipos
SENSÍVEL (a todos os antimicrobianos)	04 (5,7)	0,0	SE, SH, SI
CIP	01 (1,4)	0,06	Se
EST	02 (2,9)	0,06	ST
NAL	01 (1,4)	0,06	ST
NIT	10 (14,3)	0,06	SB, SE, SH, SSa
EST - NIT	03 (4,3)	0,13	ST
NAL - NIT	13 (18,6)	0,13	SAg, SD, SP, SE, ST
NAL - TET	01 (1,4)	0,13	SAb
CAZ - NAL - NIT	01 (1,4)	0,19	SE
CIP - NAL - NIT	25 (35,7)	0,19	SC, Se, SE, SH
ATM - CPM - NIT	01 (1,4)	0,19	SE
NAL - NIT - TET	01 (1,4)	0,19	SR
EST - CIP - NAL - NIT	01 (1,4)	0,25	ST
AMP- CLO - EST - SUT - TET	01 (1,4)	0,31	SH
ATM - AZI - CIP - CPM- NAL	01 (1,4)	0,31	SC
EST - CAZ - CFO - NAL - NIT	02 (2,9)	0,31	ST
ATM - AZI - CPM - NAL - NIT - TET	01 (1,4)	0,38	SSc
EST - CAZ - CFO - GEN - IPM- NAL - NIT	01 (1,4)	0,44	ST

Legenda: NAL – ácido nalidíxico; AMP – ampicilina; AZI – azitromicina; ATM –aztreonam; CPM – cefepime; CFO – cefoxitina; CAZ – ceftazidima, CIP – ciprofloxacina; CLO– cloranfenicol; EST – estreptomicina; FOS – fosfomicina; GEN – gentamicina; IMP – imipenem; NIT – nitrofurantoína; SUT – sulfametoxazol-trimetoprim; TET – tetraciclina; SAg – *S. Agona*; SAb – *S. Abony*; SB – *S. Braenderup*, SC – *S. Corvallis*; SD – *S. Derby*; SE – *S. Enteritidis*; Se – *S. enterica*; SH – *S. Heidelberg*; SI – *S. Infantis*; SP – *S. Panama*; SR – *S. Rissen*; SSa – *S. Saintpaul*; SSc – *S. Schwarzengrund*; ST – *S. Typhimurium*; MAR – Índice de Múltipla Resistência – Perfis com grifos em negrito são considerados multirresistentes, segundo CDC (2020³).

Embora o percentual de amostras efetivamente consideradas multirresistentes seja classificado como baixo (12,8%) segundo critério do CDC e 10%, segundo índice MAR, observou-se que, de acordo com o índice MAR, grande parte das amostras (40%) se encontra no limiar (0,19) da multi-resistência antimicrobiana, conforme demonstrado na figura 2.

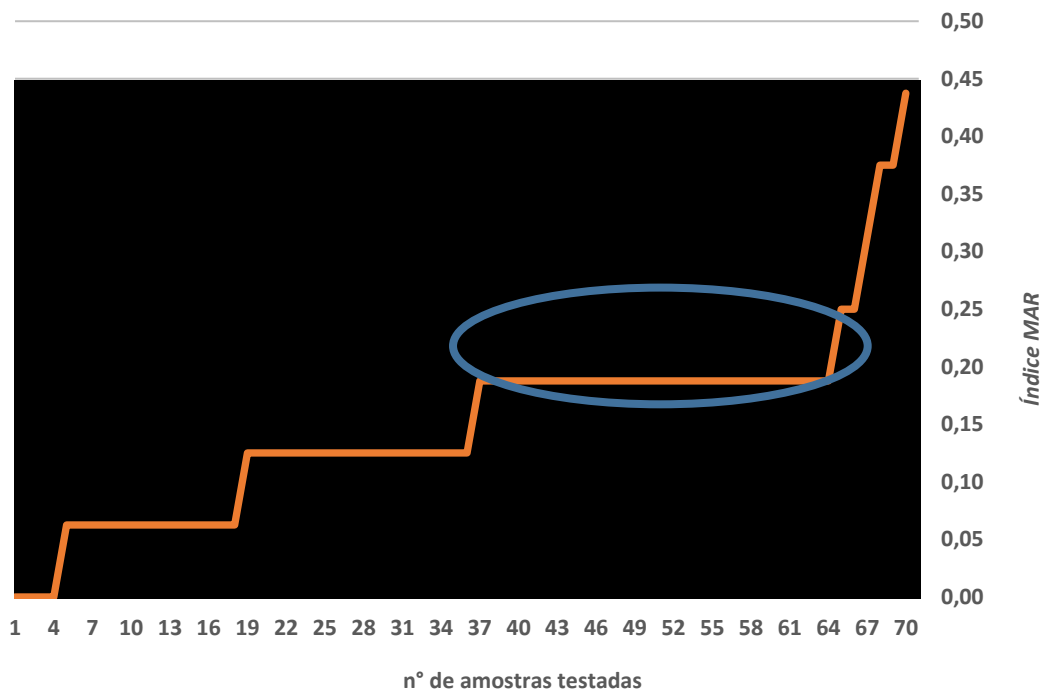


Figura 2: Avaliação do índice de múltipla resistência (*MAR*) em amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Estado de Minas Gerais/ Brasil, entre 2003 e 2017.

A frequência de susceptibilidade antimicrobiana variou segundo o sorotipo (Figura 3). Em relação a *S. Enteritidis* (n=40), a taxa de resistência oscilou de 2,5 a 95,0% segundo o antimicrobiano avaliado (ceftazidima, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína e tetraciclina). Para *S. Typhimurium* (n=12), essa variação foi menor (8,3 a 75,0%), porém, com uma maior variabilidade de resistência antimicrobiana (ampicilina, ceftazidima, cefoxitina, ciprofloxacina, estreptomicina, gentamicina, imipenem, ácido nalidíxico e nitrofurantoína). Todas as amostras de *S. Enteritidis* de *S. Typhimurium* foram consideradas susceptíveis aos fármacos aztreonam, azitromicina, cloranfenicol, cefepime, fosfomicina e sulfametoxazol/trimetopim.

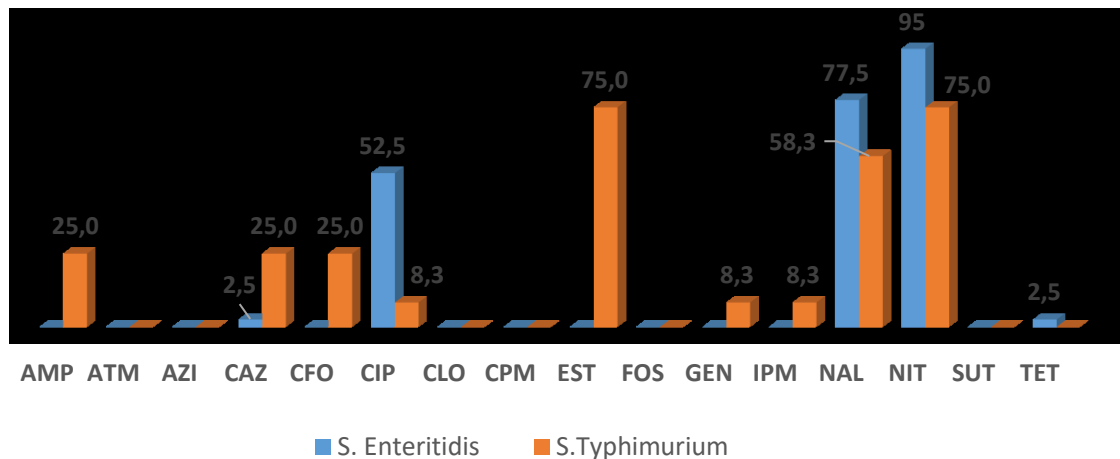


Figura 3: Frequência relativa (%) de *S. Enteritidis* (n=40) e *S. Typhimurium* (n=12), isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Estado de Minas Gerais/ Brasil, entre 2003 e 2017, resistentes a diferentes antimicrobianos.

Legenda: AMP – ampicilina; ATM – aztreonam; AZI – azitromicina; CAZ – ceftazidima, CFO – cefoxitina; CIP – ciprofloxacina; CLO – cloranfenicol; CPM – cefepime; EST – estreptomicina; FOS – fosfomicina; GEN – gentamicina; IPM – imipenem; NAL – ácido nalidíxico; NIT – nitrofurantoína; SUT – sulfametoxazol-trimetoprim e TET – tetraciclina.

Além de oscilações na frequência de susceptibilidade segundo o sorotipo, observou-se associação ($p \leq 0,05$) de resistência entre *S. Typhimurium* e os seguintes antimicrobianos: ampicilina, cefoxitina, ceftazidima e, principalmente, estreptomicina. Para o sorotipo *S. Enteritidis* esta associação somente foi evidenciada com ciprofloxacina (Tabela 3).

Tabela 3: Associação entre a resistência a um determinado antimicrobiano e os sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Estado de Minas Gerais/ Brasil, entre 2003 e 2017

Antimicrobiano	Sorotipo		Valor <i>f</i> ($p \leq 0,05$)
	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	
Ampicilina		X	0.034
Cefoxitina		X	0.010
Ceftazidima		X	0.034
Estreptomicina		X	0.0
Ciprofloxacina	X		0.008

Legenda: “X” indica associação de resistência entre o sorotipo e o antimicrobiano ($p \leq 0,05$)

O menor número de amostras dos demais sorotipos limitou o estabelecimento de associações estatísticas entre os mesmos e a susceptibilidade antimicrobiana. Dessa forma, a frequência absoluta de amostras resistentes entre estes sorotipos e os antimicrobianos avaliados é demonstrada na Figura 4.

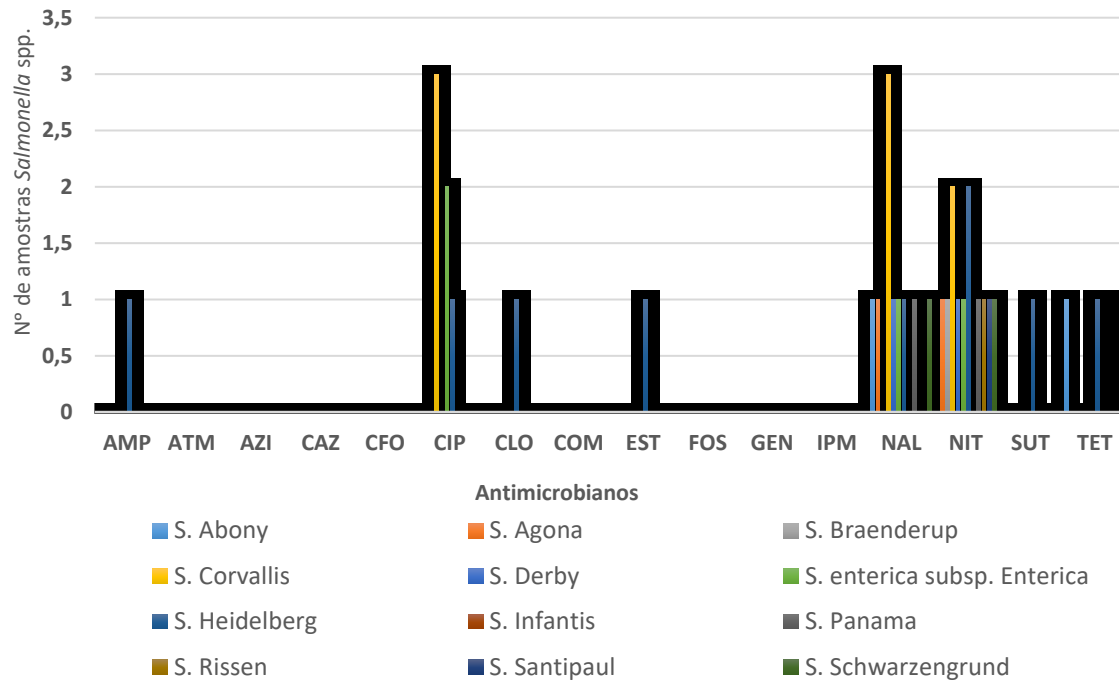


Figura 4: Frequência absoluta de resistência antimicrobiana entre diferentes sorotipos *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em casos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil, entre 2003 e 2017.

4. DISCUSSÃO

Salmonella spp. é considerada a segunda maior causa de infecções gastrointestinais no mundo (Lamas *et al.*, 2018), respondendo por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países emergentes quanto nos desenvolvidos (Majowicz *et al.*, 2010). Sua patogênese nos seres humanos se manifesta por diarreia, vômitos, náusea, dor de cabeça, cólicas abdominais, mialgias e artralgias (Farahani *et al.*, 2018). O período de incubação varia de 6 a 12 horas e os sintomas são, geralmente, autolimitantes (Eng *et al.*, 2015).

Normalmente, não há indicação terapêutica de antimicrobianos para a maioria dos casos de salmonelose humana. Entretanto, há relato de prescrições para até 40% dos pacientes (Souza *et al.*, 2010), principalmente de penicilinas, macrolídeos, sulfametoxazol-trimetopim, fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração (Mukherjee *et al.*, 2019). As duas últimas

classes, geralmente, têm sido prescritas em enfermidades invasivas, como bacteremia e meningite (Medalla *et al.*, 2017). Isso torna a resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp., principalmente às fluoroquinolonas e cefalosporinas, grave problema de saúde mundial, devido a alta taxa de morbidade e de mortalidade e ao alto custo terapêutico (Ejo *et al.*, 2016).

Prescrições inadequadas são comuns em vários sistemas de saúde no mundo. No Brasil, por exemplo, a regulamentação sobre a prescrição médica de antimicrobianos, somente foi publicada em 2010, por meio da RDC nº 44, da ANVISA, que condicionou a dispensa desses medicamentos em drogarias à apresentação da prescrição médica (ANVISA, 2010). Em muitos países, pelo menos dois terços da população utilizam antimicrobianos sem prescrição médica por um ou até três dias (Nicolini *et al.*, 2008). No mundo, 50% das prescrições ocorrem irregularmente (WHO, 2012). Exclusivamente no Brasil, a dispensa de antimicrobianos supera a de fármacos como analgésicos/antitérmicos (Martins *et al.*, 2015) e corresponde a 22,7 doses diárias por mil habitantes, com uma diferença de até quatro vezes entre países de menor consumo (WHO, 2018).

O uso indevido de antimicrobianos na produção animal também agrava a disseminação da resistência a essas drogas. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) identificou pelo menos 110 países, principalmente aqueles em desenvolvimento e emergentes, cuja legislação para o uso de antimicrobianos não é pertinente ou, totalmente inexistente. Para mitigar os impactos desse cenário, a *European Medicines Agency* (EMA) categorizou os antimicrobianos em quatro classes, A, B, C e D, considerando o risco que o uso animal acarreta à saúde pública e ao desenvolvimento de resistência (EMA, 2019). A categoria A contempla antimicrobianos proibidos para uso animal; o grupo B restringe a utilização de quinolonas, cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e polimixinas, por serem extremamente importantes para uso humano; C especifica classes que, embora existam indicações terapêuticas humanas alternativas, devem ser empregadas com cuidado na produção animal e D reporta aquelas cuja utilização animal é liberada, porém, de modo racional.

Segundo O'Neill (2016), cerca de 700.000 pessoas morrem, anualmente, no mundo, de infecções associadas a microrganismos resistentes a antimicrobianos e, até 2050, estima-se que ocorrerão cerca de 10 milhões de mortes/ano em consequência deste fenômeno. Nos EUA, anualmente, pelo menos 2,8 milhões de pessoas são contaminadas com bactérias ou fungos resistentes aos antimicrobianos e mais 35.000 morrem de infecções por estes microrganismos (CDC, 2020b). Neste mesmo país, em 2019, foram notificados mais de 212 mil casos de

infecções e 70 óbitos por *Salmonella* spp. resistentes a diversas classes de antimicrobianos (CDC, 2019).

Por meio de colaboração entre as Agências CDC e FDA, o Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana para Bactérias Entericas (NARMS) estimou a incidência de infecções por *Salmonella* spp. nos EUA a partir de registros gerados de 2004 a 2012. Esta incidência foi de 1,07/100.000 pessoas para *Salmonella* resistentes à ampicilina, 0,51/100.000 à ceftriaxona e à ampicilina e 0,35/100.000 à ciprofloxacina (Medalla *et al.*, 2017). O custo estimado para tratar infecções por patógenos resistentes neste país é de, aproximadamente, 365 milhões de dólares/ano (Mukherjee *et al.*, 2019).

Desde que foi relatado o primeiro caso de resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. na década de 1960 (Eng *et al.*, 2015), dados mundiais de vigilância demonstraram um aumento nas taxas de resistência de 20% na década de 1990 para mais de 70% em 2000, dependendo do sorotipo e do antimicrobiano (Su *et al.*, 2004). Em nosso experimento, resultados do antibiograma de 70 amostras de *Salmonella* spp. (13 sorotipos), implicadas em surtos de DTA ocorridos em Minas Gerais entre 2003 e 2017, demonstraram 94,3% das amostras resistentes a pelo menos um dos 16 antimicrobianos testados. Um total de 24,2% das amostras bacterianas foi resistente a dois antimicrobianos, 41,4% a três e 10% a mais de cinco (Tabela 1). Taxas de resistência tão elevadas como estas ou em constante ascensão são rotineiramente reportadas em algumas pesquisas e Relatórios Internacionais de monitoramento da resistência antimicrobiana (O'Neill, 2016).

No estudo de Rowlands *et al.* (2014), por exemplo, 51,9% das 237 amostras de *Salmonella* spp. (51 sorotipos) foram resistentes a um dos antimicrobianos testados. Reis *et al.* (2018) reportaram 75,7% de resistência em 280 amostras de *S. Typhimurium* isoladas de fonte humana. Em um monitoramento realizado no Japão com 917 amostras de origens humana e alimentar, 40% das amostras procedentes de humanos e 90% daquelas isoladas de alimentos apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos (CVHO, 2017). Vários autores apontam que em amostras de *Salmonella* spp. coletadas de fontes animais o índice de resistência poder ser maior. Li *et al.* (2019) reportaram elevada resistência (91,2%) em 80 amostras (sete sorotipos) identificadas em um fluxograma de abate de suínos. Borges *et al.* (2019), por sua vez, relataram baixa susceptibilidade antimicrobiana (3,1%) em 163 amostras *Salmonella* spp. (11 sorotipos) de origem avícola. Acredita-se que este padrão de resistência em amostras de *Salmonella* spp. isoladas de animais esteja associado ao alto consumo de antimicrobianos na cadeia produtiva

de alimentos de origem animal. Até 2030, o consumo de antimicrobianos neste segmento, em países como Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, deve aumentar 99%, cerca de sete vezes mais do que o crescimento populacional humano (Boeckel *et al.*, 2015).

Neste estudo, um percentual extremamente significativo ($p \leq 0,05$) de *Salmonella* spp. apresentou alto nível de resistência à nitrofurantoína (71,4%) e ao ácido nalidíxico (68,6%) (Tabela 1). Nossos resultados também apontaram uma tendência para aumento na disseminação de resistência a estas drogas ao longo dos anos (0,56% para nitrofurantoína e 0,46% para ácido nalidíxico). Estes dados estão de acordo com uma revisão sistemática de estudos epidemiológicos realizada em 21 países da América Latina para analisar a prevalência de *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos isoladas de alimentos. Nesta pesquisa, *Salmonella* spp. foi frequentemente reportada como altamente resistente ao ácido nalidíxico em quase todos os estudos (19 de 21) (Quesada *et al.*, 2016).

Na Europa, dados de vigilância extraídos da análise de 135 mil amostras de *Salmonella* spp. de origem humana revelaram que, em média, 20% das amostras são resistentes ao ácido nalidíxico (Calderón *et al.*, 2012). No Brasil, os índices de resistência à nitrofurantoína (59,2%) e ao ácido nalidíxico (34,2%) também foram significativos em 280 amostras obtidas de casos de salmonelose humana (Reis *et al.*, 2018). Fardnasei *et al.* (2016) também descreveram resistência a estes dois antimicrobianos, como principal padrão em *S. Enteritidis* procedente de fontes humana e alimentar.

O crescente índice de resistência ao ácido nalidíxico representa um potencial risco à saúde pública, haja vista a sua correlação positiva com a susceptibilidade reduzida a ciprofloxacina (Eng *et al.*, 2015), considerada como antimicrobiano de primeira escolha no tratamento de salmonelose humana (Souza *et al.*, 2010). Na África Subsaariana, este antimicrobiano é comumente prescrito para pacientes com doenças entéricas, juntamente com outras fluoroquinolonas importantes (levofloxacina, ofloxacina e norfloxacina) (Kagambèga *et al.*, 2018). Em nosso estudo, 28 (56,3%) amostras bacterianas resistentes ao ácido nalidíxico também demonstraram resistência intermediária à ciprofloxacina. Entretanto, não foi observada correlação positiva entre ambos ($p \leq 0,05$). Enquanto a resistência ao ácido nalidíxico ascende (0,46%/ano), para ciprofloxacina, a expectativa é de redução (-1,18% ao ano) (Figura 1).

Este cenário não se assemelha ao reportado em outras pesquisas ou agências de monitoramento. Segundo a Agência FDA, a taxa de *Salmonella* spp. isoladas de humanos com susceptibilidade

reduzida a ciprofloxacina mais que dobrou desde 2013, alcançando 8% em 2017 (FDA, 2019). Na Austrália, a resistência a esta base terapêutica vem aumentando, com taxas oscilando de 0,1% em 1995 para 7,8% em 2015 (Williamson *et al.* 2018). Na Europa, 13% de *Salmonella* spp. de origem humana são resistentes a ciprofloxacina (EFSA, 2020). É possível que a diminuição na prevalência do sorotipo *S. Enteritidis* (0,73%), reportada neste estudo (Capítulo I), tenha corroborado para redução da resistência à ciprofloxacina (-1,18% ao ano), pois *S. Enteritidis* é um dos principais sorotipos implicados na susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina. Neste trabalho, a resistência à ciprofloxacina está fortemente associada à *S. Enteritidis* ($f = 0,008$; $p \leq 0,05$) quando comparada com o segundo sorotipo mais prevalente *S. Typhimurium*.

Dados similares foram demonstrados em outros trabalhos. Borges *et al.* (2019) comprovaram a associação de resistência à ciprofloxacina em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* ao analisarem 163 amostras de *Salmonella* spp. (11 sorotipos). Correlação positiva entre a resistência de *S. Enteritidis* a ciprofloxacina também foi reportada durante a análise de 15.897 sorotipos nos EUA entre 2008 e 2014 (Karp *et al.*, 2018). Segundos os autores, 38% (186/489) das amostras não susceptíveis à ciprofloxacina eram do sorotipo *S. Enteritidis*. Para o FDA (2019), o aumento de susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina em amostras isoladas de humanos se deve, em grande parte, a infecções por *S. Enteritidis* e pode estar relacionado a viagens internacionais.

O potencial de *Salmonella* spp. para evadir da ação antimicrobiana das quinolonas deve-se, principalmente, às mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, responsáveis por codificar as enzimas DNA girase e topoisomerase IV (Souza *et al.*, 2010). A DNA girase é responsável pela compactação do DNA dentro da célula bacteriana e a topoisomerase IV pelo enrolamento e desenovelamento do mesmo durante sua replicação (Guimaraes *et al.*, 2010). Além dessas mutações, um segundo modo de ação envolve mudanças na expressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC, por meio de mutações nos genes reguladores *marRAB* e *soxR* (Abatcha *et al.*, 2014). Estes dois mecanismos são responsáveis por desencadear a resistência de alto nível às quinolonas em *Salmonella* spp. (Su *et al.*, 2004). Um terceiro e não menos importante mecanismo, envolve a transmissão de resistência mediada por plasmídeo (*Plasmid mediated quinolone resistance* - PMQR), em especial pelos genes da família *qnr* (Tyson *et al.*, 2017). Este mecanismo de transmissão está aumentando neste patógeno, conforme demonstrado por Karp *et al.* (2018), ao evidenciarem que 94% das amostras de *Salmonella* spp. (34 sorotipos) apresentavam pelo menos um dos genes da família *qnr*.

Alta prevalência de *Salmonella* spp. resistentes à nitrofurantoína (71,4%) e tendência a elevação (0,56%/ano) merecem destaque neste trabalho. Em geral, *Salmonella* spp. é um dos gêneros da família Enterobacteriaceae com os maiores níveis de resistência aos nitrofuranos e isto se deve a alterações nas enzimas nitroredutases *nfsA* e *nfsB* e a transferência de resistência conjugativa (Martinez-Punchol *et al.*, 2020). Garcia *et al.* (2017), ao analisarem a incidência e as bases genéticas desta resistência em 101 amostras de *S. Typhimurium* DT 104 e pUO-StVR2 isoladas de espécimes humanos, relataram que 32,4% dos clones DT104 e todos os pUO-StVR2 foram resistentes à nitrofurantoína e muitos compartilhavam alterações idênticas em *nfsA* e *nfsB*. Em amostras bacterianas isoladas de animais de produção (suínos, bovinos e aves), os percentuais de resistência a este antimicrobiano podem ser maiores, como demonstra Cardoso *et al.*, (2006) ao identificarem 90% de resistência antimicrobiana em 80 amostras de *S. Enteritidis* procedentes de carcaças de frango.

Para mitigar a elevada prevalência de patógenos resistentes aos nitrofuranos, o Brasil proíbe, desde 2003, o seu uso em animais para fins terapêuticos ou como promotores de crescimento (MAPA, 2003). Como resultado desta e outras medidas, nenhum traço de resíduo deste antimicrobiano foi encontrado em 12.495 análises realizadas em produtos de origem animal pelo Programa Brasileiro de Monitoramento de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) (MAPA, 2018). Espera-se que, em médio e longo prazo, a proibição do emprego de nitrofuranos na cadeia produtiva animal, contribua para redução na seleção e circulação de *Salmonella* spp. resistentes a esta classe terapêutica.

Moderada resistência à estreptomicina (14,4%) nas 70 amostras de *Salmonella* spp. e forte associação ($f = 0,000$, $p \leq 0,05$) com o sorotipo *S. Typhimurium* (83,3%), foi identificada neste trabalho. Reis *et al.* (2018), ao analisarem 237 amostras de *Salmonella* (51 sorotipos) associadas a infecções, observaram ampla diversidade de sorotipos (35/51) resistentes a este antimicrobiano, principalmente *S. Infantis* (80%), *S. Typhimurium* (80%) e *S. Enteritidis* (58,7%). Segundo os autores a elevada frequência de resistência encontrada para este aminoglicosídeo parece estar associada ao seu intenso uso na avicultura e suinocultura.

Almeida *et al.* (2018) afirmam que, embora a estreptomicina não seja frequentemente utilizada no tratamento humano de infecções por *Salmonella* spp., ela tem sido comumente empregada na produção animal e, por este motivo, pode servir como marcador de resistência para amostras bacterianas identificadas na cadeia alimentar. Em estudo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a partir de 250 amostras de *Salmonella* spp. (18 sorotipos) isoladas de

carcaças de frango coletadas em 14 estados do Brasil, observou-se alto percentual de resistência (89,3%) à estreptomicina (ANVISA, 2008; Mendonça, 2016).

Diferentemente dos nossos dados e de outros relatos, Campioni *et al.* (2012) não verificaram resistência à estreptomicina em 128 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de surtos de DTA no Brasil ao longo de 24 anos. Divergências de prevalência entre estes estudos devem considerar a metodologia aplicada. Almeida *et al.* (2018), por exemplo, observaram que 35 amostras de *S. Typhimurium* coletadas de fontes humana e alimentar no Brasil carregavam vários genes de resistência à estreptomicina; contudo, estas eram fenotipicamente susceptíveis no antibiograma (disco-difusão). No estudo de Mukherjee *et al.*, (2019), somente 0,5% das 198 amostras de *Salmonella* spp. procedentes de casos de salmonelose humana nos EUA entre 2011 e 2014 foi considerado resistente à gentamicina. Na ocasião, a susceptibilidade aos antimicrobianos foi baseada no emprego da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas *Sensititre GN4F Trek* conforme instruções do fabricante.

A identificação de *Salmonella* spp. multidrogas resistente (MDR) tem despertado a atenção de pesquisadores e governos em todo o mundo. Amostras MDR de *Salmonella* spp. estão associadas ao aumento de hospitalizações, mortes e ao custo do tratamento (Magiakros *et al.*, 2012). Devido à ausência de padronização internacional sobre os tipos, classes e quantitativo de antimicrobianos que devem ser empregados para definição de microrganismos multidrogas resistentes utilizamos o índice *MAR* (Krumperman, 1983; Silva *et al.* 2012; Jaja *et al.* 2019) e as orientações do NARMS (CDC 2020a). No primeiro, os microrganismos são considerados MDR se índice *MAR* for superior a 0,2; no segundo se apresentarem resistência a pelo menos um antimicrobiano de três ou mais classes terapêuticas. Neste trabalho, 10% (7/70) das amostras apresentaram índice *MAR* maior que 0,2 e 12,8% (9/70) foram resistentes a mais de três classes terapêuticas.

De acordo como o Sistema de Vigilância Europeu, 15% das amostras bacterianas de *Salmonella* spp. isoladas de humanos apresentam fenótipo MDR (Eng *et al.*, 2015). Nos EUA, a múltipla resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. tem permanecido em torno de 10% nos últimos dez anos (FDA, 2019). Em 2017, o sorotipo I4,[5],12:i:- representou 25% das amostras de *Salmonella* spp. MDR, 80% delas com resistência múltipla à ampicilina, estreptomicina, sulfisoxazol e tetraciclina (ASSuT) (FDA, 2019). Percentuais semelhantes ao nosso foram observados em amplo estudo de monitoramento de resistência na Austrália, envolvendo 54.451

amostras de *Salmonella* spp. não tifoide ao longo de 35 anos. Neste estudo, as taxas de MDR oscilaram de 3,4% a 9,7% (Williamson *et al.*, 2018).

Em serviços de saúde humana e animal, a evidência de *Salmonella* spp. MDR além de limitar as opções terapêuticas, está associada a alta taxa de morbidade pelo patógeno em comparação com amostras pansensíveis, devido às limitações terapêuticas da primeira (Wang *et al.*, 2019). Mukherjee *et al.* (2019) observaram que infecções por *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos foram associadas a internações hospitalares mais longas, em média 5,9 dias, contra 4,0 dias para pacientes infectados com *Salmonella* spp. não resistentes. Neste trabalho, os autores afirmam que já foram comprovadas associações entre a resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. e mortalidade, hospitalização, tempo de internação hospitalar e necessidade de cirurgia. Varma *et al.* (2005) também observaram maior período de hospitalização (4 dias) e taxas de bacteremia em 191 pacientes acometidos por *Salmonella* spp. resistentes quando comparado com 138 infectados por *Salmonella* spp. pansensíveis (3 dias).

Após estratificarmos as amostras de *Salmonella* spp. em sorotipos, observamos a presença de resistência antimicrobiana em doze (92,3%) dos treze sorotipos identificados neste trabalho e MDR (resistência pelo menos a um antimicrobiano de três ou mais classes) em cinco sorotipos, *S. Enteritidis* (2), *S. Heidelberg* (1), *S. Corvaliis* (1) e *S. Typhimurium* (3) e *S. Rissen* (1) (Tabela 2). Mais de um terço (33%) das amostras MDR pertenciam ao sorotipo *S. Typhimurium*. Maior diversidade de resistência antimicrobiana (índice *MAR* 0,44) e significativa associação ($p \leq 0,05$) com os antimicrobianos, ampicilina, cefoxitina, cefazidima e estreptomicina também foram identificadas neste sorotipo (Tabelas 2 e 3).

Algumas pesquisas indicam ocorrência de amostras MDR entre diferentes sorovares de *Salmonella* spp.. Entretanto, *S. Typhimurium* é o mais mais comumente citado, em especial o fagotipo DT104, difundido na década de 1990 e mundialmente conhecido por exibir um fenótipo de resistência à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (ACSSuT), medicamentos amplamente empregados em medicina veterinária (Abatcha *et al.*, 2014; Mukherjee *et al.*, 2019). Borges *et al.* (2019) identificaram grande percentual de *S. Typhimurium* MDR em casos de salmonelose humana, representando um grave problema de saúde pública. De fato, em 2002, um sorotipo de *S. Typhimurium* resistente à ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, canamicina, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina, trimetoprim e ácido nalidíxico e reduzida susceptibilidade à ciprofloxacina, conhecido como fagotipo DT

204b (ACGKSSuTTmNxCpL), tornou-se conhecido devido a casos infecções em vários países europeus (Inglaterra, Escócia, Alemanha, Holanda, Islândia) (Threlfall, 2002).

Conforme demonstrado neste e em outros trabalhos, a resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. pode ser identificada em várias classes terapêuticas, mas os mais comuns são aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol, quinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas e trimetoprima (Abachta *et al.*, 2014). É importante considerar que variações de prevalência estão associadas ao sorotipo de *Salmonella* spp., origem das amostras, período de análise e classe terapêutica em teste. Um estudo recente documentou diferentes perfis de susceptibilidade em 11.447 amostras de *S. Typhimurium* isoladas de fontes humana, animal e alimentar, entre os anos 1996 e 2016. Segundo os autores, maior diversidade no perfil de resistência antimicrobiana foi identificada em amostras isoladas de humanos em comparação com aquelas procedentes de animais e alimentos. Entre os animais, maior dinâmica de resistência foi observada em amostras de aves quando comparadas as de bovinos. O período também influenciou no estudo, pois maior diversidade de resistência ocorreu em amostras mais recentemente relatadas na pesquisa (2011 e 2016) (Wang *et al.*, 2019).

Pela análise de nossos dados, observamos que mais de 90% das amostras de *Salmonella* spp. foram susceptíveis às classes de aminoglicosídeos (gentamicina), anfencóis (cloranfenicol), carbapenemas (imipenem), cefalosporinas (cefepima, ceftazidima), inibidores de folato (sulfametoxazol-trimetropim), monobactam (aztreonam), penicínicos (ampicilina), fosfomicinas (fosfomicina), macrolídeos (azitromicina) e tetraciclinas (tetraciclina), indicando-as como possíveis opções terapêuticas para este patógeno. Por outro lado, o alto nível de resistência (mais de 65%) às quinolonas (ácido nalidíxico), fluoroquinolonas (ciprofloxacina) e nitrofuranos (nitrofurantoína), limita o seu uso em ensaios clínicos humano e animal.

Ressaltamos que, em virtude de apenas termos avaliado a susceptibilidade antimicrobiana em amostras de origem alimentar, estudos adicionais são fundamentais para quantificar a frequência de resistência em amostras bacterianas de outras fontes, identificar perfis predominantes que representem o maior risco de transmissão e infecção em humanos, associações entre sorotipos e classes terapêuticas e possíveis causa-raiz da disseminação da resistência antimicrobiana. Além disso, o uso de antibiograma previamente às prescrições é imprescindível para uma abordagem terapêutica assertiva. A constatação de resistência a

antimicrobianos, inclusive àqueles introduzidos na última década, enfatiza a necessidade do uso responsável e com base evidências científicas.

Acrescentamos às orientações acima a necessidade de implantação e execução de políticas públicas na saúde humana e animal para conter a disseminação da resistência antimicrobiana. Neste sentido, o programa “*One Health*”, de iniciativa da OMS, FAO e OIE, é dos principais projetos de abrangência mundial que estabelece diretrizes e orientações internacionais para mitigar disseminação da resistência antimicrobiana (Mcewen e Collignon, 2018). No Brasil, o MAPA também publicou recentemente estratégias de contenção da resistência por meio do “Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária”, cujos objetivos foram definidos pela aliança entre OMS, FAO e OIE. Participam desse plano, os setores privados, os órgãos estatutários e as instituições de ensino, pesquisa, inovação, desenvolvimento e fomento setorial (MAPA, 2018).

5. CONCLUSÃO

Amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em casos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2003 a 2017, caracterizaram-se por elevada prevalência de resistência antimicrobiana, principalmente, para as classes quinolona e nitrofurano. Os resultados também alertam para uma tendência linear na disseminação de resistência aos antimicrobianos ácido nalidíxico e nitrofurantoína. Embora a estratificação de sorotipos por resistência não seja expressiva, devido a amostragem de cada grupo sorológico, observou-se a presença de perfis multirresistentes e de associações significativas entre alguns sorotipos, principalmente, *S. Typhimurium*, e determinados antimicrobianos. Esta pesquisa demonstra a importância e a necessidade de constante vigilância da resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp., um dos principais patógenos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Ezequiel Dias (Laboratório de Microbiologia de Alimentos) pela cessão do material biológico alvo deste estudo e estrutura laboratorial para realização dos ensaios biológicos.

REFERÊNCIAS

ABATCHA, M.G.; ZAKARIA, Z.; KAUR, D.G.; THONG, K.L. Review Article: A trends of *Salmonella* and antibiotic resistance. **Advances in Life Science and Technology**, v.17, p.09-21, 2014.

ALMEIDA, F.; SERIBELLI, A.A.; CAZENTINI MEDEIROS, M.I.; RODRIGUES, D.P.; DE MELLOVARANI, A.; YAN, L.; ALLARD, M.W.; PFRIMER, F.J. Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. **PLoS ONE**, v.13, n.8, P.1-16, 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório do monitoramento da prevalência do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas amostras de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil.** Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Brasil: Brasília, 2008. 186p.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 44 de 26 de outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências.** 2010. Diário Oficial da União, 1º de outubro 2010.

APHA – American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** In: ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. Capítulo 37, 7ª ed, 2001, 676p.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493–496, 1966.

BOECKEL, T.P.V.; BROWE, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; ROBINSON, T.P.; TEILANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, n.18, p.5649-5654, 2015.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; SOUZA S.N.; SALLE C.T.P.; MORAES H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella* Enterica serotypes isolated from poultry sources in Brazil. **Brazilian Journal Poultry Science**, v.21, n.1, p.1-8, 2019.

CALDERÓN, L.G.R.; DELGADO, P.A.M.; URBANO, M.F.C.; COY, F.A.C. Resistencia de la *Salmonella* a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. **Revista CES Medicina Veterinária y Zootecnia**, v. 7, n.1, p.115-127, 2012.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A.M.M.; FALCAO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v.32, p.254-264, 2012.

CARDOSO, M.O.; RIBERIRO, A.R.; SANTOS, L.R.; PILOTTO, F.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.T.; ROCHA, S.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.368-371, 2006.

- CDC – Center for Disease Control and Prevention (2020a). **National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS). Glossary of Terms Related to Antibiotic Resistance.** Disponível em [https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html#:~:text=Multidrug%2Dresistant%20\(MDR\)%20isolate,to%20one%20or%20more%20antibiotics](https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html#:~:text=Multidrug%2Dresistant%20(MDR)%20isolate,to%20one%20or%20more%20antibiotics). Acesso: dezembro/2020.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention (2020b). **About Antibiotic Resistance.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html> Acesso: maio/2020.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention (2019). **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso: maio/2020.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2014). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI Document M100-S24, Wayne, 34(1).
- CVHO – Committee Surveillance One Health the Arm. Nippon AMR. **One Health Report (NAOR) 2017.** Japan, 2017. 71p.
- EJO, M.; GAREDEW, L.; ALEBACHEW, Z.; WORKU, W. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animal origin food items in Gondar, Ethiopia. **BioMed Research International**, v.2016, p.1-8, 2016.
- EFSA – European Food Safety Authority. The European Union One Health 2018 Zoonosis Report. **EFSA Journal**. v.17, n.12, p.276, 2019.
- EFSA – European Food Safety Authority. **Antimicrobial resistance in Europe. Resistance of *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Campylobacter* in food, animals and humans, country by country from 2017.** 2020. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/interactive-pages/AMR-Report-2017>. Acesso em: março/2020.
- EMA – European Medicines Agency. **Categorisation of antibiotics in the European Union.** 2019. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-animal-health>. Acesso em: dezembro/2020.
- ENG, S.K.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N.S.A.; SER, H.L.; CHAN, K.G.; LEE, L.H. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v.8, n.3, p.284-293, 2015.
- FARAHANI, R.K.; EHSANI, P.; EBRAHIMI-RAD, M.; KHALEDI, A. Molecular detection, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis isolated from poultry and clinical samples. **Journal Microbiology**, v.11, n.10, p.1-8, 2018.
- FARDSANEI, F. NIKKHAHI, F., BAKHSHI, B., ZAHRAI SALEIHI, T., ASRAFI TAMAI, I., SOLTAN DALLAL, M.M. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food in human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG)5-PCR and ERIC-PCR. **New Microbes and New Infections**, v. 14, p.24-30, 2016.
- FDA – Food and Drug Administration (2019). **2016-2017 NARMS Integrated Summary.** Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system/2016-2017-narms-integrated-summary-interactive>. Acesso em: março/2019.

GARCIA, V.M.; MONTERO, I.; BANCES, M.; RODICIO, R. Incidence and genetic bases of nitrofurantoin resistance in clinical isolates of two successful multidrug-resistant clones of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Pandemic “DT 104” and pUO-StVR2. **Microbial Drug Resistance**, v.23, p.405-412, n.4, 2017.

GUIMARÃES, D.M.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

IDEC – Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor. **Vendas sem prescrição**. *Revista do IDEC*, n. 144, p. 16-20, 2010.

JAJA, I.F.; BHEMBE, L.N.; GREEN, E.; OGUTTUD, J.; MCHENJE, V. Molecular characterisation of antibiotic resistant *Salmonella enterica* isolates recovered from meat in South África. **Acta Tropica**, v.190, p. 129-136, 2019.

KAGAMBÈGA, A.; LIENEMANN, T.; FRYE, J.G.; BARRO, N.; HAUKKA, K. Whole genome sequencing of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from humans and poultry in Burkina Faso. **Tropical Medical Health**, v.46, n.4, p. 2-5, 2018. (2018).

KARP, E.B.; CAMPBELL, D.; CHEN, J.C.; FOLSTER, J.P. FRIEDMAN, C. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in human non-typhoidal *Salmonella* infections: An Emerging Public Health Problem in the United States. **Zoonoses Public Health**, v. 65, n.7, p. 838-849, 2018.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, p.165-170, 1983.

LAMAS, A.; MIRANDA, J.M; REGAL, P.; VAZQUEZ, B.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. **Microbiology Research**, v. 206, p.60-73, 2018.

LI, Q.; YIN, J.; LI, Z.; DU, Y.; GUO, W.; BELLEFLEUR, M.; WANG, S.; SHI, H. Serotype distribution, antimicrobial susceptibility, antimicrobial resistance genes and virulence genes of *Salmonella* isolated from a pig slaughterhouse in Yangzhou, China. **AMB Express**, v.9, n.210, p.1-12, 2019.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDER, J.F.; KARHMETER, G.; OLSSONLILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOLUS, A.; WEBER, J.T.; MONET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drugresistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v.18, p.268-281, 2012.

MAJOWICZ, E.C.; MUSTO, J. SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M. O’BRIEN, S.J.; JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Food Safety**, v.50, n.6, p.882- 889, 2010.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003). **Instrução Normativa nº9 de 27 de junho de 2003**. Brasil. Diário Oficial da União, 2003.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2018). **Resultados do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC 2018**. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes> Acesso: março/2020

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2018). **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da agropecuária**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/pan-br-agro> Acesso em: dez. 2018

MARTINEZ-PUCHOL, S.M.; PONS, M.J.; RUIZ-ROLDAN, L.; LAUREANO-ADAME, L. CORUJO, A.; OCHOA, T.J.; RUIZ, J. Nitrofurán resistance in *Salmonella enterica* isolated from meat for human consumption. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v.1, p.99-103, 2020.

MARTINS, G.S.; MANGIAVACCHI, B.M.; BORGES, F.M.; LIMA, M.B. Uso indiscriminado de antibióticos pela população de São José do Calçado (ES) e o perigo das superbactérias. **Acta Biomédica Brasileira**, v.6, N.2, P.84-96, 2015.

MCEWEN, S.A.; COLLIGNON, P.J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, v.6, n.8, 2018.

MEDALLA, F.; GU, W.; MAHON, B.E.; JUDD, M.; FOLSTER, J.; GRIFFIN, P.M.; HOEKSTRA, R.M. Estimated incidence of antimicrobial drug resistant non-typhoidal *Salmonella* infections, United States, 2004-2012. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n.1, p.29-37, 2017.

MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, amostras de frangos de corte no Brasil**. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais. 2016. 131p.

MUKHERJEE, S.; CHASE, M.A.; MOSCI, R.E.; NEWTON, D.W.; LEPHART, P.; SALIMNIA, H.; KHALIFE, W.; RUDRIK, J.T.; MANNING, S.D. Increasing frequencies of antibiotic resistant non-typhoidal *Salmonella* infections in Michigan and risk factors for disease. **Frontiers in Medicine**, v.6, p.1-12, 2019.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J.W.L.; GRECO, K.V.; MENEZES, F.G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, p.689-696, 2008.

O'NEILL, J. **The review on antimicrobial resistance. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**. 2016. Disponível em: http://amrreview.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf. Acesso: janeiro/2019.

OIE – World Organisation for Animal Health. **Risks associated with the use of antimicrobials in animals worldwide. 2020**. Disponível em: https://www.oie.int/en/for-the-media/editorials/detail/article/risks-associated-with-the-use-of-antimicrobials-in-animals-worldwide/#oe_mainContent. Acesso em: dezembro/2020

QUESADA, A.; REGINATTO, G.A.; ESPAÑHOL, A.R.; COLANTONIO, L.D.; BURRONE, M.S. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. aislada de alimentos de

origem animal para consumo humano. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v.33, n.1, p.32-44, 2016.

REIS, R.O.; SOUZA, M.N.; CECCONI, M.C.P; TIMM, L.; IKUTA, N.; SIMON, D.; WOLF, J.M.; LUNGE, V.R. Increasing prevalence and dissemination of invasive non-typhoidal *Salmonella* serotype Typhimurium with multidrug resistance in hospitalized patients from southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n.5, p.424-432, 2018.

ROWLANDS, R.E.G.; RISTORI, C.A.; IKUNO, A.A.; BARBOSA, M.L.; JAKABI, M.; FRANCO, B.D. 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 São Paulo**. v.56, p.461-470, 2014.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 4ª ed. Belo Horizonte, 2015. 256p.

SILVA, A.C.; IACUZIO, R.; CÂNDIDO, T.J.S.; RODRIGUES, M.X.; SILVA, N.C.C. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* amostras de carcaças de frangos: resistência a antibióticos e óleos essenciais. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.8, n.1, p.95-103, 2018.

SILVA, E.R.; PEREIRA, A.M.G; MORAES, W.S.; SANTORO, K.R.; MOTA, T.R. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.3, p.701-711, 2012.

SOUZA, R.B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T.C.M. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 413-428, 2010.

SU, L.H.; CHIU, C.H.; CHU, C.; OU, T.J. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p.546–51, 2004.

THRELFALL, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26 p.141-148, 2002.

TYSON, G.H.; TATE, H.P.; ZHAO, S.; LI, C.; DESSAI, U.; SIMMONS, M.; McDERMOTT, P.F. Identification of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Salmonella* isolated from swine ceca and retail pork chops in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v.61, n.10, p. 1-5, 2017.

VARMA, J.K.; MOLBAK, K.; BARRETT, T.J.; BEEBE, J.L.; JONES, T.F.; RABATSKY-EHR, T.; SMITH, K.E.; VUGIA, D.J.; CHANG, H.G.; ÂNGULO, F.J. Antimicrobial resistant non-typhoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. **The Journal of Infectious Diseases**, v.191, n.4, p.554-561, 2005.

WANG, X.; BISWAS, S.; PAUDYAL, N.; PAN, H.; LI, X.; FANG, W.; Y, M. Antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium isolates recovered from the food chain through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.1-12, 2019.

WHO - World Health Organisation. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Opções de ações. 2012**. p. 01-16. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IERPSP_2012.2_por.pdf Acesso: outubro/2020

WHO - World Health Organisation. **WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation.** Geneva: World Health Organization; 2018

WILLIAMSON, D.A.; LANE, C.R.; EASTO, M.; VALCANIS, M.; STRACHAN, J.; VEITCH, M.G.; KIRK, M.D.; HOWDEN, B.P. Increasing antimicrobial resistance in non-typhoidal *Salmonella* isolates in Australia from 1979 to 2015. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 2, p. 01-09, 2018.

CAPÍTULO III

PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA EM *SALMONELLA* spp. E DO GENE *PT4* EM *SALMONELLA* ENTERITIDIS ISOLADAS DE SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA) OCORRIDOS EM MINAS GERAIS/BRASIL

RESUMO

A virulência de *Salmonella* spp. é um processo multifatorial, complexo e dependente da presença e expressão de determinados genes. Neste trabalho, avaliamos a presença dos genes de virulência *avrA*, *flgL*, *flgK*, *hilA*, *invA*, *iroB*, *lfpA*, *sefA*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *sivH*, *sopB*, *sopE*, *spvB* e *spvC*, responsáveis pela transcrição de proteínas dos principais fatores de virulência (ilhas de patogenicidade, fimbrias, plasmídeos e flagelos), em 70 amostras de *Salmonella* spp. procedentes de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ocorridos em Minas Gerais, entre 2003 e 2017. Avaliamos também a presença do gene *PT4*, marcador característico do fagotipo *PT4*, no sorotipo *S. Enteritidis*. Para pesquisa dos genes de virulência e do gene *PT4*, utilizou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional. A presença dos principais genes de virulência oscilou de 75,7 a 100% nas amostras de *Salmonella* spp.. Dezesete perfis foram identificados, com predominância (61,4%) daquele formado pela presença de todos os genes. *SipB*, *sopE*, *sefA* e *spvC* apresentaram frequências estatisticamente diferentes em *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e o agrupamento composto por outros sorotipos. Maior associação entre os genes de virulência e os sorotipos, após decomposição das variáveis pela Análise de Componentes Principais, foi observada em *S. Enteritidis*. Neste sorotipo, a menor frequência genética observada foi para o gene *sipB* (92,5%). O fagotipo *PT4* foi observado em 90% das amostras de *S. Enteritidis*. A partir dos resultados deste estudo, concluímos que as amostras de *Salmonella* spp. veiculadas por alimentos em surtos de DTA em Minas Gerais apresentam significativo potencial patogênico, em especial o sorotipo *S. Enteritidis*, dada a alta prevalência dos principais genes de virulência. A presença de um perfil significativamente predominante e composto por todos os genes pesquisados sugere a existência de amostras geneticamente relacionadas.

Palavras chaves: *Salmonella* spp.. Genes de Virulência. Gene *PT4*

ABSTRACT

The virulence of *Salmonella* spp. is a multifactorial, complex process and dependent on the presence and expression of certain genes. In this work, we evaluated the presence of the virulence genes *avrA*, *flgL*, *flgK*, *hilA*, *invA*, *iroB*, *lfpA*, *sefA*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *sivH*, *sopB*, *sopE*, *spvB* e *spvC*, responsible for the transcription of the main virulence factors (islands of pathogenicity, fimbriae, plasmids and flagella), among 70 samples of *Salmonella* spp. isolated from foodborne diseases in Minas Gerais State, from 2003 to 2017. We also evaluated the presence of the marker *PT4*, characteristic of the phagotype *PT4*, in the serotype *S. Enteritidis*. To search for virulence genes and the *PT4* marker, a conventional polymerase chain reaction (PCR) technique was used. The presence of the main virulence genes ranged from 75.7 to 100% in the samples of *Salmonella* spp. Seventeen profiles were identified, with predominance (61.4%) of that formed by the presence of all genes. *SipB*, *sopE*, *sefA* and *spvC* showed statistically different frequencies in *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and the cluster composed of other serotypes. Greater association between virulence genes and serotypes, after decomposition of variables by Principal Component Analysis, was observed in *S. Enteritidis*. In this serotype, the lowest genetic frequency observed was for the *sipB* (92.5%). The *PT4* phagotype was observed in 90% of *S. Enteritidis* samples. From the results of this study, we concluded that the samples of *Salmonella* spp. transmitted by food in outbreaks of food poisoning in Minas Gerais have significant pathogenic potential, especially the serotype *S. Enteritidis*, given the high prevalence of the main virulence genes in them. The presence of a significantly predominant profile and composed of all the researched genes, suggests the existence of genetically related samples.

Keywords: *Salmonella* spp.. Virulence Genes. *PT4* Gene

1. INTRODUÇÃO

Salmonella spp. possui, aproximadamente, 2.811 famílias de genes no genoma central (Faria, 2013) e mais de 300 são codificadores de fatores de virulência (Kaur e Jain, 2012). A virulência desencadeada por estes fatores é multifatorial e complexa, incluindo a presença de fimbrias e flagelos, a habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais e a produção de toxinas, entre outras (Câmara *et al.*, 2011). Essa diversidade de fatores é codificada por genes localizados em regiões específicas do cromossomo bacteriano denominadas ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* spp. (IPS) e em elementos genéticos móveis, como *transposons*, plasmídeos ou bacteriófagos (Galdino *et al.*, 2013; Chaudhary *et al.*, 2015; Mthembu *et al.*, 2019).

Pelo menos 22 IPS já foram descritas, algumas conservadas em todo o gênero *Salmonella* enquanto outras são específicas para alguns sorotipos (Andesfha *et al.*, 2019). A IPS-1, a mais reportada na literatura, codifica proteínas estruturais, necessárias para construção e regulação do Sistema de Secreção do Tipo III (SST3), componente essencial para invasão de células epiteliais e fagocíticas (Dougnon *et al.*, 2017). Esta IPS é conhecida por possuir genes codificadores de proteínas efectoras, SipABCD e os *operons inv*ABCDEFGF (*invasibility*) e *hil*ABCD (*hiperinvasive*), úteis no processo de invasão celular (Câmara *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013).

Os plasmídeos, importantes por carregarem genes de virulência e de resistência a antimicrobianos (Faria, 2013), podem ser agrupados de acordo com sua funcionalidade em plasmídeos de virulência sorotipo-específico, visto que não estão presentes em todos os sorotipos de *Salmonella* spp.. *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium* são alguns exemplos de sorotipos conhecidos por abrigarem plasmídeos de virulência (Asten e Dijk, 2005; Kaur e Jain, 2012). Todos os plasmídeos de virulência compartilham uma região altamente conservada designada *spv*RABCD (*Salmonella plasmid virulence*), cujos produtos funcionais facilitam o rápido crescimento e sobrevivência de *Salmonella* spp. dentro das células hospedeiras (Borges *et al.*, 2013).

Os genes de virulência presentes nas IPS e nos plasmídeos possuem funções específicas podendo ou não serem expressos, de acordo com fatores intrínsecos ao DNA e extrínsecos ao ambiente. Alguns genes somente são expressos quando *Salmonella* spp. se encontra no habitat intestinal do hospedeiro e outros quando a bactéria invade as células enteroepiteliais. Essa expressão é modulada por níveis de oxigênio, osmolaridade, pH e outros componentes (Fortes *et al.*, 2012). É inegável que estes genes de virulência conferem vantagens evolutivas e

competitivas para invasão da célula hospedeira, resistência a antimicrobianos, produção de toxinas e habilidade para superar outros mecanismos de defesa do hospedeiro (Webber *et al.*, 2019).

Cerca de 1 a 5% do material genético de virulência é específico por sorotipos e até mesmo em amostras de um determinado sorotipo (Anjumi, Thomson 2013). Logo, para compreensão da patogenicidade de cada sorotipo de *Salmonella* spp., é necessária uma abordagem que contemple não apenas seus aspectos morfológicos e fisiológicos, mas também aspectos moleculares, principalmente, aqueles relacionados à presença de genes de virulência. Segundo Santana (2011), existe uma alta complexidade de atuação dos genes de virulência e uma grande variabilidade nos sorotipos de *Salmonella* spp..

Neste trabalho, avaliamos a presença de genes de virulência em diversos sorotipos de *Salmonella* spp. e do gene *PT4*, exclusivamente, em amostras de *S. Enteritidis*, isolados de alimentos implicados em surtos de DTA em Minas Gerais/Brasil, de 2003 e 2017.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras

Um total de 70 amostras de *Salmonella* spp. foi obtido da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Fundação Ezequiel Dias para este estudo. Todas as amostras foram isoladas de alimentos implicados em surtos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017, por meio do método APHA (2001) e mantidas em criopreservação em glicerol 20% à temperatura de - 80°C.

2.2 Detecção dos genes codificadores de fatores de virulência

Para avaliar o perfil de virulência das amostras de *Salmonella* spp., foram pesquisados, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional *singleplex e multiplex*, os genes *avrA*, *flgL*, *flgK*, *hilA*, *invA*, *iroB*, *lfpA*, *sefA*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *sivH*, *sopB*, *sopE*, *spvB* e *spvC*, presentes nos principais elementos genéticos de patogenicidade de *Salmonella* spp. (ilhas de patogenicidade de *Salmonella* spp., plasmídeos). Exclusivamente para *S. Enteritidis* foi pesquisado o gene *PT4*, característico do fagotipo *PT4*.

O DNA bacteriano foi extraído por meio do kit de extração “*PureLink - Genomic DNA Mini Kit*” (Invitrogen - K182002 – Carlsbad, EUA). Neste protocolo, 1,5 mL da cultura de *Salmonella* spp., previamente incubada em aerobiose a 37°C por 18-24 horas em caldo *Brain*

Heart Infusion (Kasvi K25 1048 – Madri, Espanha), foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o *pellet* foi ressuspenso em 180 µL de tampão de digestão *PureLink Genomic Digestion Buffer* e em 20 µL de solução de Proteinase K e incubado a 55°C em banho-maria por 40 minutos. Após esse período, 20 µL de RNase A foi adicionado ao produto digerido e novamente incubado a 55°C em banho-maria por 2 minutos. Na etapa seguinte foram adicionados 200 µL do tampão de lise/ligação *PureLink Genomic Lysis* seguido de 200 µL de etanol 96-100% e nova homogeneização. O produto da lise anterior foi acrescido de mais 640 µL do tampão *PureLink Genomic Lysis* e centrifugado a 10.000 rpm por um minuto à temperatura ambiente. Finalizada esta etapa, procedeu-se a primeira lavagem do DNA com adição de 500 µL de tampão *Wash Buffer 1* e centrifugação a 10.000 rpm por um minuto à temperatura ambiente. Posteriormente, realizou-se uma segunda lavagem mediante adição de 500 µL do tampão *Wash Buffer 2* e centrifugação a 10.000 rpm por três minutos à temperatura ambiente. A última etapa foi realizada com a adição de 50 µL do tampão de eluição *PureLink Genomic Elution Buffer* e centrifugação máxima por um minuto. A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram avaliadas por meio de análise espectrofotométrica no NanoDrop One (Thermo Scientific, WI53711 – Madison, EUA). O DNA extraído, com taxas de absorvância de, aproximadamente, 1,9 para A260/A280 nm e A260/A230 nm, foi armazenado a -20°C para experimentação futura.

As reações da PCR foram preparadas em um volume de 25µL contendo um *mix* de água ultrapura, solução tampão e MgCl₂ (Invitrogen™ – Carlsbad, EUA), *mix* de dNTP (Promega U1515 – Madson, EUA), *primers* específicos dos genes alvo (Invitrogen™, Brasil, SP), *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen™ 11615.010 – Carlsbad, EUA) e DNA molde (aproximadamente 20ng). A sequência de nucleotídeos e referências para cada par de *primer*, estão descritas na tabela 1 e a concentração dos reagentes de cada reação de PCR e suas condições de ampliações, na tabela 2. Todas as reações de PCR foram acompanhadas de um controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076), um controle negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922) e controle negativo da reação (sem adição de DNA). Para reações de amplificação utilizou-se o termociclador Eppendorf® Mastercycler Gradient 22331 (Hamburg, Alemanha), onde as amostras foram submetidas a sucessivos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de virulência de *Salmonella* spp. e do gene do *PT4* de *S. Enteritidis* por PCR convencional

Gene	Sequência de nucleotídeos	Referências
<i>invA</i>	F: 5' - GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA - 3' R: 5' - TCATCGCACCGTCAAAGGAACC - 3'	Borges <i>et al.</i> , (2013)
<i>sefA</i>	F: 5' - GATACTGCTGAACGTAGAAGG - 3' R: 5' - GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC - 3'	Borges <i>et al.</i> , (2013)
<i>avrA</i>	F: 5' - GTTATGGACGGAACGACATCGG - 3' R: 5' - ATTCTGCTTCCCGCCGCC - 3'	Borges <i>et al.</i> , (2013)
<i>hilA</i>	F: 5' - CTGCCGACGTGTTAAGGATA - 3' R: 5' - CTGTCGCCTTAATCGCATGT - 3'	Borges <i>et al.</i> , (2013)
<i>lfpA</i>	F: 5' - CTTTCGCTGCTGAATCTGGT - 3' R: 5' - CAGTGTTAACAGAAACCACT - 3'	Borges <i>et al.</i> , (2013)
<i>sopB</i>	F: 5' - CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG - 3' R: 5' - TAGTGATGCCC GTTATGCGTGAGTGTATT - 3'	Skyberg <i>et al.</i> , (2006)
<i>sipB</i>	F: 5' - GGACGCCGCCGGGAAAACTCTC - 3' R: 5' - ACACTCCCGTCGCCGCCTCACAA - 3'	Skyberg <i>et al.</i> , (2006)
<i>spvB</i>	F: 5' - CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA - 3' R: 5' - GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGC ATCATA - 3'	Skyberg <i>et al.</i> , (2006)
<i>sipD</i>	F: 5' - ATGCTTAATATTCAAATTATTCCG - 3' R: 5' - TCCTTGCAGGAAGCTTTTG - 3'	Shah <i>et al.</i> , (2011)
<i>sipA</i>	F: 5' - ATGGTTACAAGTGTAAGGACTCAG - 3' R: 5' - ACGCTGCATGTGCAAGCCATC - 3'	Shah <i>et al.</i> , (2011)
<i>sivH</i>	F: 5' - CAGAATGCGAATCCTTCGCAC - 3' F: 5' - GTATGCGAACAAGCGTAACAC - 3'	Borges <i>et al.</i> , (2013)
<i>flgL</i>	F: 5' - ATGCGTATCAGTACCCAGATG - 3' R: 5' - CCGGTTCAACTGGAAAAGC - 3'	Shah <i>et al.</i> , (2011)
<i>flgK</i>	F: 5' - ATGTCCAGCTTGATTAATCAC - 3' R: 5' - GCGAATATTCAATAACGCATC - 3'	Shah <i>et al.</i> , (2011)
<i>sopE</i>	F: 5' - ACACACTTTCACCGAGGAAGCG - 3' R: 5' - GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG - 3'	Borges <i>et al.</i> , (2013)
<i>iroB</i>	F: 5' - TCGGTATTCTGTTTGTCCGGTCC - 3' R: 5' - TACGTTCCACCATTCTTCCC - 3'	Ganesan <i>et al.</i> , (2014)
<i>spvC</i>	F: 5' - CGGAAATACCATCTACAAATA - 3' R: 5' - CCCAAACCCATACTACTCTG - 3'	Borges <i>et al.</i> , (2013)
<i>PT4</i>	F: 5' - GGCGATATAAGTACGACCATCATGG - 3' R: 5' - GCACGCGGCACAGTTAAAA - 3'	Peterson <i>et al.</i> , (2010)

Tabela 2: Tamanho dos *amplicons*, concentração dos reagentes, condições e número de ciclos de amplificação para pesquisa dos genes de virulência de *Salmonella* spp. e do gene do *PT4* de *Salmonella* Enteritidis por meio de PCR convencional *singleplex* e *multiplex*

Gene	<i>Amplicon</i> (pb)	Concentração dos reagentes	Condições amplificação	Ciclos
<i>invA</i>	284	2.5µL tampão (10X), 1.25µL de MgCl ₂ (2.5mM),	94°C/1seg.;	
<i>sefA</i>	488	2.0µL DNTp (2.5mM), 1.0µL cada primer (20 pmol); 1U Taq polimerase, 2.0µL DNA (20ng)	55°C/1seg.;	35
<i>avrA</i>	385	2.5µL tampão (10X), 1.0µL de MgCl ₂ (2.0mM),	94°C/90seg.;	
<i>hilA</i>	497	2.0µL DNTp (2.5mM), 1.0µL cada primer (20 pmol); 1U Taq polimerase, 3.0µL DNA (20ng)	63°C/1min.;	30
<i>lfpA</i>	250	2.5µL tampão (10X), 2.0µL de MgCl ₂ (4.0mM), 2.5µL DNTp (2.5mM), 1.0µL cada primer (20 pmol); 1U Taq polimerase, 3.0µL DNA (20ng)	94°C/1seg.;	35
<i>sopB</i>	220	2.5µL tampão (10X), 2.0µL de MgCl ₂ (4.0mM),	94°C/30seg.;	
<i>sipB</i>	717	2.0µL DNTp (2.5mM), 1.0µL cada primer (20 pmol); 1U Taq polimerase, 3.0µL DNA (20ng)	66,5°C/30seg.;	25
<i>spvB</i>	875		72°C/2min.	
<i>sipD</i>	1029	2.5µL tampão (10X), 1.0µL de MgCl ₂ (2.0mM),	94°C/30seg.;	
<i>sipA</i>	2055	2.0µL DNTp (2.5mM), 1.0µL cada primer (20 pmol); 1U Taq polimerase, 2.0µL DNA (20ng)	53°C/30seg.;	30
<i>sivH</i>	763		72°C/40seg.	
<i>flgL</i>	951	2.5µL tampão (10X), 1.0µL de MgCl ₂ (2.0mM),	94°C/30seg.;	
<i>flgK</i>	1659	2,5µL DNTp (2.5mM), 1.0µL cada primer (20 pmol); 1U Taq polimerase, 2.0µL DNA (20ng)	53°C/30seg.;	30
			72°C/40seg.	
<i>sopE</i>	398	2.5µL tampão (10X), 1.0µL de MgCl ₂ (2.0mM),	94°C/1min.;	
<i>iroB</i>	606	2.0µL DNTp (2.5mM), 1.0µL cada primer (20 pmol); 1U Taq polimerase, 2,0µL DNA (20ng)	55°C/1min.;	30
			72°C/1min.	
<i>spvC</i>	669	2.5µL tampão (10X), 1.0µL de MgCl ₂ (2.0mM), 3.0µL DNTp (2.5mM), 3,5µL cada primer (20 pmol); 1U Taq polimerase, 2.0 µL DNA (20ng)	93°C/1min.;	30
			42°C/1min.;	
			72°C/2min.	
<i>PT4</i>	225	2.5µL tampão (10X), 1.0µL de MgCl ₂ (2.0mM), 2.5 µL DNTp (2.5mM), 2,0µL cada primer (20 pmol); 1U Taq polimerase, 2.0 µL DNA (20ng)	94°C/30seg.;	30
			62°C/15seg.;	
			58°C/15seg.;	
			72°C/1min.	

Os produtos das ampliações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v), (Promega VE3125 – Madison, EUA) preparado com tampão Tris Borato-EDTA - TBE 10X (Invitrogen AM9863 – Vilnius, Lituânia) e solução brometo de etídio 1% (Merck 123945.8 – Hesse, Alemanha) a 100V/120 minutos. Cada corrida foi acompanhada do marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ SM1331–Vilnius, Lituânia). A análise dos produtos amplificados foi realizada nos sistemas Molecular Imagen® Gel DoC™ XR and System with Image Lab™ software BIO RAD (Califórnia, EUA). Resultados positivos e negativos foram fotodocumentados e, quando negativos, submetidos à confirmação.

2.3 Análise estatística

Os testes Qui-quadrado (χ^2) e Exato de Fisher (tabela 2x2), com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) foram utilizados para avaliar a frequência relativa de cada gene de *Salmonella* spp. e nos sorotipos *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e demais sorotipos, respectivamente, conforme Sampaio (2015).

A Análise dos Componentes Principais (PCA) foi utilizada para explorar a associação entre as 70 amostras de *Salmonella* spp. e os 16 genes de virulência testados (Hongyu *et al.*, 2015). A presença ou ausência dos genes de virulência foi transformada na matriz binária, (1) para presença do gene e (0) para ausência gene, e o software PAST 3.26 (*Paleontological Statistics software Packages for Education and Data Analysis*) (Hammer *et al.*, 2001) utilizado para avaliação das associações.

3. RESULTADOS

Para melhor compreensão dos fatores de virulência, os resultados da presença dos genes foram analisados por agrupamento sorológico, onde o grupo “*S. Enteritidis*” foi representado por 40 amostras, “*S. Typhimurium*”, por 12 amostras e “Outros sorotipos”, representado por 18 amostras dos sorotipos Abony, Agona, Braenderup, Corvallis, Derby, Heidelberg, Infantis, Panama, Saintpaul, Schwarzengrund e Rissen. As figuras 1A a 1H, representam as imagens da eletroforese em gel de agarose dos 16 genes de virulência pesquisados nas 70 amostras de *Salmonella* spp., por meio da técnica de PCR convencional *singleplex* e *multiplex*. A figura 2, demonstra a pesquisa do gene *PT4* nas 40 amostras do sorotipo *S. Enteritidis*. Esse gene foi identificado em 36 (90%) das amostras.

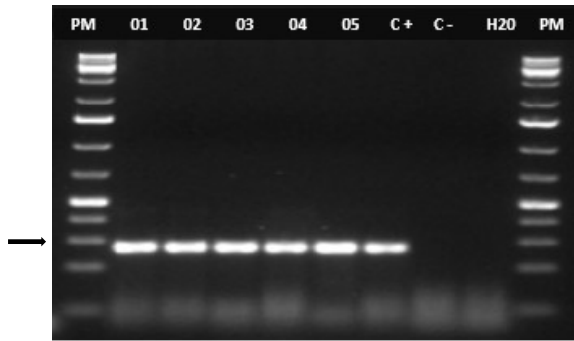


Figura 1 A: Eletroforese em gel de agarose com produto de amplificação do gene *lfpA* (250pb). Legenda: PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder; Canaletas n° 01 a 05 = amostras de *S. Enteritidis* positivas para *lfpA* (250pb); C + = controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076); C - = controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); H₂O = água + *mix* reagentes (controle da reação). Seta em negrito indica fragmento de 300 pb.

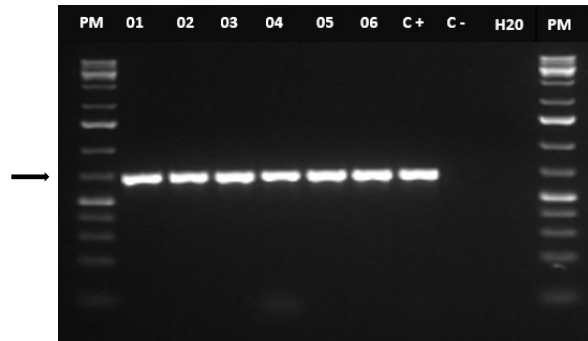


Figura 1 B: Eletroforese em gel de agarose com produto de amplificação do gene *spvC* (250pb). Legenda: PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder; Canaletas n° 01 a 05 = amostras de *S. Enteritidis* positivas para *spvC* (669pb); C + = controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076); C - = controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); H₂O = água + *mix* reagentes (controle da reação). Seta em negrito indica fragmento de 700 pb.

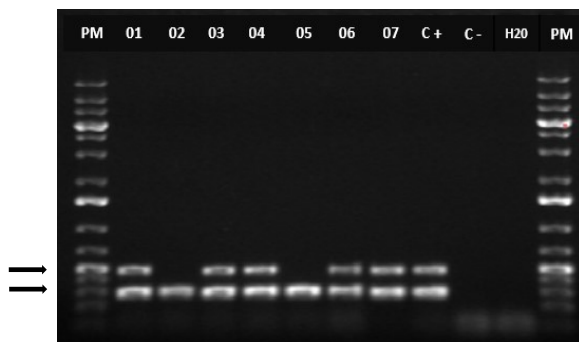


Figura 1 C: Eletroforese em gel de agarose com produto de amplificação do gene *invA* (250pb) e *sefA* (488 pb). Legenda: PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder; Canaletas n° 01 a 07 = amostras de *S. Enteritidis* positivas para *lfpA* (250pb) e *sefA* (488 pb); C + = controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076); C - = controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); H₂O = água + *mix* reagentes (controle da reação). Setas em negrito indicam fragmentos de 300 e 500 pb.

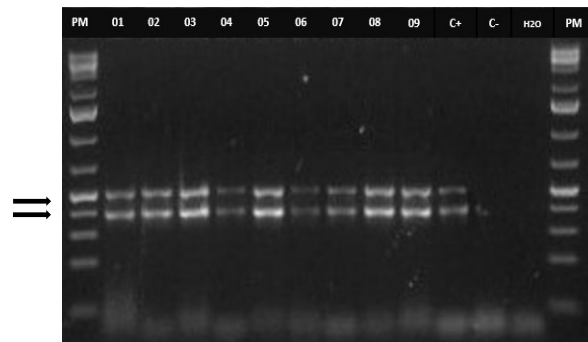


Figura 1 D: Eletroforese em gel de agarose com produto de amplificação do gene *avrA* (385pb) e *hilA* (497 pb). Legenda: PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder; Canaletas n° 01 a 09 = amostras de *S. Enteritidis* positivas para *avrA* (250pb) e *hilA* (497 pb); C + = controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076); C - = controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); H₂O = água + *mix* reagentes (controle da reação). Setas em negrito indicam fragmentos de 400 e 500 pb.

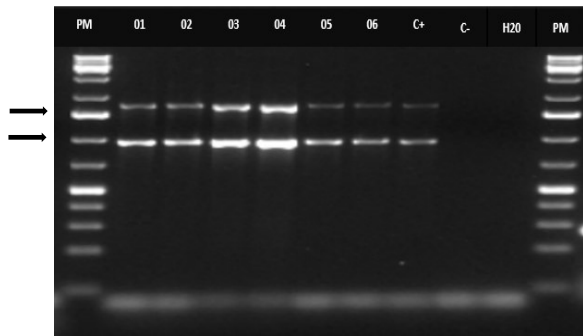


Figura 1 E: Eletroforese em gel de agarose com produto de amplificação do gene *flgL* (951pb) e *flgK* (1659 pb). Legenda: PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder; Canaletas n° 01 a 06 = amostras de *S. Enteritidis* positivas para *flgL* (951pb) e *flgK* (1659 pb); C + = controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076); C - = controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); H₂O = água + *mix* reagentes (controle da reação). Setas em negrito indicam fragmentos de 1000 e 1500

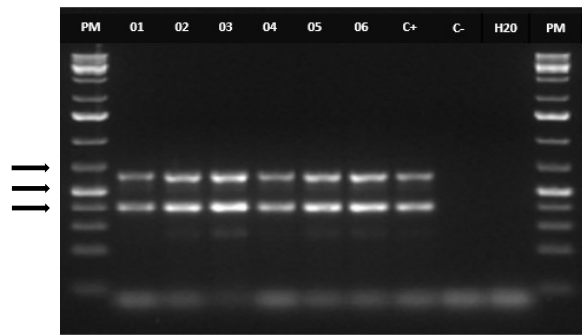


Figura 1 F: Eletroforese em gel de agarose com produto de amplificação do gene *sopE* (398pb) e *iroB* (606 pb). Legenda: PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder; Canaletas n° 01 a 06 = amostras de *S. Enteritidis* positivas para *sopE* (398pb) e *iroB* (606 pb); C + = controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076); C - = controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); H₂O = água + *mix* reagentes (controle da reação). Setas em negrito indicam fragmentos de 400, 500 e 700pb.

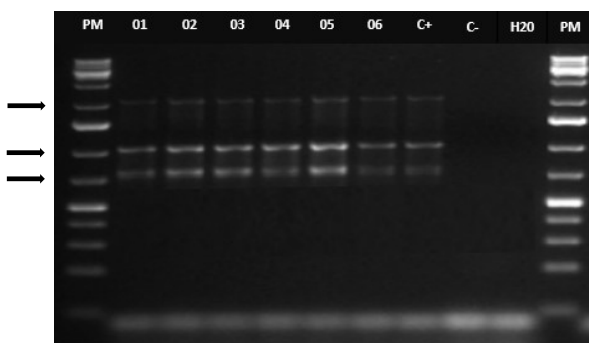


Figura 1 G: Eletroforese em gel de agarose com produto de amplificação do gene *sivH* (763pb), *sipD* (1029 pb) e *sipA* (2055 pb). Legenda: PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder; Canaletas n° 01 a 06 = amostras de *S. Enteritidis* positivas para *sivH* (763pb), *sipD* (1029 pb) e *sipA* (2055 pb); C + = controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076); C - = controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); H₂O = água + *mix* reagentes (controle da reação). Setas em negrito indicam fragmentos de 700, 1000 e 2000 pb.

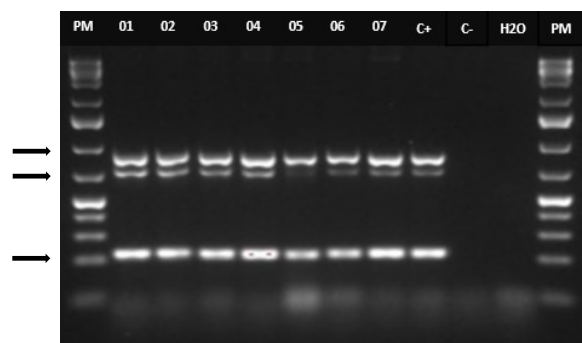


Figura 1 H: Eletroforese em gel de agarose com produto de amplificação do gene *sopB* (220 pb), *sipB* (717 pb) e *spvB* (855 pb). Legenda: PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder; Canaletas n° 01 a 07 = amostras de *S. Enteritidis* positivas para *sopB* (220 pb), *sipB* (717 pb) e *spvB* (855 pb).; C + = controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076); C - = controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); H₂O = água + *mix* reagentes (controle da reação). Setas em negrito indicam fragmentos de 200, 700 e 1000 pb.



Figura 2: Eletroforese em gel de agarose com resultados do produto de amplificação do gene *PT4* (225 pb) em 28 amostras de *S. Enteritidis*. Legenda: PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder. Nas Canaletas n° 02, 22 e 24 (seta vermelha) não houve amplificação do gene *PT4*. As demais canaletas contemplam amostras de *S. Enteritidis* com amplificação do gene *PT4*. Setas em negrito indicam fragmentos de 200 e 500 pb.

A presença dos 16 genes de virulência oscilou de 75,7 a 100% nas 70 amostras de *Salmonella* ssp. (Figura 3). Foram identificados 17 perfis de virulência, sendo o mais virulento (contendo todos os 16 genes) encontrado em 43 (61,4%) amostras. Mais da metade das amostras testadas (61,4%) (n=43) apresentaram todos os genes pesquisados. Os genes *invA*, *sipA*, *sopB*, *sipD*, *hilA* (presentes na IPS-1) e *iroB* foram evidenciados em todas as amostras. Os genes *avrA*, *sivH*, *lfpA*, *flgK*, *flgL* e *spvB* foram identificados em mais de 90% e *spoE*, *sipB*, *sefA* e *spvC*, em pelo menos 75% das amostras. Embora as frequências dos genes de virulência tenham divergido em quase 25%, não foi evidenciada diferença estatística ($\chi^2 = 0,40$; $p \leq 0,05$) entre estas frequências.

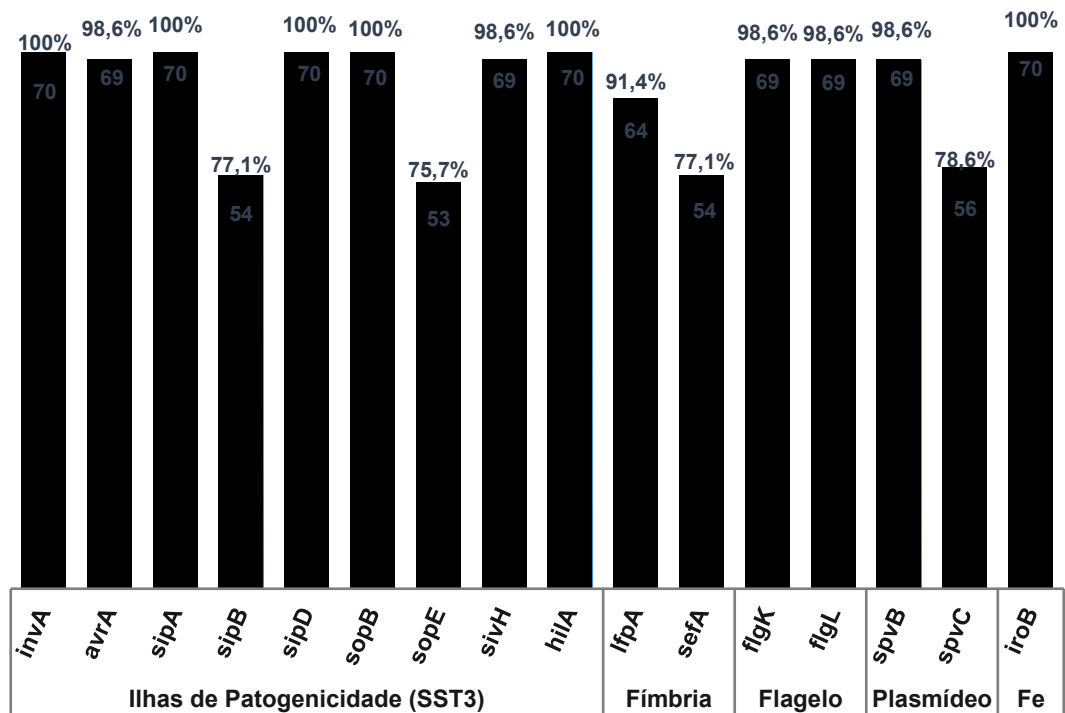


Figura 3: Frequência relativa e absoluta de genes de virulência em 70 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017.

Nos sorotipos de *Salmonella* spp., a frequência dos genes *sipB*, *sopE*, *lfpA*, *sefA* e *spvC* foi estatisticamente diferente (tabela 3). A frequência, por exemplo, do gene *sipB* nos sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* não diferiu estatisticamente ($f = 0,12$; $p \leq 0,05$), contudo apresentou comportamento extremamente significante ($f = 0,0009$; $p \leq 0,05$) quando sua presença foi comparada entre as amostras de *S. Enteritidis* e aquelas do grupo “outros sorotipos”.

Tabela 3: Frequência de genes de virulência específicos por sorotipos de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados nos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017

Função	Genes	Frequências dos genes de virulência			
		<i>S. Enteritidis</i> (n=40)	<i>S. Typhimurium</i> (n=12)	Outros sorotipos (n=18)	
IPS (STT3)	Estruturais e invasão	<i>invA</i>	100 / (40) ^a	100,0 / (12) ^a	100 / (18) ^a
		<i>sipA</i>	100 / (40) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a
	celular	<i>sipB</i>	92,5 / (37) ^a	75,0 / (9) ^{a b}	44,4 / (8) ^b
		<i>sipD</i>	100 / (40) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a
	Proteínas efetoras	<i>avrA</i>	97,5 / (39) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a
		<i>sopB</i>	100 / (40) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a
		<i>sopE</i>	95,0 / (38) ^a	50,0 / (6) ^b	50,0 / (9) ^b
		<i>sivH</i>	97,5 / (39) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a
	Regulador	<i>hilA</i>	100 / (40) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a
	Fímbrias	<i>lfpA</i>	97,5 / (39) ^a	91,7 / (11) ^{a b}	77,8 / (14) ^b
<i>sefA</i>		95,0 / (38) ^a	66,7 / (8) ^b	44,4 / (8) ^b	
Flagelos	<i>flgL</i>	97,5 / (39) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a	
	<i>flgK</i>	97,5 / (39) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a	
Plasmídeo	<i>spvB</i>	97,5 / (39) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a	
	<i>spvC</i>	97,5 / (39) ^a	66,7 / (8) ^b	50,0 / (9) ^b	
Metabolismo Fe	<i>iroB</i>	100 / (40) ^a	100 / (12) ^a	100 / (18) ^a	

^{a/b}: Frequências nas linhas com letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

IPS - Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* spp.; SST3 - Sistema de Secreção tipo III

Análise similar também foi observada com o gene fimbrial *lfpA*, para o qual não há diferença de sua frequência nos sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* ($f = 0,41$ $p \leq 0,05$). No entanto, diferença significativa de frequência de *lfpA* foi detectada na comparação de *S. Enteritidis* e o grupo “outros sorotipos” ($f = 0,02$; $p \leq 0,05$), ou seja, há um predomínio desta fimbria entre sorotipos de *S. Enteritidis* pesquisados.

Os genes *sefA*, *spvC* e *sopE*, detectados em menor frequência (75 a 78%) em todas as amostras, são estatisticamente mais frequentes ($p \leq 0,05$) em *S. Enteritidis*, quando comparado com quaisquer outros sorotipos. Estes mesmos marcadores, por sua vez, não diferem

estatisticamente ($p \geq 0,05$) entre os sorotipos de *S. Typhimurium* e aqueles agrupados em “outros sorotipos”.

Para avaliação da associação de cada sorotipo com os 16 genes de virulência, empregou-se a Análise dos Componentes Principais (ACP) (Figura 4). A análise da CP1 x CP2 demonstrou que a maior parte das amostras presentes na elipse A (21, 26, 34, 35, 36, 52, 56, 60 e 65) pertencem ao grupo “diversos sorotipos” e são caracterizadas pela menor frequência de genes de virulência, notadamente, quanto aos genes *sefA* (44,4%), *sipB* (44,4%), *sopE* (50%) e *spvC* (50%). Estas amostras representam 12,8% das 70 amostras testadas e 55,5% do total deste grupo.

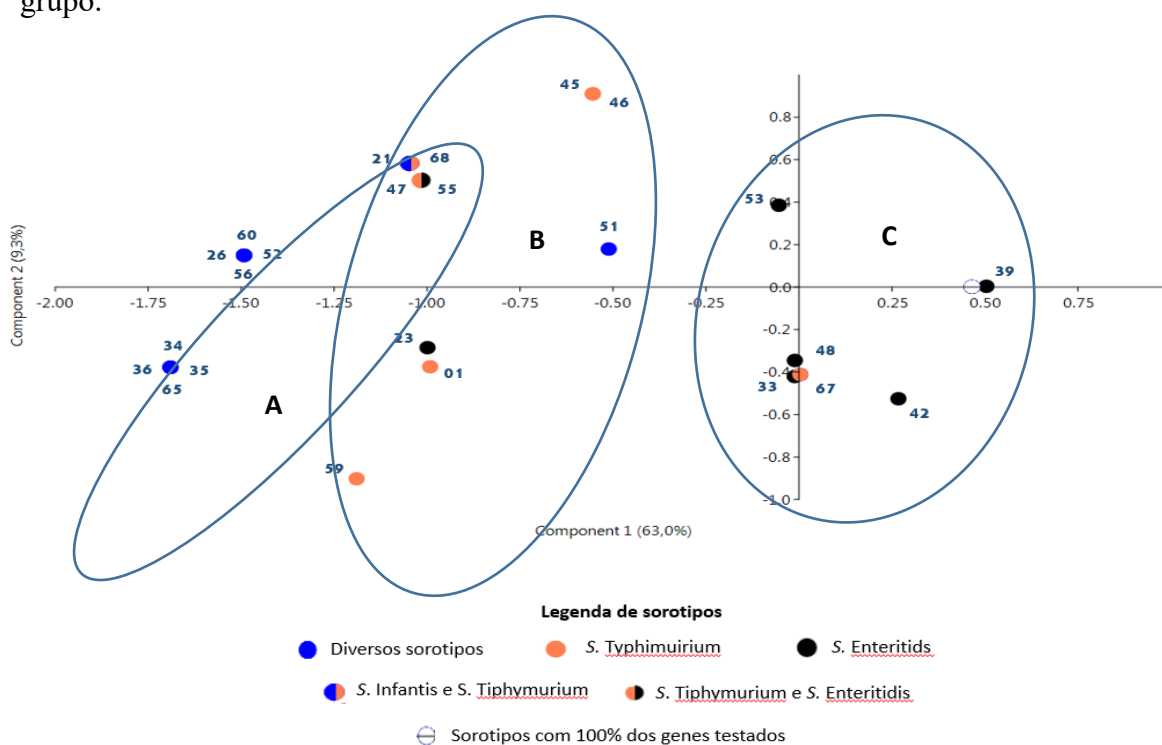


Figura 4: Análise dos Componentes Principais de 16 genes de virulência e 70 sorotipos de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre 2003 e 2017.

Na elipse B, observou-se que a maioria das amostras pertencem ao sorotipo *S. Typhimurium* (01, 45, 46, 47, 59, 68), as quais se caracterizam por apresentar dispersão intermediária quanto à frequência de alguns genes, principalmente os genes *sefA* (66,7%) e *spvC* (66,7%). Estas amostras representam 8,5% do total de *Salmonella* spp. analisadas e 50% deste grupo.

Na elipse C identificou-se a presença de 43 (61,4%) sorotipos portadores de todos os 16 genes estudados (caracterizados pelo símbolo ⊙). Destes 43 sorotipos, 32 (74,4%) são *S. Enteritidis*.

Outras cinco amostras de *S. Enteritidis* (33, 39, 42, 48 e 53), também alocadas nesta região, caracterizaram-se pela ausência de poucos genes de virulência, em geral, de um até três, sem qualquer destaque entre eles.

Por meio da ACP percebe-se que a maior associação entre as variáveis analisadas (genes de virulência x sorotipo) foi observada entre amostras do sorotipo *S. Enteritidis*. Neste sorotipo, a menor frequência observada foi para os genes *sipB* (92,5%), *sefA* (95,0%), *sopE* (95,0%), *spvC* (97,7%) e *lfpA* (97,7%).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos a presença de 16 genes de virulência em 70 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de DTA em Minas Gerais, entre 2003 e 2017. A pesquisa levou em consideração os genes de virulência mais reportados na literatura, localizados nas ilhas de patogenicidade de *Salmonella* spp. (IPS) e nos plasmídeos. Estes são responsáveis pela síntese de proteínas associadas à motilidade, adesão, invasão e sobrevivência intracelular de *Salmonella* spp. em células epiteliais e fagocíticas do hospedeiro e produção de entero, cito e endotoxinas (Asten e Dijk, 2005).

A tipagem de *Salmonella* spp. por meio da pesquisa de genes de virulência é uma ferramenta útil para investigação, pois permite associações destes com sorotipos específicos e contribuiu para inferências sobre os padrões de virulência mais comuns e sobre a patogenicidade de cada amostra bacteriana (Borges *et al.*, 2013). É importante ressaltar que quando estes genes estão presentes e são expressos, inúmeras são as vantagens atribuídas a *Salmonella* spp. durante seus processos de invasão, colonização e multiplicação celular (Weber *et al.*, 2019).

A frequência dos 16 genes pesquisados nas 70 amostras de *Salmonella* spp. oscilou de 75,7 a 100% (Figura 3). Dezesete perfis foram observados, sendo aquele com maior número de amostras, 43 (61,4%), caracterizado pela presença de todos os genes pesquisados. Resultados como estes comprovam a ampla dispersão destes genes nas amostras de *Salmonella* spp. implicadas nos surtos de DTA no Estado de Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017, bem como atestam o potencial patogênico das mesmas.

Entre os genes de virulência localizados na IPS-1, observou-se a presença de *invA* em 100% das amostras. Este gene é internacionalmente conhecido e, por diversas vezes, foi reportado em trabalhos similares ao nosso (Rowlands, 2008; Campioni *et al.*, 2012; Ohud *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013 e Almeida *et al.*, 2015). *InvA* é um dos sete genes (*invABCDEFG*)

localizados no *operon inv* (*invasibility*) e que detêm importante função na invasão de células epiteliais (Galdino *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2014; Chaudhary *et al.*, 2015; Kadry *et al.*, 2019).

Além da função invasiva, *invA* se destaca como padrão internacional para identificação do gênero *Salmonella* spp., pois parece ser conservado em quase todos os seus sorotipos (Câmara *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2014; Chaudhary *et al.*, 2015; Astolfi-Ferreira *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2017; Amini e Mobasser, 2019; Elsheikh *et al.*, 2019; Kadry *et al.*, 2019; Webber *et al.*, 2019). Por este motivo, a pesquisa de *invA* tem sido utilizada em metodologias alternativas para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, haja vista a sua boa sensibilidade e especificidade quando comparadas com os métodos tradicionais de cultivo microbiano (Zadernowska e Chajęcka-Wirzchowska, 2012).

Neste trabalho, comprovamos a não seletividade do gene *invA* ao identificarmos sua presença em 13 sorotipos distintos. Sua prevalência universal em bactérias do gênero *Salmonella* spp., isoladas de fontes humanas ou não, já foi reportada por vários autores. Oliveira *et al.* (2007), por exemplo, relataram a ocorrência deste gene em todas as 111 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de fontes humanas e alimentos, incluindo carcaças de frango e suínos. Moura *et al.* (2014) observaram este gene em 86 amostras de *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Minnesota* e *S. Panama* detectadas em abatedouros de suínos (fezes, *swabs* de carcaças suínas, ambiente, linfonodos e ração). Almeida *et al.* (2015) também observaram a presença deste gene nas 119 amostras de *S. Typhimurium* procedentes de fontes humanas e Mthembu *et al.* (2019), em 195 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de fezes de diferentes animais de produção.

Em desacordo com nosso trabalho e grande parte da literatura, Dias (2019) somente identificou o gene *invA* em 30% das amostras de *S. Newport* isoladas de carcaças de frangos. Carvalho *et al.* (2017) observaram este gene em 60% das amostras de *Salmonella* spp. isoladas em ambientes de carcinicultura e Bangera *et al.* (2018) em 84,8% dos sorotipos procedentes de gastroenterite humana. Anejo-Okop *et al.* (2016) observaram sua presença em 91% das amostras de *Salmonella* spp. coletadas de aves de corte. Segundo Oliveira *et al.* (2013), amostras de *Salmonella* spp. que não possuem esse gene são incapazes de invadir células epiteliais de mamíferos e, portanto, possuem baixo ou restrito potencial patogênico.

O gene *hilA*, outro gene presente na IPS-1, também foi identificado em todas as nossas amostras. Este gene possui como principal função a regulação do Sistema de Secreção Tipo III (SSTIII), componente essencial para invasão bacteriana nas células hospedeiras (Ochoa e Rodriguez, 2005). *HilA* também parece ser conservado nos sorotipos de *Salmonella* spp., haja

vista sua importância para virulência (Borges *et al.*, 2013; Webber *et al.*, 2019). Uma vez que este gene compartilha funções essenciais à patogenicidade de *Salmonella* spp. e é considerado altamente conservado no gênero, já esperávamos a sua detecção na maioria das amostras.

A abundância de *hilA*, identificado em 100% das amostras analisadas, também foi reportada por Ohud *et al.* (2012) ao identificá-lo em diversos sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de gastroenterite humana; por Borges (2016), em vários sorotipos isolados de aves de corte; por Farahani *et al.* (2018), em amostras de *S. Enteritidis* isoladas de fontes humanas, carcaças de aves e ovos; por Barilli *et al.* (2018), em sorotipos *S. Typhimurium* isolados de carcaças e fezes suínas e por El-Taybe *et al.* (2019), em diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. procedentes de fonte humana.

Percentuais de *hilA* diferentes do anterior, mas ainda expressivos, foram reportados por Ammar *et al.* (2016) em 88,2% das amostras de *Salmonella* spp. isoladas de vísceras de aves; por Thung *et al.* (2018) em 82,6% daquelas encontradas em carne bovina; por Sarah *et al.* (2019) em 66,6% dos sorotipos isolados de peixes de água doce e por Webber *et al.* (2019) também em 66,6% das amostras de *S. Heidelberg* obtidas de carcaças de aves. É importante destacar que a presença conjunta dos genes *invA* e *hilA* acentua o potencial patogênico de *Salmonella* spp. em relação à sua capacidade invasiva em células enteroepiteliais e fagocíticas.

A sobrevivência de um microrganismo em qualquer nicho depende de sua capacidade adesiva (Ochoa e Rodriguez, 2005). Nesse sentido, as fimbriais exercem importante papel na patogenicidade de *Salmonella* spp., pois são responsáveis pela adesão bactéria/hospedeiro, persistência ambiental e formação de biofilmes (Gibson *et al.*, 2007). São conhecidos mais de 20 *operons* fimbriais de *Salmonella* spp. (Câmara *et al.*, 2011), com especificidade a diferentes tipos celulares (Ochoa e Rodrigues, 2005). Dentre estes, destacam-se o *operon lfpABCDEF*, codificador de proteínas para fimbrias de adesão, o *operon sefABC*, codificador de estruturas fimbriais específicas para *S. Enteritidis* e, por último, o *operon agf*, responsável por codificar proteínas agregativas, úteis para formação de biofilmes e fixação à matriz extracelular no intestino dos hospedeiros (Jones, 2013).

Nós avaliamos a presença dos genes fimbriais *lfpA* (91,4%) e *sefA* (77,1%) nos diversos sorotipos de *Salmonella* spp. (Figura 3). *LfpA* é responsável por codificar a fimbria polar longa, importante na adesão às células M do intestino, no tropismo pelas placas de Peyer e na imunidade cruzada contra diferentes sorotipos (Webber *et al.*, 2019). Já *sefA* é necessário para translocação e formação da fimbria SEF14, uma das principais fimbrias do gênero *Salmonella*

spp. (Resende, 2015), considerada fundamental para aderência de *S. Enteritidis* no trato reprodutivo de aves e sua persistência na produção animal (Rowlands, 2008).

A presença do gene *sefA* (77,1%) nas amostras de *Salmonella* spp. diferiu significativamente entre os sorotipos, predominando em *S. Enteritidis* (95%) ($p=0,0001$; $p<0,05$) (Tabela 3). Salehi *et al.* (2011), Campioni *et al.* (2012) e Zou *et al.* (2012) também identificaram alta prevalência deste gene, 99,3%, 100% e 100%, respectivamente, em amostras de *S. Enteritidis* procedentes de salmonelose humana. É importante ressaltar que, embora o gene *sefA* tenha predominado em *S. Enteritidis*, o mesmo também foi detectado nos sorotipos *S. Abony*, *S. Agona*, *S. Derby*, *S. enterica* O:4,5, *S. Heidelberg*, *S. Panama* e *S. Schwarzengrund* e *S. Typhimurium*, divergindo, portanto, de autores que consideram a sua presença quase que exclusiva em *S. Enteritidis* e em alguns sorotipos do sorogrupo D1, tais como *S. Blegdon*, *S. Berta*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum*, *S. Moscow*; *S. Paratyphi B*, *S. Pullorum*, *S. Rostock*, *S. Serebam* e *S. Typhi* (Doran *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2002; Asten e Dijk, 2005; Rowlands, 2008; Amini *et al.*, 2010; Fortes, 2012; Jones, 2013; Resende, 2015; El Taybe *et al.*, 2019; Webber *et al.*, 2019). Nossos resultados são importantes, pois demonstram a necessidade de se investigar da presença desse gene em diferentes sorotipos, haja vista a possibilidade de recombinação gênica.

O gene *lfpA* foi identificado em 91,4% das amostras de *Salmonella* spp. Em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, esse gene somente não foi detectado em uma das amostras (tabela 3). Nos demais sorotipos, *lfpA* não foi amplificado em *S. Corvallis* e *S. Heidelberg*. A elevada frequência deste gene entre os mais diversos sorotipos é similar ao observado em outros trabalhos. Moura *et al.* (2014) reportaram sua presença em 80,2% de amostras de *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Infantis* e *S. Minnesota* isoladas de carcaças suínas e no ambiente de abate. Galdino *et al.* (2013) descreveram amplificação do gene *lfpA* em 94,4% de diversos sorotipos de *Salmonella enterica* de origem avícola e Webber *et al.* (2019), em 100% das 128 amostras de *S. Heidelberg* provenientes de carcaças de aves. A presença de ambos os fragmentos genéticos, *lfpA* e *sefA*, em elevado percentual nas nossas amostras de *Salmonella* spp., além de corroborar o considerável potencial patogênico das mesmas, é um dos fatores que pode explicar a gama de reservatórios deste patógeno na natureza. A aquisição de *operons* fimbriais é um dos mecanismos pelos quais diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. conseguem colonizar um número crescente de hospedeiros (Webber *et al.*, 2019) e sobreviver ao sistema de defesa dos mesmos (Mkrtchyan *et al.*, 2016).

Os plasmídeos são elementos genéticos móveis que se replicam de forma independente da célula bacteriana e podem ser transmitidos para bactérias adjacentes via transmissão horizontal por conjugação bacteriana (Austin e Manjitha 2011; Faria, 2013, e Andesfha *et al.*, 2019) ou para células filhas via transferência vertical (Silva *et al.*, 2017). Eles são extremamente importantes na transmissão de genes de virulência e resistência (Kaur e Jain, 2012). Todos os plasmídeos de virulência compartilham uma região altamente conservada, denominada *spv* (*Salmonella plasmid virulence*), constituída pelo *operon spvRABCD*, cuja ativação é regulada pelo gene *spvR* (Miller e Scherer, 2001; Balbino *et al.*, 2004, Asten e Dijk, 2005; Kaur e Jain, 2012; Almeida *et al.*, 2015).

A ativação do *locus spv* exerce papel fundamental na sobrevivência intracelular de *Salmonella* spp. dentro de células extra intestinais, principalmente macrófagos, durante a infecção (Ochoa e Rodrigues, 2005; Silva *et al.*, 2017; Andesfha *et al.*, 2019; Amini e Mobasseri, 2019). Há também evidências de que genes do *spv* (*plasmide virulence Salmonella*) aumentam a gravidade das enterites e contribuem para difusão de infecção sistêmica entre animais (Oliveira *et al.*, 2003; Astolfi-Ferreira *et al.*, 2017). Em casos de salmonelose humana, o papel do gene bacteriano *spv* é controverso. Há estudos que apontam sua necessidade para causar infecção e outros que demonstram a ocorrência de infecções sistêmicas causadas por amostras de *Salmonella* spp. sem genes *spv* (Silva *et al.*, 2017).

Neste trabalho, detectamos a presença dos genes plasmídeos *spvB* (98,6%) e *spvC* (78,6%) nas amostras de *Salmonella* spp. A presença do gene *spvB* não diferiu significativamente entre os 14 sorotipos testados, diferentemente do gene *spvC*, cuja predominância foi estatisticamente maior ($p \leq 0,05$) em *S. Enteritidis*. Essa diferença já era esperada, pois a presença de plasmídeos de virulência não é uma característica de todos os sorotipos de *Salmonella* spp. (Borges *et al.*, 2013). *S. Abortusovis*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* *S. Pullorum* e *S. Typhimurium* são alguns exemplos de sorotipos conhecidos por abrigarem plasmídeos de virulência, mas não todos os tipos de plasmídeos (Asten e Dijk, 2005; Kaur e Jain, 2012). Os genes *spvB* e *spvC* foram identificados conjuntamente em 54 (77,1%) amostras. Segundo Li *et al.* (2019), a patogenicidade de *Salmonella* spp. aumentará bastante quando ambos os genes estiverem presentes.

Embora alguns sorotipos não abriguem plasmídeos, a ausência do gene *spvC* em 22,4% das nossas amostras pode ser explicada por uma possível perda do plasmídeo durante o longo período de armazenamento e sucessivos subcultivos das amostras. Segundo Almeida *et al.*

(2015), o armazenamento em ágar em temperatura ambiente e os constantes subcultivos são práticas que podem ocasionar perda dos plasmídeos de virulência. Essa instabilidade dos plasmídeos foi comprovada por Balbino *et al.* (2004) ao reportarem a perda de plasmídeos de virulência em *Yersinia pestis*, quando esta foi submetida a 32 subcultivos. Segundo Austin e Manjitha (2011), os plasmídeos de virulência, por serem elementos genéticos grandes e mantidos em baixo número de cópias, podem não ser transmitidos durante a divisão celular pelo fato de distribuição aleatória não ser garantida frente a um baixo número de cópias.

As aquisições e as perdas dos plasmídeos de virulência podem justificar as diferentes prevalências desses genes nas amostras de *Salmonella* spp. Em um estudo com 37 amostras de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, isoladas de carne suína e no ambiente de abate, não foi observada amostra com o gene *spvC* (Chaudhary *et al.*, 2015). Li *et al.* (2019) também reportaram baixa prevalência dos genes *spvB* (2,5%) e *spvC* (2,5%) nas 80 amostras de diferentes sorotipos procedentes de carcaça suína. Kagirita *et al.* (2017) investigaram a presença dos genes *spvB* em 69 amostras de fontes humanas e animais e reportaram uma prevalência de 31,9%. Farahani *et al.* (2018) relataram prevalência similar do gene *spvC* (37,2%) em 282 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de carne de aves, fezes de aves e humanos e ovos. Das *et al.* (2012) avaliaram a virulência de 35 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de produtos cárneos e laticínios e observaram o gene *spvC* em 15 (42,85%).

Prevalência elevada de genes *spv*, semelhante à de nossos dados, foi reportada por Rowlands (2008) ao identificar o gene *spvC* em 80,9% (34/42) das amostras de *Salmonella* sp. envolvidas em surtos de DTA e em 41% (80/195) daquelas não associadas a salmonelose humana; por Oliveira *et al.* (2003), ao identificarem *spvC* (90,2%) em 102 amostras de *S. Enteritidis* procedentes de aves, suínos, humanos e alimentos; por Barilli *et al.* (2018), ao observarem este gene em 90% das 11 amostras de *S. Typhimurium* isoladas de carcaças e fezes suína; por Soto *et al.* (2006), após rastrearem a virulência de 80 amostras de *S. Enteritidis*, isoladas de gastroenterite ou bacteremia humana e identificarem 70 (95%) amostras portadoras do gene *spvC*; por Amini e Mobasseri (2019), ao detectarem *spvABC* em 100% das 15 amostras de *S. Typhimurium* procedentes de bovinos e por Andesfha *et al.* (2019), ao reportarem *spvC* em todas as 27 amostras de *S. Enteritidis*, isoladas de planteis avícolas. Segundo Borges *et al.* (2013), essas diferentes frequências encontradas para os genes do *operon spv* mostraram que a virulência de *Salmonella* spp. alterna entre o plasmídeo e os fatores cromossômicos, de acordo com o perfil genético de cada bactéria.

A translocação de *Salmonella* spp. para o citoplasma das células epiteliais e fagocíticas é um processo multifatorial, complexo e dependente da ação de proteínas efetoras, que são codificadas por genes localizados nas IPS (Libby *et al.*, 2004). Estas proteínas são consideradas tóxicas para células eucarióticas, pois provocam um desarranjo do citoesqueleto celular e alterações da membrana citoplasmática que se aparentam como ondulações, facilitando dessa forma, a internalização da bactéria para o interior da célula hospedeira (Ochoa e Rodriguez, 2005; Costa, 2015). Adicionalmente, essas proteínas efetoras também participam do recrutamento de leucócitos e secreção de fluidos para os tecidos e lúmen intestinal (Raffatellu *et al.*, 2005; Johnson, 2011).

As proteínas efetoras mais conhecidas, sipABCD, avrA e sivH, são codificadas por genes localizados dentro da IPS-1. Enquanto o primeiro grupo é codificado por uma região conservada na IPS-1, o segundo (gene *avrA*) deriva de uma região adjacente na IPS-1 e de maior variabilidade. Diferentemente dos efetores do grupo sip, as proteínas sopABDEE₂ são codificadas por genes fora da IPS-1. Os genes *sopB*, *sopD* e *sopE*₂ localizam-se em regiões conservadas da bactéria; já o gene *sopE* encontra-se presente em bacteriófagos e são, portanto, muito variáveis na espécie (Hensel, 2006).

Neste trabalho, constatamos a presença dos genes *avrA*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *sopB* e *sopE* e *sivH* em alta prevalência (75,7 a 100%). Os genes *avrA*, *sipA*, *sipD*, *sivH* e *sopB* foram detectados em quase todas as amostras ($\geq 98,6\%$). Outros autores também comprovaram a virulência de *Salmonella* spp. ao identificá-los em diferentes sorotipos. A abundância de *sipA* (100%), *sipD* (99,2%) e *sopB* (98,3%), por exemplo, foi reportada em 119 amostras de *S. Typhimurium* procedentes de fontes humana e não humana (Almeida *et al.*, 2015; Almeida, 2016). Farahani *et al.* (2018) também observaram alta prevalência de *sipA* (99,3%) e *sopB* (99,6%) em 282 amostras de *S. Enteritidis* coletadas de humanos e aves. Borges (2016), além de descrever elevada frequência dos genes anteriores, também identificou a presença de *avrA* (99,2%) e *sivH* (98,8%) em 243 amostras de diferentes sorotipos de origem avícola e humana. A presença de *sopB* foi descrita em todas as 80 amostras de *S. Enteritidis* isoladas em casos de salmonelose humana por Soto *et al.* (2006) e também em 160 (100%) amostras de *S. enterica* isoladas de vísceras de aves por Ezzat *et al.* (2014).

Esses genes e seus produtos são essenciais na virulência de *Salmonella* spp. A proteína efetora *avrA*, por exemplo, contribui para virulência de *Salmonella* spp. ao limitar a resposta inflamatória do hospedeiro e induzir a apoptose de macrófagos pela inibição da síntese de

interleucina 8 (IL-8) (Borges *et al.*, 2013; Astolfi-Ferreira *et al.*, 2017). Curiosamente, embora o gene *avrA* esteja presente na maioria dos sorotipos de *S. enterica*, como confirmado em nossas amostras, nem sempre a proteína *avrA* é expressa (Martins, 2010). A proteína *sipA*, um dos mais importantes efetores do grupo *sipABCD*, atua intracelularmente promovendo um rearranjo do citoesqueleto e alterações na membrana citoplasmática celular e extracelularmente ativando vias inflamatórias e recrutando leucócitos polimorfonucleares (Libby *et al.*, 2004; Srikanth *et al.*, 2011; Faganello, 2019). *SopB*, outra proteína efetora importante e de relevância neste estudo, tem implicações diretas no quadro diarreico, por se tratar de uma fosfatase de inositolfosfato que promove ativação de canais de cloro, perda de eletrólitos e secreção de fluidos das células epiteliais para o lúmen intestinal (Hensel, 2006; Fortes *et al.*, 2012; Faganello, 2019).

Em nosso trabalho, apenas dois genes codificadores de proteínas efetoras diferiram em termos de frequência segundo sorotipo analisado. *SipB* predominou nos sorotipos *S. Enteritidis* (92,5%) e *S. Typhimurium* (75,0%) e *sopE* apenas em *S. Enteritidis* (95,0%) (tabela 3). A proteína *sipB*, codificada pela IPS-1, está envolvida na apoptose de macrófagos via ativação da caspase-1, de modo similar a *IapaB* de *Shigella* (Hensel 2006; Fortes *et al.*, 2012; Ed-Dra *et al.*, 2019; Faganello 2019). *SopE* e *sopE2* codificam produtos que intervêm na função das proteínas celulares GTPASES do hospedeiro (Cdc42, Rac-1 e Rho), as quais regulam a formação de filamentos de actina e controlam a dinâmica do citoesqueleto (Libby *et al.*, 2004, Hensel 2006; Faganello 2019).

A localização em fago do gene *sopE* pode ser uma das causas que justifique sua ausência em 50% dos sorotipos de *S. Typhimurium* e naqueles presentes no grupo “outros sorotipos”, isso porque bacteriófagos são elementos genéticos móveis e, portanto, mais instáveis. Segundo Astolfi-Ferreira *et al.* (2017), *sopE* é transmitido horizontalmente por pró-fagos e está presente em poucos sorotipos de *Salmonella* spp. Cesco (2010) atribuiu a baixa prevalência do gene *sopE* (9,7%) em amostras de *S. Hadar* a possíveis recombinações gênicas. Segundo o autor, a ausência deste gene pode comprometer a habilidade dos sorotipos se adaptarem a novos hospedeiros. Raffatellu *et al.* (2005) comprovaram que a invasão bacteriana nas células de mamíferos é dependente dos efetores *SipA*, *SopA*, *SopB*, *SopD*, *SopE* e *SopE2* e que deficiências na estrutura destas proteínas causam uma redução significativa no acúmulo de fluidos e no influxo de neutrófilos no sítio intestinal.

A convergência dos nossos resultados, ao identificar a presença dos genes codificadores de proteínas efetoras em várias amostras de *Salmonella* spp., com grande parte daqueles reportados pela literatura, corrobora a importância desses efetores nos mecanismos de invasão, apoptose celular e secreção de fluídos no lúmen intestinal. A pesquisa de genes codificadores de proteína efetoras associadas à virulência é de grande valor, visto que alterações destas podem provocar mudanças importantes na capacidade de *Salmonella* spp. se adaptarem a novos hospedeiros e também porque sua presença pode variar dentro de um mesmo sorotipo, no qual as amostras são, supostamente, semelhantes (Borges 2016).

Previamente aos processos de adesão, invasão e multiplicação celular, as bactérias precisam se deslocar com vigor em um ambiente, muitas vezes, hostil, o que é assegurado pelos flagelos. Estas estruturas também auxiliam a quimiotaxia celular, permitindo que a bactéria evite ambientes desfavoráveis, tais como extremos de pH e altas concentrações salinas (Freitas-Neto, 2012). Os flagelos, presentes em torno de 5 a 10 unidades e posicionados aleatoriamente nas bactérias (Austin e Manjitha, 2011), são constituídos de três partes principais: o corpo basal incorporado na membrana celular bacteriana, o gancho, que permite uma articulação flexível entre o corpo e o filamento basal e o filamento externo, que funciona como hélice propulsora da locomoção bacteriana (Yang *et al.*, 2019).

Cerca de 50 genes, agrupados em 17 *operons*, localizados em quatro *loci* do genoma participam dos processos de construção e regulação dos flagelos (Jones, 2013). Pesquisamos os genes, *flgK* e *flgL*, essenciais na junção entre o gancho flexível e o filamento rígido (Das *et al.*, 2018; Hong *et al.*, 2018; Inoue *et al.*, 2018). Ambos foram detectados em 69 (97,5%) das amostras. Apenas uma amostra de *S. Enteritidis* não apresentou esses dois genes. A elevada frequência de *flgK* e *flgL* já era prevista, pois a maioria dos sorotipos de *Salmonella* spp. são dotados de mobilidade (Silva *et al.*, 2017). Acredita-se que esta motilidade possa melhorar a capacidade de invasão sistêmica a partir do intestino, devido a redução das respostas pró-inflamatórias induzidas por TLR-5 do hospedeiro (Thomson *et al.*, 2008). Resultados similares ao nosso, com elevada frequência dos genes *flgK* e *flgL*, foram reportados nos estudos de Shah *et al.* (2011); Campioni *et al.* (2012); Almeida *et al.* (2013) e Almeida (2016) ao realizarem a pesquisa destes genes em diversos sorotipos procedentes de fontes humana, animal e ambiental. Os dois sorotipos imóveis mais conhecidos são *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* (Silva *et al.*, 2017). A não motilidade desses sorotipos é atribuída a mutações no gene *fliC* responsável pela codificação das flagelinas (Thomson *et al.*, 2008).

Por fim, avaliamos a habilidade de *S. Enteritidis* captar o íon ferro presente no hospedeiro por meio da pesquisa do gene *iroB*. O ferro é um dos metais mais importantes para sobrevivência intracelular de *Salmonella* spp. No sorotipo *S. Typhimurium*, por exemplo, esse metal é considerado um nutriente essencial e, aproximadamente, 7% do seu genoma é regulado pelos níveis de ferro disponíveis (Costa, 2015). O gene *iroB*, presente no *operon iroBCDEN*, é responsável pela síntese e transporte da enterobactina e salmoquelina, complexos proteicos de alta afinidade ao Fe^3 (Mthembu *et al.*, 2019). A presença deste gene foi observada em 100% das amostras bacterianas analisadas. Embora esse resultado seja expressivo, é preciso considerar que sua presença apenas demonstra a existência de uma possível via para absorção de Fe, pois segundo Webber *et al.* (2019), as bactérias possuem uma variedade de sistemas de aquisição de ferro, geralmente redundantes e não expressos simultaneamente.

Para avaliação da associação entre os genes de virulência e cada sorotipo, empregou-se a Análise dos Componentes Principais. A redução das variáveis (genes de virulência) em dois componentes principais (CP1 e CP2) permitiu agrupar os dados para maior compreensão. Quanto maior a proximidade do sorotipo com o ponto de interseção dos CP1 e CP2, menor sua variabilidade genética em termos de frequência dos genes de virulência. Como a primeira componente explicou 63,0% da variabilidade dos dados e a segunda 9,3%, o mapa perceptual bidimensional (Figura 4) apresentado está adequado para avaliar as relações entre as variáveis, uma vez que decifra grande parte da variabilidade.

Segundo Rencher (2002) e Hongyu *et al.*, (2016), pelo menos 70% da variância total devem ser explicadas pelos primeiros e segundos componentes. Pela análise da CP1 x CP2, a maior variabilidade genética, quanto aos 16 genes pesquisados, foi identificada nas amostras agrupadas em “diversos sorotipos”, seguidas do sorotipo *S. Typhimurium* e, com menor variabilidade, *S. Enteritidis*. Nossos resultados são corroborados por outros autores ao afirmarem que *S. Enteritidis* é um dos sorotipos de *Salmonella* spp. mais intimamente correlacionados, ou seja, apresenta maior homogeneidade genética (Morales *et al.*, 2005; Porwollik *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2011).

A fagotipagem, caracterizada por avaliar a susceptibilidade de *Salmonella* spp. à infecção por um conjunto de fagos líticos (bacteriófagos), é considerada um dos principais métodos fenotípicos utilizados na tipagem inicial de *S. Enteritidis*. Como o fagotipo *PT4* predomina em *S. Enteritidis* na Europa e no Brasil (Andrigheto, 2006) e historicamente este fagotipo tem sido associado a uma maior incidência de doenças humanas (Morales *et al.*, 2005), utilizamos um

screening molecular para sua pesquisa nas nossas amostras de *S. Enteritidis*. Nossos resultados demonstraram que 36 (90%) amostras de *S. Enteritidis* amplificaram o gene *PT4*.

A alta prevalência do fagotipo *PT4* em amostras de *S. Enteritidis* implicadas em surtos de DTA em Minas Gerais está em consonância com outras pesquisas. Desde 1993, quando o fagotipo *PT4* foi introduzido no Brasil, supostamente a partir do intercâmbio comercial de matrizes de aves com países da Europa (Kottwitz *et al.*, 2012), vários autores têm reportado elevada prevalência deste fagotipo no país em amostras de *S. Enteritidis* de origem humana, alimentar ou animal (Peresi *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2003, Santos *et al.*, 2003; Alcocer *et al.*, 2006; Andrigheto 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Kottwitz *et al.*, 2010 e Borges, 2016).

Considerando que fagotipagem tradicional, quase sempre restrita a Laboratórios de Referência, apresenta limitações no seu procedimento de execução, uma vez que há dificuldade de manutenção dos fagos (Kottwitz, 2009 e Kottwitz *et al.*, 2010) e a necessidade de, pelo menos, 27 bacteriófagos para fagotipagem de *S. Enteritidis* (Porwollik *et al.*, 2005), recomendamos o método molecular como *screening* para o fagotipo *PT4*, por se tratar de uma metodologia rápida, menos laboriosa e de baixo custo. Contudo, ressaltamos que tanto a fagotipagem tradicional (por meio de bacteriófagos) como a molecular não serão úteis na discriminação de *Salmonella* spp. quando apenas um fagotipo predominar em determinada área geográfica. Desta forma, preconizamos a associação com outras técnicas de maior poder discriminatório para um estudo epidemiológico mais efetivo.

5. CONCLUSÃO

A alta prevalência dos genes de virulência *avrA*, *flgL*, *flgK*, *hilA*, *invA*, *iroB*, *lfpA*, *sefA*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *sivH*, *sopB*, *sopE*, *spvB* e *spvC* em diferentes sorotipos de *Salmonella* spp., procedentes de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais (2003-2017), sugere que estas bactérias apresentam elevado potencial patogênico e habilidade de causar doença em seres humanos.

Caráter mais virulento pode ser atribuído ao sorotipo *S. Enteritidis*, pois este se destacou por conter quase todos os genes pesquisados. A presença de grande parte das amostras de *S. Enteritidis* com um perfil de virulência contendo todos os genes, revela alta homogeneidade genética nesta população e pode ser indicativo da existência de amostras clonais ou intimamente relacionadas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Ezequiel Dias (Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Biologia Molecular) pela cessão do material biológico e estrutura laboratorial para realização dos ensaios biológicos.

REFERÊNCIAS

- ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K.M.P.; VIDOTTO, M.C.; OLIVEIRA, T.C.M. Discriminação de sorovares de *Salmonella spp.* amostras de carcaças de frango por rep e eric-PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.411-420, 2006.
- ALMEIDA, F. **Caracterização molecular de linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos, alimentos, animais e ambientes no Brasil.** Tese [Doutorado Biociências Aplicadas à Farmácia] Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. 103p.
- ALMEIDA, F.; MEDEIROS, M.I.C.; RODRIGUES, D.P.; FALCÃO, J.P. Genotypic diversity, pathogenic potential and the resistance profile of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983 to 2013 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p.1395–1407, 2015.
- ALMEIDA, F.; SILVA, A.P.; 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**, v. 19, p.145 -151, 2013.
- AMMAR, A.M.; MOHAMED, A.A.; EL-HAMID, M.I.A.; EI-AZZOUNY, M.M. Virulence genotypes of clinical *Salmonella* Serovars from broilers in Egypt. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.10, n.4, p.337-346, 2016.
- AMINI, K.; MOBASSERI, P. Detection and Molecular Identification of Plasmid Virulence Genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Isolated from Human and Animals by Multiplex PCR Method. **Journal Medical Bacteriological**, v.8, p.31-39, 2019.
- AMINI, K.; SALEHI, T.Z.; NIKBAKHT, G.; RANJBAR, R.; AMINI, J. ASHRAFGANJOOEI, S. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, n.21, p.2202-2210, 2010.
- ANDESFHA, E.; INDRAWATI, A.; MAYASARI, N.L.P.I.; RAHAYUNINGTAYAS, I. JUSA, I. Detection of *Salmonella* pathogenicity island and *Salmonella* plasmid virulence genes in *Salmonella* Enteritidis originated from layer and broiler farms in Java Island. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**. v.6, n.3, p.384-393, 2019.
- ANDRIGHETO, C. **Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica.** Tese [Doutorado em Ciências de Alimentos] – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. 97p.
- ANEJO-OKOPI, J.A. ISA, E.S.; AUDU, O.; FAGBAMILA, I.O.; IORNENGE, J.C.; SMITH, I.S. Isolation and polymerase chain reaction detection of virulence *invA* gene in *Salmonella*

spp. from poultry farms in Jos, Nigeria. **Journal of Medicine in the Tropics**, v.18, n.2, p.98-102, 2016.

ANJUMI, A.F.; THOMSON, N.R. **Characterizing *Salmonella* genomes**. In: BARROW, P.A.; METHNER, U. *Salmonella* in domestic animals. Boston: CAB International, 2013. 564p.

APHA – American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. In: ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. Capítulo 37, 7ª ed, 2001, 676p.

ASTEN, A.J.A.M.; DIJK, J.E. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, p.251–259, 2005.

ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; PEQUINI, M.R.S.; NUNES, L.F.N.; PARRA, S.H.S.; CHACON, R.; TORRES, D.I.D.; PEDROSO, A.C.; FERREIRA, A.J.P. A comparative survey between non-systemic *Salmonella* spp. (paratyphoid group) and systemic *Salmonella* Pullorum and *S. Gallinarum* with a focus on virulence genes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.10, p.1064-1068, 2017.

AUSTIN, S.; MANJISTHA, S. Prevalence and Significance of Plasmid Maintenance Functions in the Virulence Plasmids of Pathogenic Bacteria. **Infection and Immunity**, v.79, n. 7, p.2502–2509, 2011.

BANGERA, S.; UMAKANTH, S.; BHAT, R.; KAMATH, A.; BALLAL, M.; KUMAR, A.; MUKHOPADHYAY. Serovar profile and detection of inva virulence gene among non-typhoidal *Salmonellae* serovars isolated from acute gastroenteritis cases in coastal Karnataka, Southern India. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.11, n.1, p.1-5, 2018.

BARILLI, E.; BACCI, C.; VILL, Z.S.; MERIALDI, G.; D’INCAU, M. BRINDANI, F. VISMARRA, A. Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and virulence genes in *Salmonella* isolated from pigs bred on intensive farms. **Italian Journal of Food Safety**, v.7, p.131-137, 2018.

BALBINO, T.C.L.; LEAL, N.C.; LOPES, C.V.; ALMEIDA, A.M.P. Differences in the Stability of the Plasmids of *Yersinia pestis* Cultures in Vitro: Impact on Virulence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.7, p.727-732, 2004.

BORGES, K.A. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Salmonella* pertencentes a diferentes sorovares isoladas de matrizes de frango de corte no campo, de carcaças de frango e alimentos envolvidos em surtos de salmonelose**. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. 133p.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; BORSOI, A.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, E.V.P. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.12, p.1416-1422, 2013.

CÂMARA, S.R.; PORTO, A.L.F.; LAVOR, C.T.B.; SOBRAL, M.H.N.R. Salmonelose: fatores envolvidos no processo de diagnóstico e importância para saúde pública. **Ciência Animal**, v. 21, n.1, p.54-64, 2011.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A.M.M.; FALCAO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v.32, p.254-264, 2012.

CARVALHO, F.C.T.; RODRIGUEZ, M.T.T., MENEZES, F.G.R.; SOUSA, O.V.; HOFER, E.; VIEIRA, R.H.S.F. (2017). Ecotypes and virulence factors of *Salmonella* spp. detected in shrimp farms in State of Ceará, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.39, n.4, p.469-474, 2017.

CESCO, M.A.O. **Pesquisa de Fatores Associados à Virulência de *Salmonella* Hadar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. Dissertação [Mestrado em Ciências Veterinárias] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. 84p.

CHAUDHARY, J.H.; NAYAK, J.B.; BRAHMOBHATT, M.N.; MAKWANA, P.P. Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. **Veterinary World**, v.8, n.1, p.121-124, 2015.

COSTA, L.F. **Estudo de mecanismos de patogenicidade utilizados pela *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *Salmonella enterica* sorotipo Typhi no intestino de modelos animais de infecção**. Tese [Doutorado em Patologia] - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015. 116p.

DAS, A.; HARI, S.S.; SHALINI, U. GANESHKUMAR, A.; KARTHIKEYAN, M. Molecular Screening of Virulence Genes from *Salmonella enterica* Isolated from Commercial Food Stuffs. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v.9, n.1, p.363-369, 2012.

DAS, C.; MOKASHI, C.; MANDE, S.S.; SAINI, S. Dynamics and control of flagella assembly in *Salmonella* Typhimurium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.8, n.36, p.1-13, 2018.

DIAS, S.C. **Virulência de *Salmonella* spp. Isoladas de carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia – MG**. Monografia [Graduação em Medicina Veterinária] - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2019. 29p.

DORAN, J.L.; COLLINSON, S.K.; CEBULA, T.A.; KOCH, W.H.; BURIAN, J.; BANSER, P.A.; TOOD, E.C.; KAY, W.W. Diagnostic potential of *sefA* DNA probes to *Salmonella* Enteritidis and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. **Molecular and Cellular Probes**, v.10, n.4, p.233-246, 1996.

DOUGNON, T.V.; LEGBA, B.; DEGUENON, E.; HOUNMANOU, G.; AGBANKPE, J.; AMADOU, A.; FABIYI, K.; ASSOGBA, P.; HOUNSA, E.; ANIAMBOSOU1, A.; SOUZA, M.; S. BANKOLE, H.; BABA-MOUSSA, L.; DOUGNON, T.J. Pathogenicity, Epidemiology and Virulence Factors of *Salmonella* species: A Review. **Notulae Scientia Biologicae**. v.9, n.4, p.466-472, 2017.

ED-DRA, A.; FILALI, F.R.; KHAY, S. OULGHAZI, S.; BOUHRIF, B.; EL ALLAoui, A.; OUHMIDOU, B.; MOUMNI, M. Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Genetic Diversity of *Salmonella enterica* Isolated from Sausages. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v.9, p.56–60, 2019.

ELSHEIKH, M.; ABDEEN, E.; AMMAR, A.M.; HUSSIEN, A.E. Molecular detection of some virulence genes of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Egypt. **Journal of Current Veterinary Research**, v.1, p.86-93, 2019.

- EL-TAYBE, M.; IBRAHIM, A.S.S.; MAANY, D.A.; ELBADAWIL, Y.B. AL-SALAMAH, A.A. Detection of virulence genes and investigation of the immunogenicity of outer membrane proteins of *Salmonella enterica*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.7, n.5, p.62-73, 2019.
- EZZAT, M.E.; SHABANA, I.I.; ESAWY, A.M.; ELSOTOHY, M.E. Detection of virulence genes in *Salmonella* serovars isolated from broilers. **Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n.6, p.189-193, 2014.
- FAGANELLO, C. **Caracterização do Potencial Patogênico de *Salmonella enterica* Isoladas de Frango**. Dissertação [Mestrado em Biologia de Parasitas e Microrganismos] - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2019. 68p.
- FARAHANI, R.K.; EHSANI, P.; EBRAHIMI-RAD, M.; KHALEDI, A. Molecular detection, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis isolated from poultry and clinical samples. **Journal Microbiology**, v.11, n.10, p.1-8, 2018.
- FARIA, A.M. **Genes de virulência em *Salmonella enterica*: descrição, componentes estruturais e métodos de detecção**. Seminário [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013. 37p.
- FORTES, T.P.; FAGUNDES, M.Q.; VASCONCELLOS, F.A.; TIMM, C.D.; SILVA E.F. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.71, n.2, p.219-27, 2012.
- FREITAS NETO, O.C. **Importância do flagelo para a patogenicidade de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum**. Tese [Doutorado em Medicina Veterinária] - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2012. 111p.
- GALDINO, V.M.C.A.; MELO, R.T.; OLIVEIRA, R.P.; MENDONÇA, E.P.; NALEVAIKO, P.C.; ROSSI, D.A. Virulência de *Salmonella* de origem avícola e resistência antimicrobiana. **Bioscience Journal**, v.29, n.4, p.923-939, 2013.
- GANESAN, V.; HARISH, B.N.; MENEZES, G.A.; PARIJA, S.C. Detection of *Salmonella* in Blood by PCR using *iroB* gene. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v.8, n.11, p.01-03, 2014.
- GIBSON, D.L.; WHITE, A. P.; RAJOTTE, C. M.; KAY, W.W. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v. 153, n.4, p.1131-1140, 2007.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Paleontologia Electronica**, 4(1), 2001. 275p.
- HENSEL, M. **Pathogenicity islands and virulence of *Salmonella enterica***. In: MASTROENI, P.; MASKELL, D. *Salmonella* Infections clinical, imunological and molecular aspects. University of Cambridge, chapter 6, p.146-167, 2006.
- HONG, H.J., KIM, T.H., SONG, W.S.; KANG, S.G.; YOON, S. Crystal structure of FlgL and its implications for flagellar assembly. **Scientific Reports**, v.8, p.1-11, 2018.
- HONGYU, K.; SANDANIELO, V.L.M.; OLIVEIRA-JUNIRO, G.J. Principal Component Analysis: theory, interpretations and applications. **E&S - Engineering and Science**, v.1, p.83-90, 2015.

- INOUE, Y.; MORIMOTO, Y.V.; NAMBA, K.; MINAMINO, T. Novel insights into the mechanism of well-ordered assembly of bacterial flagellar proteins in *Salmonella*. **Scientific Reports**, v.8, n.1787, p.1-11, 2018.
- JOHNSON, T.J. **Impacts of fecal bacteria on human and animal health - Pathogens and virulence genes**. In: SADOWSKY, M.; WHITMAN R. The Fecal Bacteria. ASM Press, Washington, chapter 7, p.135-164, 2011.
- JONES, M.A. **Fimbriae and flagella of *Salmonella enterica***. In: BARROW, P.A.; METHNER, U. *Salmonella* in domestic animals. Boston: CAB International, p.38-57. 2013.
- KADRY, M.; NADER, S.M.; DORGHAM, S.M.; KANDIL, M.M. Molecular diversity of the *invA* gene obtained from human and egg samples. **Veterinary World**, v.12, n.7, p.1033-1038, 2019.
- KAGIRITA, A.A.; BAGUMA, A.; OWALLA, T.J.; BAZIRA, J.; MAJALIJA, S. Molecular Characterization of *Salmonella* from Human and Animal Origins in Uganda. **International Journal of Bacteriology**, v. 19, p.1-9, 2017.
- KAUR, J.; JAIN, S.K. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. **Microbiological Research**, v.167, p.199-210, 2012.
- KOTTWIZ, L.B.M.; OLIVERIRA, T.C.R.M.; ALOCER, I.; FARAH, S.M.S.S.; ABRAÃO, W.S.M.; RODRIGUES, D.P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 32, n. 1, p.9-15, 2010.
- KOTTWIZ, L.B.M.; OLIVERIRA, T.C.R.M.; Methods of phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis and the usefulness of PFGE technique in epidemiologic studies. **Biosaúde**, v. 13, n.1/2, p.38-50, 2011.
- KOTTWIZ, L.B.M. ***Salmonella* spp.: avaliação epidemiológica de surtos notificados no Paraná e caracterização de amostras epidêmicas e de origem avícola**. Tese [Doutorado em Ciências de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009. 124p.
- KOTTWIZ, L.B.M.; SCHEFFER, M.C.; COSTA, L.M.D.; LEO, J.A.; BACK, A. RODRIGUES, D.P.; MAGNANI, M. OLIVEIRA, T.C.R.M. Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipagem e caracterização molecular de cepas de *Salmonella* Enteritidis de origem avícola. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n.2, p.705-712, 2012.
- LI, Q.; YIN, J.; LI, Z.; DU, Y.; GUO, W.; BELLEFLEUR, M.; WANG, S. SHI, H. Serotype distribution, antimicrobial susceptibility, antimicrobial resistance genes and virulence genes of *Salmonella* isolated from a pig slaughterhouse in Yangzhou, China. **AMB Express**, v.9, n.1, p.1-12, 2019.
- LIBBY, S.J.; HALSEY, T.A.; ALTIER, C.; POTTER, J.; GYLES, C.L. ***Salmonella***, In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 3 Ed., chapter 14, p.143-167, 2004.
- MARTINS, L.M. **Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão**. Dissertação [Mestrado em Ciências] - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. 127p.

MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, amostras de frangos de corte no Brasil.** Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais. 2016. 131p.

MILLER, S.I.; SCHERER, C.A. **Principles of Bacterial Pathogenesis. Chapter 7 - Patogênese Molecular de *Salmonellae*.** Edited by Eduardo A. Groisman, p.265-333, 2001.

MORALES, C.A.; PORWOLLIK, S.; FRYE, J.G.; KINDE, H.; MCCLELLAND, M.; GUARD-BOULDIN, J. Correlation of phenotype with the genotype of egg-contaminating *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.4388–4399, 2005.

MOURA, M.S.; OLIVEIRA, R.P.; MELO, R.T.; MENDONÇA, E.P.; FONSECA, B.B.; ROSSI, D.A. Genes de virulência e diversidade genética em *Salmonella* spp. isoladas de amostras de origem suína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1367-1375, 2014.

MKRTCHYAN, M.S.; ZAKHARYAN, M.K. ARAKELOVA, K.A. SEDRAKYAN, A.M.; GEVEORVYAN, Z.U., KTSOYAN, Z.A. Molecular determinants of virulence genes of *Salmonella* Enteritidis prevailing in Armenia. **Chemistry and Biology**, n.1, p.55-60, 2016.

MTHEMBU, T.P.; OLIVER, T.Z.; EL ZOWALTY, M. Detection and Molecular Identification of *Salmonella* Virulence Genes in Livestock Production Systems in South Africa. **Pathogens**, v.8, n. 124, p.1-17, 2019.

NUNES, I.A.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MEAD, G.G.; SANTOS, M.A.A.; SOLARI, C.A.; SILVA, O.R.; FERREIRA, A.J.P. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis form different sources in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 66, n.2, p. 324-327, 2003.

OCHOA, I.M.F.; RODRÍGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidade de *Salmonella* sp. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v.47, n. (1-2), p.25-45, 2005.

OHUD, M.A.H.; EMAN, M.; HALAWANI, S. A. Detection of *Salmonella* strains in clinical samples from Saudi Arabia by *invA* and *hliA* polymerase chain reaction (PCR)-based assays. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n.25, p.5410-5416, 2012.

OLIVEIRA, A.P.; SOLA, M.C.; FEISTEL, J.C.; MOREIRA, N.M.; OLIVEIRA, J.J. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v.9, n.16, p. 1947-1972, 2013.

OLIVEIRA, S.D.; BESSA, M.C.; SANTOS, L.R.; CARDOSO, M.R.I.; BRANDELLI, A.; CANAL, C.W. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.720-728, 2007.

OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; MICHAEL, G.B.; CAROSOS, M. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.1, p.123-124, 2003.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.; CANAL, C.W. Detection and identification of *Salmonellas* from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p.25-35, 2002.

- PETERSON, G.; GERDES, B.; BERGES, J. NAGARAJA, T.G.; FRYE, J.G.; BOYLE, D.S.; NARAYANAN, S. Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays for identification of serovars and virulence genes in *Salmonella* enterica of human or animal origin. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, n.4, p.559-569, 2010.
- PERESI, J.T.M.; ALMENIDA, I.A.Z.C.; LIMA, L.S.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S.; IRINO, K. Food borne disease outbreaks caused by *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v.32, n.5, p.477-483, 1998.
- PORWOLLIK, S.; SANTIVIAGO, C.A.; CHENG, P.; FLOREA, L.; JACKSON, S.; MCCLELLAND, M. Differences in gene content between *Salmonella* enterica serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.6545–6555, 2005.
- RAFFATELLU, M. WILSON, R.P.; CHESSA, D.; ANDREWS-POLYMENIS, H.; TRAN, QUYNH, T.T.; LAWHON, S.; KHARE, S.; ADAMS, L.G. BAUMLER, A.J. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 Contribute to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.73, n.1, p.146-154, 2005.
- RENCHER, A.C. Methods of Multivariate Analysis. Wiley-Interscience, 2^aed, Canada. 695p. 2002.
- RESENDE, A.R. **Fatores de patogenicidade e estudo epidemiológico de *Salmonella* Minnesota de origem avícola**. Dissertação [Mestre em Ciências Veterinárias] - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais, 2015. 67p.
- ROCHA, D.C.C.; MARINHO, A.N.R.; REIS, M.S.O. BORGES, I.R.; RAMOS, F.L.P.; LOUREIRO, E.C.B. Perfil epidemiológico e caracterização molecular de *Salmonella* Typhi isoladas no Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.5, n.4, p.53-62; 2014.
- ROWLANDS, R.E.G. **Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de virulência em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou não a toxinfecções alimentares**. Dissertação. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008. 96p.
- RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; BESSA, M.C.; NASCIMENTO, V.P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.296-299, 2007
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 4^a ed. Belo Horizonte, 2015. 256p.
- SANTANA, E.S.; OLIVEIRA, F.H.; ROCHA, T.M.; SANTANTA, R.R.; ANDRADE, M.A. Abordagem sobre *Salmonella* sp. com enfoque na caracterização, patogênese e métodos de diagnóstico em aves. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, vol.7, n.12; p. 1-23, 2011.
- SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; RODRIGUES, D.P.; REIS, E.M.F.; SEKI, L.M.; RIBEIRO, A.R.; FERNANDES, S. Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.1, p.1-4, 2003.
- SALEHI, T.Z.; MADADGAR, O.; NASERLI, S.; FASAEI, N.B.; GHAFARI, M.M.; TAMAI, A. Detection of sef14, sef17, and sef21 fimbrial virulence genes of *Salmonella*

Enteritidis by multiplex PCR. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.10, n.11, p.1421-1426, 2011.

SARAH, A.A.; MOSTAFA, N.Y. KIRRELLA, G.A.K.; ELEIWA, N.Z.; EL-MAGD, M.A. Molecular detection of *invA* and *hilA* virulent genes in *Salmonella* serovars isolated from freshwater fish. **Slovenian Veterinary Research**, v.56, n.22, p.693-698, 2019.

SHAH, D.H.; ZHOU, X.; ADDWEBI, T.; DAVIS, M.A.; ORFE, L.; CALL, D.R.; GUARD, J.; BESSER, T. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. **Microbiology**, v. 157, n.5, p.1428-1445, 2011.

SILVA, C.; PUENTE, J.L.; CALVA, E. *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. **Pathogens and Disease**, v.75, p.1-5, 2017.

SKYBERG, J.A.; CATHERINE, M.L.; NOLAN, L.L. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. **Avian Diseases**, v.50, n.1, p. 77-81, 2006.

SOTO, S.M.; RODRIGUEZ, I.; RODICIO, M.; VILA, J.; MENDOZAL, C. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.365–373, 2006.

SRIKANTH, C.V.; MERCADO-LUBO, R.; HALLSTROM, K.; McCORMICK, B.A. *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v.68, n.22, p.3687-3697, 2011.

THOMSON, N.R.; CLAYTON, D.J.; WINDHORST, D.; VERNIKOS, G.; DAVIDSON, S.; CHURCHER, C.; QUAIL, M.A.; STEVENS, M.; JONES, M.A.; WATSON, M.; BARRON, A.; LAYTON, A.; PICKARD, D.; KINGSLEY, R.A.; BIGNELL, A.; CLARK, L.; HARRIS, B.; ORMOND, D.; ABDELLAH, Z.; BROOKS, K.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; WOODWARD, J.; NORBERCZAK, H.; LORD, A.; ARROWSMITH, C.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; SANDERS, M.; WHITEHEAD, S.; CHABALGOITY, J.A.; MASKELL, D.; HUMPHREY, T.; ROBERTS, M.; BARROW, P.A.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome Research**, v.18, n.10, p.1624-1637, 2008.

THUNG, T.Y.; RADU, S.; MAHYUDIN, N.A.; RUKAYADI, Y.; ZAKARIA, Z. MAZLAN, N.; TAN, B.H.; LEE, E.; YEOH, S.L.; CHIN, ÇY.Z.; TAN, C.W.; KUAN, C.H.; BASRI, D.F.; RADZI, CH.W.J.W.M. Prevalence, Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Serovars from Retail Beef in Selangor, Malaysia. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1- 8, 2018.

ZADERNOWSKA, A. CHAJÊCKA, W. **Detection of *Salmonella* spp. Presence in Food. *Salmonella* – A Dangerous Foodborne Pathogen.** Edited by Barakat S. M. Mahmoud. Chapter 18, p.450, 2012.

ZOU, M.; KEELARAS, S.; THAKUR, S. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.3, p.232-238, 2012.

WEBBER, B.; BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; RIZZO, N.N.; TONDO, E.C.; SANTOS, R.S.; RODRIGUES, L.B.; NASCIMENTO, V.P. Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.61, n.36, p.1-7, 2019.

YANG, Y.; ZHANG, J.; ZHU, C.; MENG, X.; SUN, S.; ZHU, G. A promising detection candidate for flagellated *Salmonella* spp. **AMB Express**, v.9, n. 128, 2019.

CAPÍTULO IV

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *SALMONELLA* spp. ISOLADAS DE SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA) OCORRIDOS EM MINAS GERAIS/BRASIL

RESUMO

Salmonella spp. destaca-se como um dos principais patógenos implicados em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em vários países. A compreensão da biodiversidade genética desse patógeno, constantemente isolado nos eventos de DTA, é imprescindível para ações de Vigilância em Saúde, pois permite rastrear a origem do mesmo, investigar surtos de DTA e conhecer a dinâmica epidemiológica da salmonelose humana na cadeia alimentar. Neste trabalho, avaliamos o polimorfismo genético em 70 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em casos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017, por meio amplificação das sequências de elementos repetitivos, REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*). Previamente à avaliação das interações filogenéticas, observou-se a alta reprodutibilidade, tipabilidade e bom índice discriminatório da técnica REP-PCR, principalmente, na caracterização intra sorotipo de *Salmonella* spp.. Em *S. Enteritidis* (n=40), observaram-se três *clusters* compartilhando mais de 80% de similaridade e 14 padrões eletroforéticos (ID = 0,80); o maior deles composto por 17 indivíduos (42,5%) indistinguíveis, procedentes de alimentos variados, coletados em diferentes regiões geográficas do Estado de Minas Gerais entre 2004 e 2017. O agrupamento composto por *S. Typhimurium* (n=12) apresentou dois *clusters* e seis perfis distintos (ID=0,74); o maior deles com cinco (41,6%) amostras bacterianas com idêntico polimorfismo genético. O grupo “Outros sorotipos”, composto por vários sorotipos, caracterizou-se por três *clusters* e 11 perfis com impressão digital única (ID=0,89). Nossos resultados demonstraram que, embora as amostras de *Salmonella* spp. isoladas em Minas Gerais ao longo de mais de uma década se caracterizem por possuir um genoma relativamente variável, muitos sorotipos apresentaram elevada similaridade genética e, em alguns casos, “*impressões digitais*” idênticas. Por meio deste experimento, foi possível também observar a circulação de perfis genéticos únicos, constantes e predominantes, principalmente o *subcluster* C5 de *S. Enteritidis*, em várias mesorregiões estaduais e em distintos períodos, corroborando, dessa forma, a hipótese de circulação clonal de alguns sorotipos em Minas Gerais entre os anos de 2003 a 2017. Adicionalmente, maior habilidade de discriminar agrupamentos biologicamente e epidemiologicamente relacionados foi observada com a associação dos métodos fenotípicos e genotípicos, descritos nos capítulos anteriores, demonstrando, assim, a importância da análise combinada em processos de caracterização microbiana.

Palavras-chaves: *Salmonella* spp.. Diversidade Genética. REP-PCR.

ABSTRACT

Salmonella spp. stands out as one of the main pathogens implicated in foodborne diseases (DTA) in the world. Understanding the genetic biodiversity of this pathogen constantly isolated in food poisoning events is essential for Health Surveillance actions, as it allows to trace its origin, investigate outbreaks of food poisoning and know the epidemiological dynamics of human salmonellosis in the food chain. In this work, we evaluated the genetic polymorphism among 70 samples of *Salmonella* spp., isolated from foods implicated in human salmonellosis cases in Minas Gerais State / Brazil, from 2003 to 2017, by the sequences of repetitive elements, REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic). Previously the evaluation of phylogenetic interactions, it was observed the high reproducibility, typability and good discriminatory index of the REP-PCR technique, mainly in the intra characterization of *Salmonella* spp. serotype. Among *S. Enteritidis* (n =40), three clusters were observed sharing more than 80% similarity and 14 electrophoretic patterns (ID = 0.80), the largest of which was composed of 17 indistinguishable individuals (42.5%), coming from varied foods, collected in different geographic regions of the State from 2004 to 2017. The grouping composed of *S. Typhimurium* (n =12) had two clusters and six distinct profiles (ID = 0.74), the largest with five (41.6%) bacterial samples with identical genetic polymorphism. The group “Other serotypes”, composed of several serotypes, was characterized by three clusters and 11 profiles with a unique fingerprint (ID = 0.89). Our results demonstrated that although the samples of *Salmonella* spp. isolated in Minas Gerais over more than a decade are characterized by having a relatively variable genome, many serotypes showed high genetic similarity and, in some cases, identical fingerprints. According to this experiment, it was also possible to observe the circulation of unique, constant and predominant genetic profiles, mainly the C5 subcluster of *S. Enteritidis*, between several State mesoregions and in different periods, thus corroborating the hypothesis of clonal circulation of some serotypes in Minas Gerais from 2003 to 2017. In addition, greater ability to discriminate biologically and epidemiologically related to clusters was observed with the association of phenotypic and genotypic methods, in previous chapters, thus demonstrating the importance of combined analysis in microbial characterization processes.

Keywords: *Salmonella* spp.. Genetic Diversity. REP-PCR.

1. INTRODUÇÃO

A salmonelose humana representa um grave problema de saúde pública mundial, no qual o ônus econômico e social dos países industrializados e subdesenvolvidos se deve aos custos associados à vigilância, à prevenção, ao tratamento e óbito dos enfermos (Eng *et al.*, 2015). Mais de 95% dos casos de salmonelose humana têm origem no consumo de alimentos contaminados (Mesquita, 2016), principalmente, os de origem animal (Carvalho *et al.*, 2017) tais como, carne e derivados de bovinos, suínos e aves, leite e derivados e ovos crus (Ferrari *et al.* 2019).

A compreensão da diversidade genética de *Salmonella* spp. isolada de fontes humana e não humana é imprescindível para conhecer a dinâmica epidemiológica da salmonelose na cadeia alimentar (Tejada *et al.*, 2016). Por meio desta caracterização é possível a identificação retrospectiva de clones epidêmicos, bem como rastrear sua disseminação em populações humanas e animais, contribuindo para o planejamento de programas de controle de patógenos transmitidos por alimentos (Lozano-Villegas *et al.* 2019).

Diversos métodos de tipagem molecular estão disponíveis para a determinação da variabilidade genética *Salmonella* spp. De maneira geral, as técnicas de discriminação baseiam-se em três mecanismos principais de discriminação: (1) análise de restrição do DNA bacteriano, (2) amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de alvos genéticos específicos e (3) identificação do polimorfismo da sequência de DNA em *loci* específicos no genoma (Hyeon *et al.*, 2013).

Dentre estas técnicas, uma abordagem altamente reprodutível, com bom poder discriminatório (Flaws, Buckingham 2007) de baixo custo, fácil e de rápida execução, baseia-se na análise de sequências repetitivas de DNA por PCR (Fardsanei *et al.*, 2016). Esta técnica, denominada, rep-PCR, faz uso de oligonucleotídeos complementares a sequências de DNA repetitivas, localizados em regiões genéticas altamente conservadas, não codificantes, em múltiplas cópias, cuja variação ocorre em quantidade, tamanho e localização em cada célula microbiana. (Rasschaert *et al.*, 2005; Alcocer *et al.*, 2006, Oliveira *et al.*, 2007, Carneiro, 2009; Sabat *et al.*, 2013; Hashemi, Baghbani-arani 2015).

O método rep-PCR é empregado no estudo taxonômico, filogenético e epidemiológico de patógenos humanos, animais e fitopatógenos desde 1991 (Versalovic *et al.*, 1991; Ugorski e Chmielewski, 2000; Alves, 2003; Alcocer *et al.*, 2006; Riley, 2009). Nos últimos anos, o

mesmo se encontra disponível inclusive por meio de automatização, conforme observado no sistema comercial Diversilab (Hyeon *et al.* 2011), que emprega a eletroforese capilar microfluidica para aumentar a resolução e reprodutibilidade em comparação com a abordagem que utiliza a eletroforese em gel de agarose tradicional (Chenu *et al.*, 2011; Sabat *et al.*, 2013).

A real função de rep-PCR não é totalmente conhecida, mas há evidências de seu envolvimento em vários processos celulares. Foi proposto que as sequências repetitivas desempenham um importante papel como atenuadores da transcrição, embora não sejam terminadoras específicas (Tobes e Pareja, 2006). Com base em seu papel como estabilizadores de RNAm, também foi sugerido que estes elementos repetitivos estão envolvidos no fino ajuste da expressão gênica (Ugorski e Chmielewski, 2000; Suh e Song 2006). Entre as famílias de rep-PCR mais amplamente utilizadas, destacam-se as sequências palindrômicas extragênicas repetitivas (REP-PCR); as sequências intergênicas consensuais altamente repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR); o elemento BOX e o politrinucleotídeo GTG5 (Poonchareon *et al.* 2019).

Neste trabalho, utilizamos a técnica REP-PCR e uma análise combinada com a susceptibilidade antimicrobiana (Capítulo II) e pesquisa de genes de virulência e gene *PT4* (Capítulo III), para avaliar biodiversidade de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos em casos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras

Um total de 70 amostras de *Salmonella* spp. foi obtido da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Fundação Ezequiel Dias para este estudo. Todas as amostras foram isoladas de alimentos implicados em surtos de salmonelose humana em Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017, por meio do método APHA (2001) e mantidas em criopreservação em glicerol 20% à temperatura de - 80°C.

2.2 Análise molecular

O DNA utilizado neste estudo foi obtido conforme capítulo III, item 2.2 - Detecção dos genes codificadores de fatores de virulência. A tipagem de *Salmonella* spp. foi realizada pela rep-PCR, conforme descrito por Versalovic *et al.* (1991) utilizando-se os *primers* REP1R-I 5' IIIIGCGCCGICATCAGGC-3' e REP2-I 5-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3' (Invitrogen TM – São Paulo, Brasil). As reações da PCR foram feitas em um volume final de 25 µL contendo 2,5µL tampão (10X), 2,5µL de MgCl₂ (5.0mM) (Invirogen TM – Carlsbad, EUA), 3,125µL

DNTp (1.25mM) (Promega U1515 – Madison, EUA), 1 μ L *primer* (50 pmol), 2U Taq polimerase (Invitrogen™ 11615.010 – Carlsbad, EUA) e 5,0 μ L DNA (100ng DNA template). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 95°C/7 min; seguindo-se 30 ciclos de 95°C/1min; 45°C/1min; 65°C/8min e extensão final de 65°C/16min. Para reações de amplificação, utilizou-se o termociclador Eppendorf® Mastercycler Gradient 22331 (Hamburg, Alemanha).

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v), (Promega VE3125 – Madison, EUA) preparado com tampão Tris Borato-EDTA - TBE 10X (Invitrogen AM9863 – Vilnius, Lituânia) e solução brometo de etídio 1% (Merck 123945.8 – Hesse, Alemanha) a 100V/210 minutos. Cada corrida foi acompanhada do marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ SM1331 – Vilnius, Lituânia). A análise dos produtos amplificados foi realizada nos sistemas Molecular Imagen® Gel DoC™ XR and System with Image Lab™ BIO RAD (Califórnia, EUA). Para avaliar a reprodutibilidade do experimento, as etapas de amplificação e eletroforese foram realizadas em duplicata e em dias diferentes.

2.3 Análise estatística

Para estas análises, as amostras foram agrupadas por sorotipos. Os resultados foram analisados com auxílio do *software* BioNumerics versão 7.6 (Applied-Maths, Kortrijk, Belgium). A biodiversidade genética entre os perfis foi realizada utilizando o coeficiente de Dice (1945) com 1% de tolerância e 0,5% de otimização. Essa matriz foi transformada em dendogramas utilizando o Método de Agrupamento Pareado não Ponderado baseado na Média Aritmética (UPGMA) e em um sistema cúbico de coordenadas tridimensional pelo Método de Agrupamento não Hierárquico, utilizando o dimensionamento multidimensional (MDS). O poder discriminatório (D) foi calculado com base no coeficiente de Simpson, representado pelo índice de diversidade (ID) (Hunter, Gaston 1988). Para interpretação dos padrões eletroforéticos, perfis com similaridade $\geq 80\%$ foram considerados possivelmente relacionados e aqueles com similaridade de 100% foram considerados perfis clonais, conforme proposto por Zomorodi *et al.* (2020).

2.4 Análise conjunta dos dados

Resultados da susceptibilidade antimicrobiana (Capítulo II), da pesquisa de genes de virulência e do gene *PT4* (Capítulo III) e tipagem por REP-PCR foram utilizados em conjunto para

construção de uma análise combinada de métodos fenotípicos e genotípicos, e maior discriminação das amostras de *Salmonella* spp..

3. RESULTADOS

Por meio da técnica de REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*), realizou-se a tipagem molecular de 70 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de diferentes alimentos implicados em surtos Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil (2003 a 2017), conforme demonstrado na imagem de eletroforese em gel de agarose (Figura A). Todas as amostras foram tipáveis pela REP-PCR e os perfis eletroforéticos reprodutíveis.

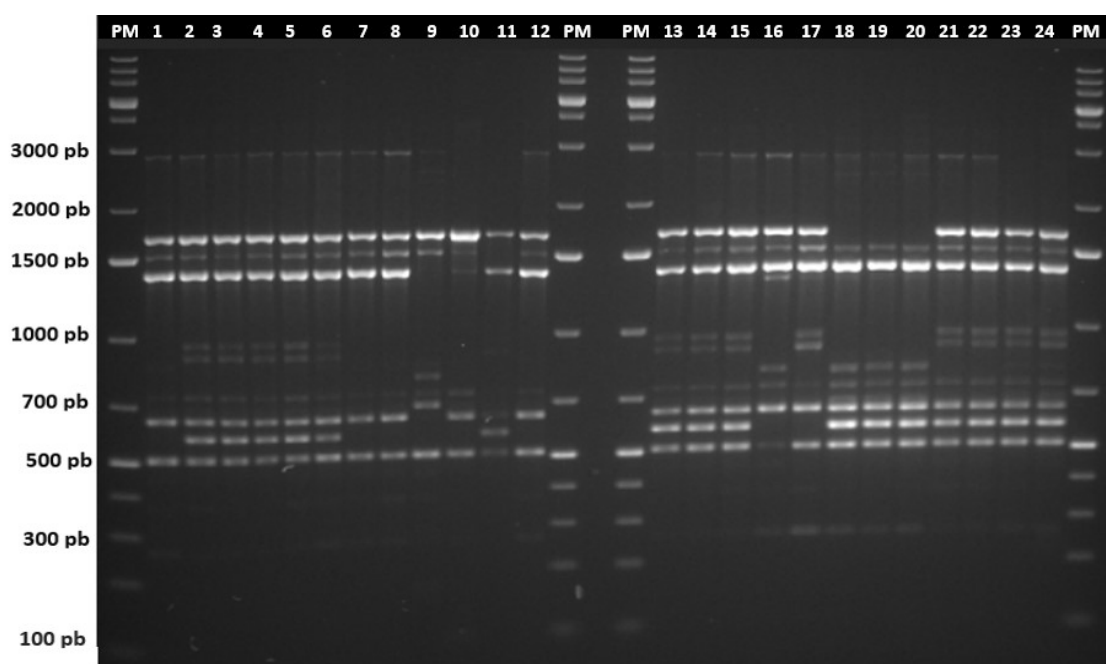


Figura A: Eletroforese em gel de agarose 2% com diferentes perfis eletroforéticos de *Salmonella* spp. tipáveis por rep-PCR.

Amostras nº 01 a 12 – *S. Typhimurium*; 13 - *S. Agona*; 14 – *S. Heidelberg*; 15 – *S. Panama*; 16 – *S. Infantis*; 17 – *S. Santipaul*; 18 à 20 – *S. Corvallis*; 21 – *S. Abony*; 22 – *S. Schwarzengrund*; 23 – *S. Braenderup*; 24 – *S. Rissen*. PM = marcador peso molecular 1kb Plus DNA Ladder. pb (pares de base).

Entre as amostras de *S. Enteritidis*, observou-se a existência de três *clusters* compartilhando mais de 80% de similaridade e 14 padrões eletroforéticos (ID = 0,80), o maior deles composto por 17 amostras (42,5%) indistinguíveis. Oito amostras (20%) de *S. Enteritidis* caracterizaram-se por perfis únicos e exclusivos para cada isolado. O agrupamento de *S. Typhimurium* apresentou dois *clusters* com similaridade superior a 80% e seis perfis distintos (ID=0,74), o maior deles com cinco (41,6%) amostras geneticamente indistinguíveis. O grupo “Outros

sorotipos”, composto por vários sorotipos, caracterizou-se por três *clusters* cuja similaridade foi superior a 80% e por 11 perfis com impressão digital única (ID=0,89) (Tabela 1).

Tabela 1: Índice de Diversidade de Simpson, nº de *clusters* e de perfis em diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2003 a 2017

S. Enteritidis (n=40)			S. Typhimurium (n=12)			Outros sorotipos (n=18)		
ID (IC)	<i>Clusters</i> / perfil	Perfis	ID (IC)	<i>Clusters</i> / perfil	Perfis	ID (IC)	<i>Clusters</i> / perfil	Perfis
0,80 (0,76 a 0,81)	3/14	2,1,3,4, 1,4,17, 2,1,1,1, 1,1,1	0,74 (0,68 - 0,79)	2/6	3,1,1,5, 1,1	0,89 (0,88 a 0,90)	3/11	1,1,3,1, 1,2,1,2, 2,3,1

n: número de amostras

ID: Índice de Diversidade de Simpson

IC: Intervalo de confiança com 95% de probabilidade

Cluster: agrupamentos compartilhando amostras geneticamente relacionadas, ou seja, similaridade $\geq 80\%$

Amostras de *S. Enteritidis* apresentaram similaridade genética de 48,9 a 100% (Figura B). Trinta e sete amostras (92,5%) subdividiram-se em três *clusters* (A, C e D) cuja similaridade foi superior a 80%. O *cluster* C, composto por 29 sorotipos, subdividiu-se em cinco *subclusters* (C1 a C5) e a similaridade alternou entre 93,4 e 100%. No *cluster* D, composto por seis amostras e quatro *subclusters* (D1 a D4), a similaridade variou de 87,4 a 100%. O agrupamento de maior frequência (C5), composto por 17 amostras indistinguíveis (100% de similaridade), procedeu de alimentos variados, coletados em 16 surtos de DTA, ocorridos entre os anos 2004 a 2017, em diferentes regiões geográficas do Estado. Três amostras (*S. Enteritidis* nº 19, 23, 39) não foram agrupadas em nenhum *cluster* (B, E e F), sendo que as duas últimas apresentaram maior distanciamento genético (menos de 60% de similaridade) em relação às demais amostras do grupo. A média de nove *amplicons* por sorotipo contrapôs-se com os extremos quatro e 14 de outros sorotipos. Os produtos de amplificação continham tamanhos entre 200 a 3000 pb, sendo dois deles, com aproximadamente 500 e 700 pb, encontrados em todos os sorotipos de *S. Enteritidis*. Observaram-se outros dois *amplincons*, com aproximadamente 1.400 e 1.700 pb, em 39 (97,5%) amostras.

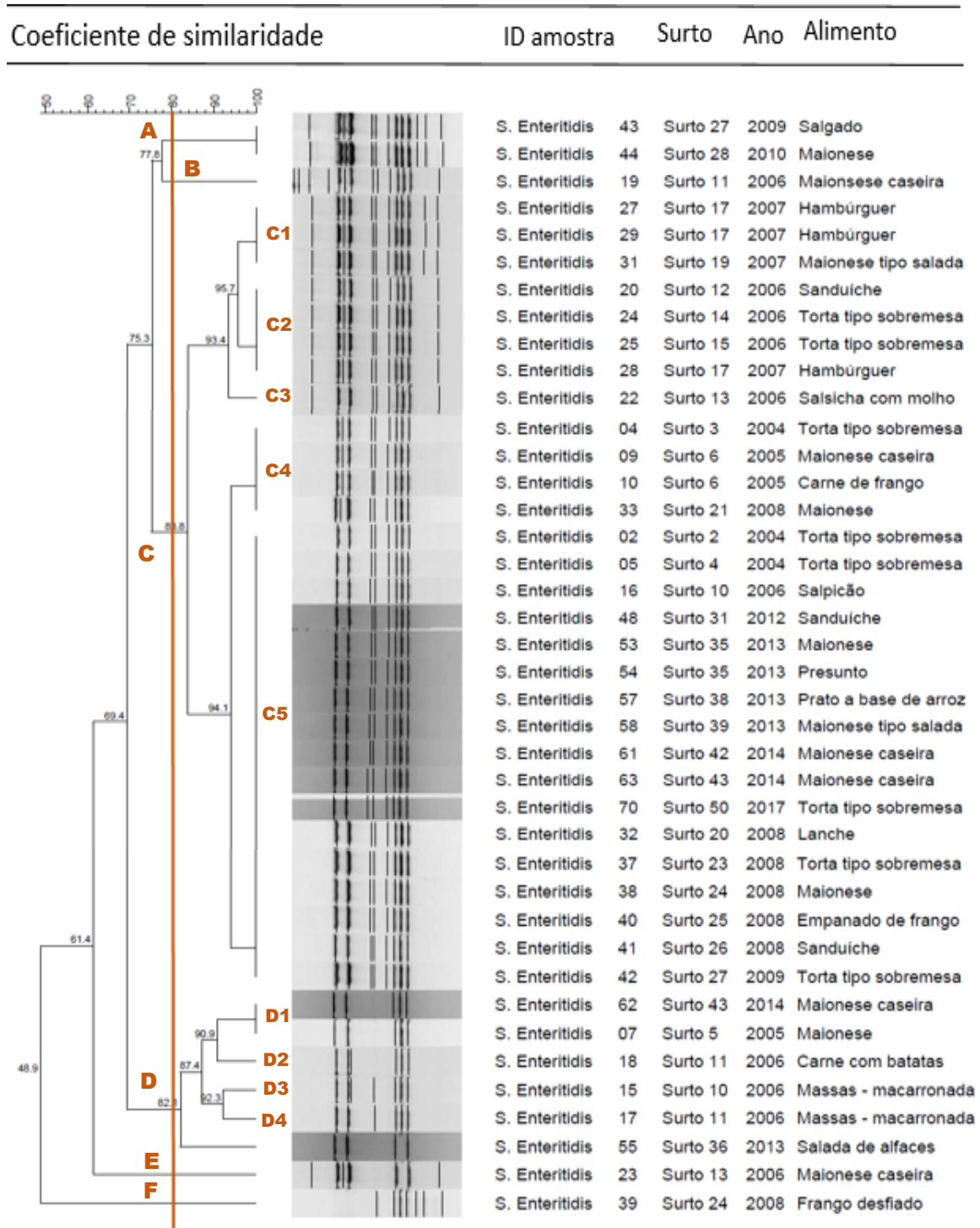


Figura B: Dendrograma da diversidade genética de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2004 a 2017, determinado pelo Método de Agrupamento Pareado não Ponderado baseado na Média Aritmética (UPGMA) e coeficiente de similaridade Dirce com correlação de 80%.

No grupo de *S. Typhimurium*, a similaridade genética oscilou de 54,8 a 100% (Figura C). Dez amostras (83,4%), presentes nos *clusters* A e B, compartilharam similaridade superior a 80%. A presença de amostras indistinguíveis (100% de similaridade) foi observada em amostras detectados no mesmo surto (surto 29) e também em algumas amostras bacterianas provenientes de surtos distintos (surtos 3, 6, 8, 9 e 18), ocorridos em diferentes períodos e regiões geográficas do Estado de Minas Gerais. A média de oito *amplicons* e extremos de cinco e 10 foram observados entre as amostras de *S. Typhimurium*. Os produtos de amplificação continham tamanhos entre 500 a 3000 pb, sendo dois deles, com tamanhos aproximados de 500 e 1.700 pb, encontrados em todas as amostras de *S. Typhimurium*.

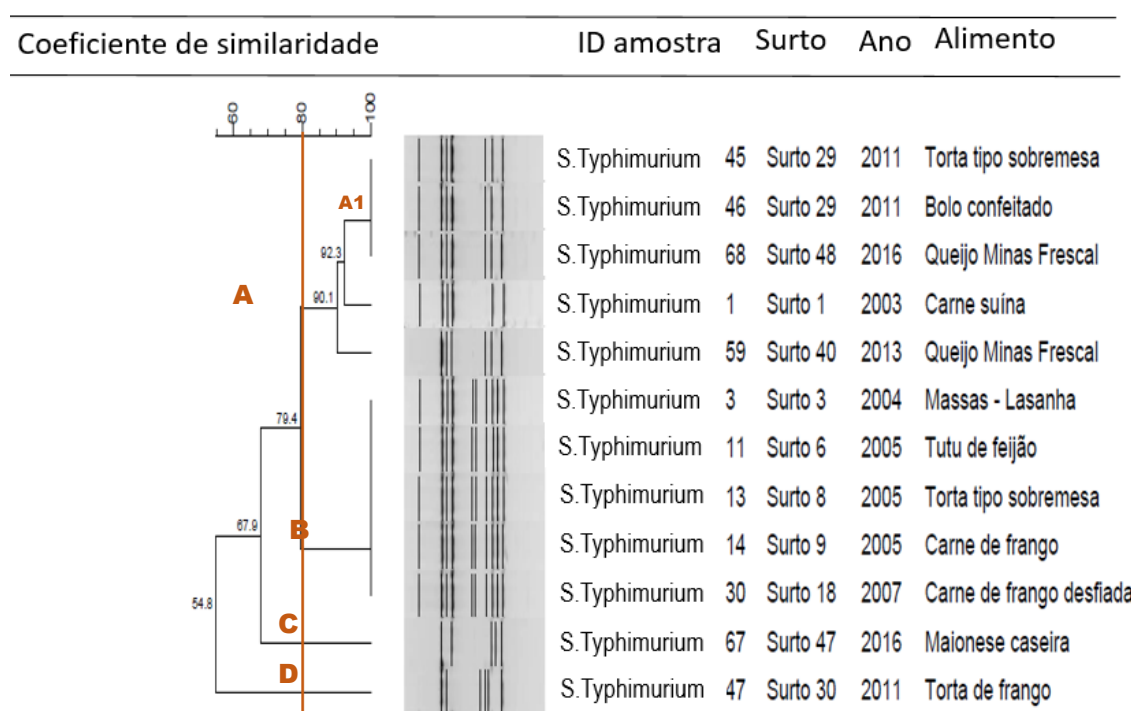


Figura C: Dendrograma da diversidade genética de *S. Typhimurium* isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2003 a 2016, determinado pelo Método de Agrupamento Pareado não Ponderado baseado na Média Aritmética (UPGMA) e coeficiente de similaridade Dirce com correlação de 80%.

Para diferentes sorotipos de *Salmonella* spp., a similaridade genética oscilou de 69,6% a 100% (Figura D). Dezoito amostras foram subdividas nos *clusters* A, B e C, este último com composto por 11 sorotipos (61,1%), seis agrupamentos (C1 a C6) e similaridade superior a 80%. Sorotipos diferentes, presentes nos agrupamentos C1, C3, C4 e C5, isolados em períodos, regiões geográficas e alimentos diferentes, apresentaram perfis indistinguíveis. *S. Corvallis*, isolada do

mesmo surto e em alimentos diferentes, não apresentou diferenças em seu perfil, reforçando, a hipótese de contaminação cruzada entre os alimentos implicados no surto nº 22. Foi visualizada média de nove *amplicons* por sorotipo e extremos de sete e 11 em outros. Entre os diferentes sorotipos foram identificados produtos de amplificação com tamanhos entre 250 a 3.000 pb. Quatro produtos, com aproximadamente 500, 650, 750 e 1.400 pb, foram observados entre os diferentes sorotipos. No presente trabalho, a REP-PCR não forneceu um perfil de bandas único, constante e específico para cada sorotipo analisado.

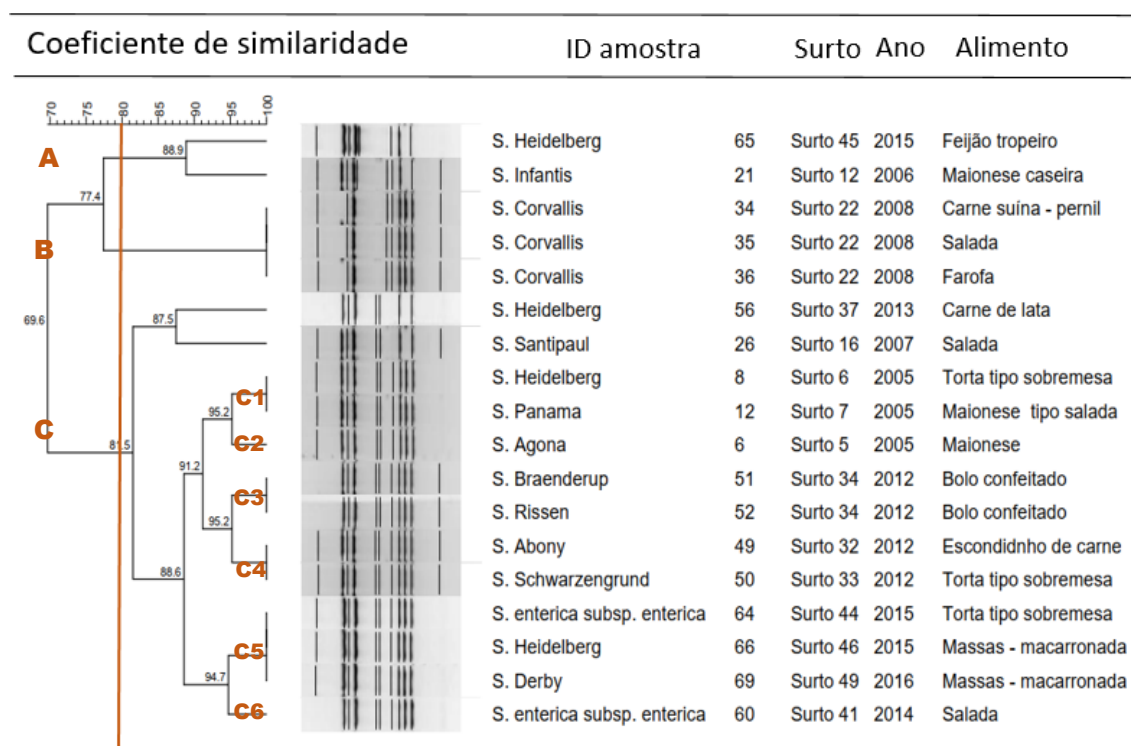


Figura D: Dendrograma da diversidade genética de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2005 a 2016, determinado pelo Método de Agrupamento Pareado não Ponderado baseado na Média Aritmética (UPGMA) e coeficiente de similaridade Dirce com correlação de 80%.

A diversidade genética entre os sorotipos de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e demais sorotipos pode ser claramente visualizada pelo agrupamento não hierárquico conforme o dimensionamento multidimensional (MDS) (Figuras E, F, G e H). Utilizando a mesma escala tridimensional (X, Y e Z) de distanciamento genético, observou-se que as amostras do sorotipo *S. Enteritidis* apresentam maior homogeneidade genética quando comparadas às dos agrupamentos formados pelo sorotipo *S. Typhimurium* e por “outros sorotipos”. A

dissimilaridade genética de *S. Enteritidis* foi observada apenas em duas amostras bacterianas (*S. Enteritidis* nº 23 e 39) isoladas nos anos 2006 e 2008, respectivamente. Por meio da análise conjunta de todas as 70 amostras (Figura H), é possível observar que *S. Enteritidis* se agrupa em diferentes regiões da escala tridimensional (X, Y e Z), quando comparado aos demais sorotipos, porém com maior homogeneidade.

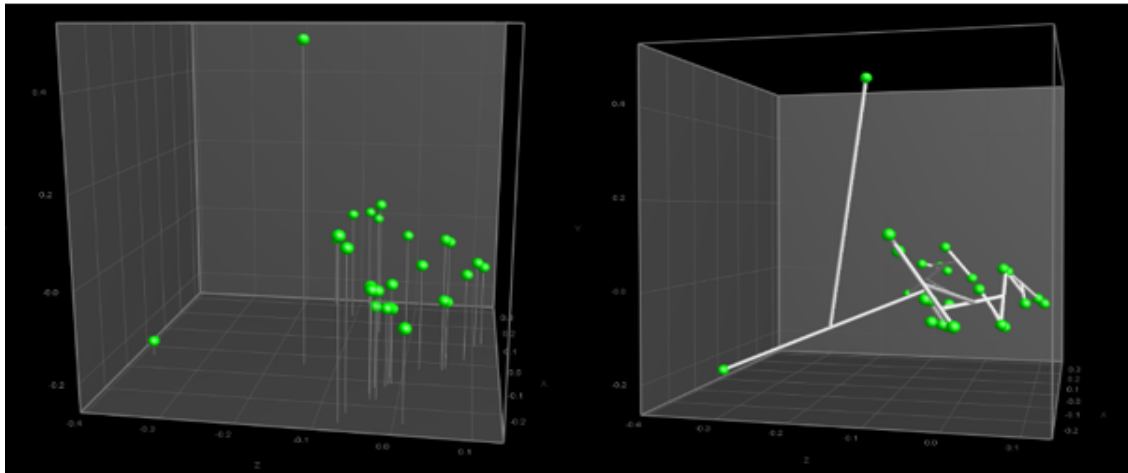


Figura E: Imagem tridimensional (X, Y e Z) da diversidade genética de *S. Enteritidis* (n=40) isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2004 a 2017, determinada pelo método de Agrupamento não Hierárquico Multidimensional (MDS).

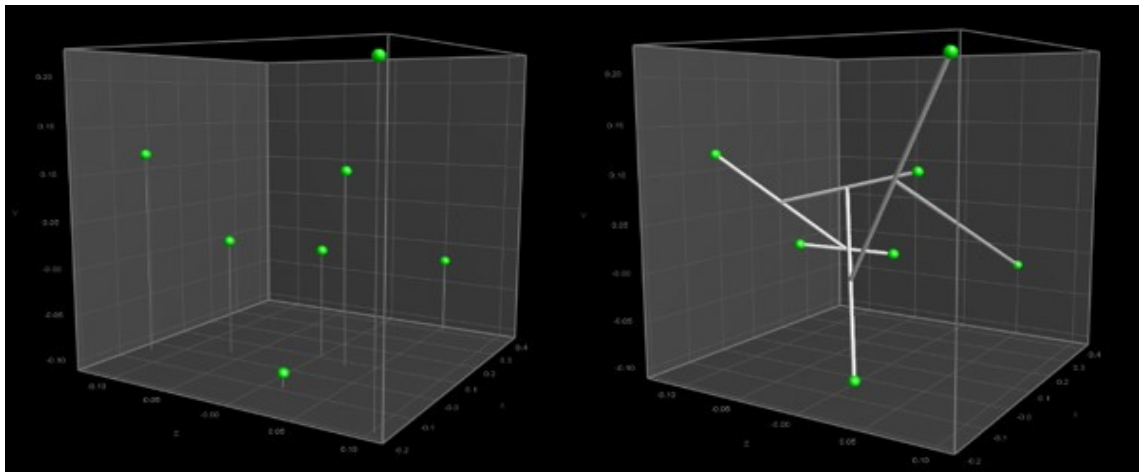


Figura F: Imagem tridimensional (X, Y e Z) da diversidade genética *S. Typhimurium* (n=12) isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2003 a 2016, determinada pelo método de Agrupamento não Hierárquico Multidimensional (MDS).

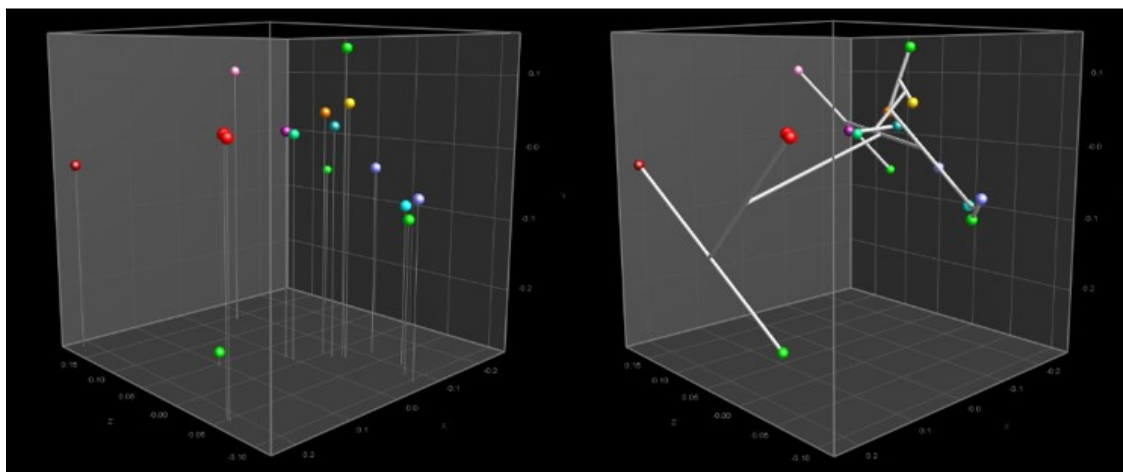


Figura G: Imagem tridimensional (X , Y e Z) da diversidade genética do agrupamento “outros sorotipos” de *Salmonella* spp. ($n=18$) isoladas alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2005 a 2016, determinada pelo método de Agrupamento não Hierárquico Multidimensional (MDS).

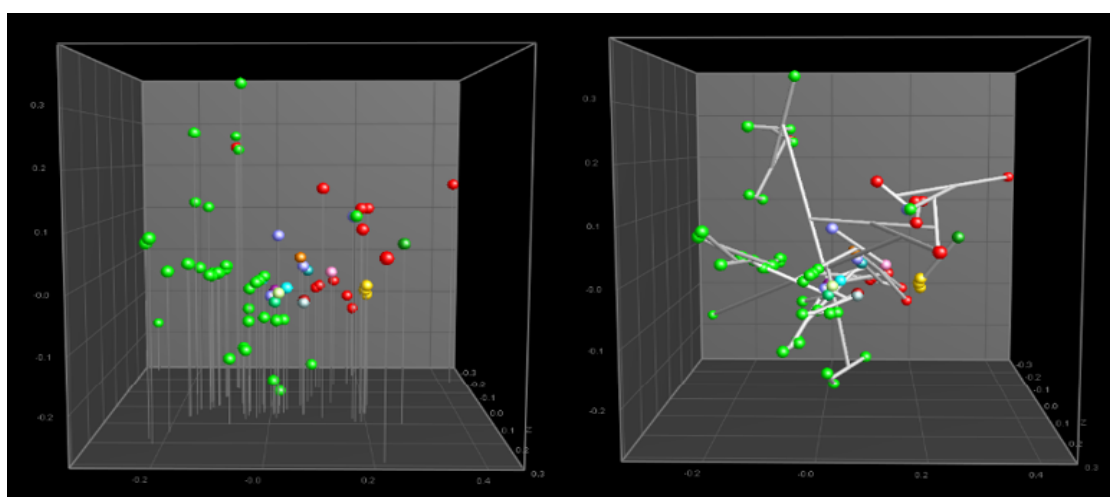


Figura H: Imagem tridimensional (X , Y e Z) da diversidade genética de *Salmonella* spp. ($n=70$) isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2003 a 2017, determinada pelo método de Agrupamento não Hierárquico Multidimensional (MDS).

A Análise conjunta dos resultados de susceptibilidade antimicrobiana (Capítulo II), pesquisa dos genes de virulência e gene *PT4* (Capítulo III) e tipagem por REP-PCR aumentaram a discriminação das amostras de *S. Enteritidis*, resultando em 29 padrões combinados e um ID combinado de 0,95 (Tabela 2). Os padrões combinados C1, C2, C7 C9 e C12 apresentaram pelo menos duas amostras consideradas indistinguíveis, mesmo após combinação dos métodos.

Tabela 2: Análise combinada dos resultados de susceptibilidade antimicrobiana, pesquisa dos genes de virulência e do gene *PT4* e tipagem por REP-PCR de *S. Enteritidis* (n=40) isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre 2004 a 2017

Perfis	Nº/perfil	REP-PCR	Resistência Antimicrobiana	Genes de Virulência	Gene <i>PT4</i>	Padrão combinado	
1	1	A	CIP NAL NIT	----	+	A1	
2	1		NIT	----	+	A2	
3	1	B	CIP NAL NIT	----	+	B	
4	3		CIP NAL NIT	----	+	C1	
5	2		CIP NAL NIT	----	+	C2	
6	1		CIP NAL NIT	----	-	C3	
7	1		----	----	+	C4	
8	1		NIT	----	+	C5	
9	1		NAL NIT	----	+	C6	
10	2		NIT	----	+	C7	
11	1		CIP NAL NIT	<i>sipB sipB spoE</i>	+	C8	
12	4		C	NAL NIT	----	+	C9
13	1			NAL NIT	----	-	C10
14	1			CAZ NAL NIT	----	+	C11
15	5			CIP NAL NIT	----	+	C12
16	1			CIP NAL NIT	----	-	C13
17	1			CIP NAL NIT	<i>sipB</i>	+	C14
18	1			NAL NIT	<i>sopE</i>	+	C15
19	1			NAL TET NIT	----	+	C16
20	1			NIT	----	+	C17
21	1	CIP NAL NIT		<i>lfpA</i>	+	C18	
22	1	D	NIT	----	+	D1	
23	1		NAL NIT	----	+	D2	
24	1		CIP NAL NIT	----	+	D3	
25	1		CIP NAL NIT	----	+	D4	
26	1		CIP NAL NIT	----	+	D5	
27	1		----	<i>sefA sopE spvC</i>	-	D6	
28	1	E	NIT	<i>sefA avrA sipB spvC</i>	+	E1	
29	1		F	CIP NAL NIT	<i>sivH flgL flgK</i>	+	F1

Índice Diversidade de Simpson combinado: 0,95

Breakpoint de similaridade REP-PCR: 80%

CAZ – Ceftazidima, CIP – Ciprofloxacina, NAL – Ácido Nalidixílico, NIT – Nitrofurantoína, TET – Treraciclina

Para o sorotipo *S. Typhimurium*, 11 perfis distintos foram discriminados pelos dois métodos, resultando em um ID combinado de 0,94. Duas amostras deste sorotipo, pertencentes ao padrão

A1 não foram diferenciadas (Tabela 3). Maior diversidade de perfis resistentes aos antimicrobianos testados e presença de todos os fatores de virulência foram observadas em amostras presentes no agrupamento B.

Tabela 3: Análise combinada dos resultados de susceptibilidade antimicrobiana, pesquisa dos genes de virulência e tipagem por REP-PCR de *S. Typhimurium* (n=12) isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/ Brasil, entre 2003 a 2016

Perfis	Nº/perfil	REP-PCR	Resistência Antimicrobiana	Genes de Virulência	Padrão combinado
1	2	A	EST NIT	<i>sefA sopE</i>	A1
2	1		EST NIT	<i>sefA sipB sopE</i>	A2
3	1		NAL NIT	<i>sipB sopE spvC</i>	A3
4	1		EST		A4
5	1	B	NAL	----	B1
6	1		EST CFO CAZ NAL NIT	----	B2
7	1		EST GEN CFO CAZ IMP NAL	----	B3
8	1		EST CFO CAZ NIT	----	B4
9	1		CIP NAL NI	----	B5
10	1	C	NIT	<i>spvC</i>	C1
11	1	D	EST NIT	<i>sefA sopE</i>	D1

Índice Diversidade de Simpson combinado: 0,94

Breakpoint de similaridade REP-PCR: 80%

CAZ – Ceftazidma, CFO – Cefoxitina, EST – Estreptomicina, GEN – Gentamicina, IMP – Imipenem, NAL – Ácido Nalidixílico, NIT – Nitrofurantoína.

Doze sorotipos distintos e duas amostras não sorotipadas de *Salmonella* spp. resultaram em 18 padrões diferentes, após combinação dos métodos fenotípicos e genotípicos. Uma análise conjunta de todos os métodos permitiu a diferenciação *intra* e *inter* sorotipos de todas as amostras de *Salmonella* spp. presentes no grupo “diversos sorotipos”. Uma das amostras de *S. Corvallis* (B3), procedente do mesmo evento de Doença Transmitida por Alimento (Surto 22/2008) somente foi diferenciada das demais pela ausência da proteína efetora *sopE* (tabela 4).

Tabela 4: Análise combinada dos resultados de sorotipagem, susceptibilidade antimicrobiana, pesquisa dos genes de virulência e tipagem por REP-PCR de várias amostras de *Salmonella* spp. (n=18) isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil, entre 2005 e 2016

Sorotipo	REP-PCR	Resistência Antimicrobiana	Genes de Virulência	Padrão combinado
<i>S. Heidelberg</i>	A	SUT NIT CLO EST AMP	<i>sefA lfpA sipB sopE spvC</i>	A1
<i>S. Infantis</i>		----	<i>sefA sipB sopE</i>	A2
<i>S. Corvallis</i>	B	CIP NAL NIT	<i>sefA lfpA sipB sopE spvC</i>	B1
<i>S. Corvallis</i>		CIP NAL NIT ATM CPM AZI	<i>sefA lfpA sipB sopE spvC</i>	B2
<i>S. Corvallis</i>		CIP NAL NIT	<i>sefA lfpA sipB spvC</i>	B3
<i>S. Heidelberg</i>	C	----	<i>sefA sipB sopE spvC</i>	C1
<i>S. Santipaul</i>		NIT	<i>sefA sipB sopE spvC</i>	C2
<i>S. Heidelberg</i>		NIT	----	C3
<i>S. Panama</i>		NAL NIT	----	C4
<i>S. Agona</i>		NAL NIT	<i>spvC</i>	C5
<i>S. Braenderup</i>		NIT	<i>sefA sipB</i>	C6
<i>S. Rissen</i>		NIT ATM CPM	<i>sefA sipB sopE spvC</i>	C7
<i>S. Abnoy</i>		NAL TET	----	C8
<i>S. Schwarzengrund</i>		NAL TET NIT ATM CPM AZI	----	C9
<i>S. Heidelberg e</i>		CIP NAL NIT	----	C10
<i>Salmonella</i> spp.		CIP NAL NIT	----	C11
<i>S. Derby</i>		CIP NAL NIT	----	C12
<i>Salmonella</i> spp.		CIP	<i>sefA sipB sopE spvC</i>	C13

Índice Diversidade de Simpson combinado: 1,0

Breakpoint de similaridade REP-PCR: 80%

AMP – Ampicilina, ATM – Aztreonam, AZI – Azitromicina, CLO – Cloranfenicol, CPM – Cefepime, EST – Estreptomicina, NAL – Ácido Nalidixílico, NIT – Nitrofurantoína, SUT – Sulfametoxazol-Trimetropim, TET – Tetraciclina.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos a biodiversidade genética de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados nos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ocorridos em Minas Gerais/Brasil, entre os anos de 2003 a 2017. A escassez de dados oficiais a respeito do polimorfismo genético desta espécie no Estado motivou a realização desta pesquisa. Por meio dela foi possível estabelecer inferências sobre a possível origem, disseminação e ocorrência clonal dos principais genótipos *intra* e *inter* sorotipos de *Salmonella* spp. circulantes em Minas Gerais. O amplo emprego da rep-PCR, sua natureza reprodutível, alto poder discriminatório,

simplicidade, agilidade e baixo custo de execução (Cox *et al.*, 2015; Fardsanei *et al.*, 2016; Tejada *et al.* 2016) são parâmetros de desempenho que validaram nossa escolha como método inicial para genotipagem.

Neste experimento, a reprodutibilidade de rep-PCR (bandas polimórficas) foi comprovada por meio da observação de padrões eletroforéticos estáveis, gerados a partir de ensaios duplicados submetidos às condições idênticas de amplificação e eletroforese em gel de agarose. Vários autores discutiram sobre a precisão na reprodutibilidade de sequências rep-PCR em estudos de genotipagem de *Salmonella* spp. Weigel *et al.* (2004), por exemplo, após utilizarem os iniciadores ERIC, REP e BOX para tipagem bacteriana de *Salmonella* spp., empregaram os coeficientes de regressão múltipla e de Dirce para analisar variações no número e tamanhos dos fragmentos e observaram que todos os iniciadores apresentavam alta reprodutibilidade do número de fragmentos (confiabilidade > 0,90) e de tamanhos (confiabilidade > 0,85).

Discrepâncias na reprodutibilidade não são incomuns e podem estar associadas às diferenças entre os protocolos de amplificação, à resolução dos sistemas de eletroforese em gel de agarose e aos variados reagentes empregados na pesquisa (Sabat *et al.*, 2013; Hashemi, Baghbani-arani 2015). Autores como Winokur (2003) e Wise *et al.* (2009) apontam essa variabilidade *inter* laboratorial de rep-PCR como fator limitante da técnica. Foley *et al.* (2006), durante a tipagem de 128 amostras de *S. Typhimurium* por rep-PCR, identificaram boa habilidade discriminatória da técnica. Entretanto, estes autores reportaram dificuldades de reprodutibilidade, o que comprometeu o estabelecimento de inferências relacionais nas amostras bacterianas. Segundo Winoku (2003); Rasschaert *et al.* (2005); Cox *et al.* (2015) e Hashemi, Baghbani-arani (2015), deficiências deste parâmetro podem ser sanadas com o uso de temperaturas mais elevadas durante o ciclo de anelamento na PCR e por meio de comparações intra-corrída de eletroforese.

Além da reprodutibilidade, rep-PCR apresentou excelente tipabilidade (100%), inclusive entre amostras não sorotipáveis. Essa característica parece estar fortemente associada a análises que empregam o polimorfismo de elementos repetitivos, já que estes compreendem cerca de 500 a 1.000 sequências no genoma de *Salmonella* spp. e representam, aproximadamente, 1% do genoma desta espécie (Hiett e Seal, 2009). Segundo Borah (2018), as técnicas de tipagem devem possuir excelente tipabilidade para serem capazes de analisar todas as amostras de microrganismos, pois patógenos humanos de uma única espécie podem conter diversas variantes genéticas. A observação de impressões digitais exclusivas em amostras de *Salmonella* ssp. não tipificáveis por sorologia ou apenas parcialmente sorotipadas, utilizando sequências

repetitivas rep-PCR, também foi reportada nos estudos de Rasschaert *et al.* (2005); Hashemi, Baghbani-arani (2015); Gogoi *et al.* (2018); Prasertsse *et al.* (2019); Poonchareon *et al.* (2019).

O potencial discriminatório de rep-PCR para caracterizar amostras de *Salmonella* spp. foi comprovado pelos valores do Índice de Diversidade de Simpson (ID) identificados nos agrupamentos “*S. Enteritidis*” (ID 0,80), “*S. Typhimurium*” (ID 0,74) e “diversos sorotipos” (ID 0,89), nos quais 14 padrões eletroforéticos estáveis e exclusivos foram observados em *S. Enteritidis*, seguidos de seis em *S. Typhimurium* e 11 no grupo formado por diversos sorotipos (Tabela 1). O índice discriminatório é um parâmetro singular para validação do método rep-PCR. Neste estudo, empregamos o coeficiente de Simpson, definido como Índice de Dominância (ID), o qual reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Os valores variam de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior a diversidade (Hunter, Gaston 1988). Segundo Sabat *et al.* (2013), processos de investigação epidemiológica devem ser complementados por métodos de tipagem que possuam poder discriminatório suficiente para distinguir todas as amostras bacterianas epidemiologicamente relacionadas ou não, contribuindo assim para identificar clones e rastrear sua origem e disseminação.

Em congruência com nossos resultados, vários estudos têm demonstrado o alto potencial de rep-PCR discriminar amostras de microrganismos *intra* e *inter* espécies. Hashemi, Babhbani-arani (2015), por exemplo, reportaram elevado poder discriminatório das famílias BOX, ERIC-PCR e REP-PCR ao genotiparem 74 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de fonte humana. Neste trabalho, REP-PCR apresentou maior habilidade discriminatória (ID>0,99), ao identificar 55 perfis genéticos. Em outro trabalho, utilizando as três famílias anteriores de rep-PCR e o politrinucleotídeo GTG5, também foi evidenciado alto potencial discriminatório na diferenciação genética de 28 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de coprocultura humana e alimentos. Neste, por sua vez, BOX-PCR revelou melhor desempenho (ID>0,99) para diferenciação genética, corroborando seu potencial para ser utilizado em estudos de rastreamento e investigações de surtos por *Salmonella* spp. (Poonchareon *et al.*, 2019). Outras pesquisas também corroboraram o potencial discriminatório de rep-PCR em estudos epidemiológicos de *Salmonella* spp. (Lim *et al.* 2005; Ben-Darif *et al.* 2010; Hyeon *et al.* 2011; Campioni *et al.* 2012; Hyeon *et al.*, 2013; Almeida *et al.* 2013; Almeida *et al.* 2015; Anjay *et al.* 2015; Gogoi *et al.* 2018, Zomorodi *et al.* 2018; Lozano-Villegas *et al.* 2019; Poonchareon *et al.* 2019; Herrera-Sanchez *et al.* 2020).

Exceções a este trabalho e à maioria daqueles reportados na literatura, quanto a habilidade de rep-PCR discriminar amostras de *Salmonella* spp., foram observadas no trabalho de Oliveira *et al.* (2007) que não identificaram heterogeneidade genética entre 111 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de fontes humana, animal e alimentar no Brasil, genotipadas por BOX, ERIC-PCR e REP-PCR, cujos ID foram 0,04 para os dois primeiros e 0,05, para último. Os autores atribuíram o fato à possível existência de uma linhagem clonal, pois todas as amostras pertenciam aos fagotipos *PT4* e *PT4a*, considerados altamente clonais, ou à característica pouco discriminatório das técnicas rep-PCR.

A ausência de polimorfismo genético também foi observada em 66 amostras de *S. Typhimurium*, isoladas de abatedouros suínos e submetidos à tipagem por ERIC-PCR e REP-PCR (Bessa *et al.*, 2007). No estudo em questão, a heterogeneidade genética somente foi comprovada pela análise de macrorestrição (PFGE), reconhecida como “padrão ouro” para tipagem de *Salmonella* spp. Gebreyes *et al.* (2006); Suh, Song (2006) e Tiong *et al.* (2010) também apontaram limitado poder discriminatório das técnicas rep-PCR para diferenciar amostras de *Salmonella* spp. intimamente relacionadas. Segundo Weigel *et al.* (2004) e Cox *et al.* (2015), esta baixa capacidade discriminativa de rep-PCR em alguns estudos pode ser explicada, em parte, pelo uso de um único iniciador, pois outros trabalhos identificaram um alto índice discriminatório com o uso de mais de um oligonucleotídeo.

Os diversos padrões eletroforéticos de *Salmonella* spp., identificados nesta pesquisa, caracterizaram-se, em média, por 8 a 9 *amplicons*, dependendo do sorotipo, cujos tamanhos variaram de 200 a 3.000 pb. Acreditamos que estes perfis estejam associados não somente à especificidade genética deste grupo amostral, mas também ao protocolo de PCR utilizado na genotipagem, principalmente, quanto a variações no ciclo de anelamento (temperatura/tempo). Rasschaert *et al.* (2005), por exemplo, ao empregarem condições de anelamento superior a 70°C para tipagem de 80 sorotipos de *Salmonella* spp. não observaram nenhuma amplificação de sequências repetitivas com ERIC-PCR e apenas cinco com bandas, todas menores que 500 pb, com o *primer* BOX. Quando a temperatura foi ajustada para 57°C e 65°C, foram geradas de 13 e 12 bandas, respectivamente.

Albufera *et al.* (2009), por sua vez, ao empregarem condições de anelamento de 40°C para o conjunto de *primers* ERIC-PCR e 52°C para REP-PCR e BOX durante a análise de 18 amostras de *Salmonella* spp., observaram polimorfismo médio de 25 bandas para ERIC-PCR, 33 para REP-PCR e 27 para BOX. No experimento de Chmielewski *et al.* (2002), a tipagem de 31

amostras de *S. Enteritidis* por REP-PCR e ERIC-PCR, utilizando condições de anelamento a 50°C, resultaram em perfis eletroforéticos com um máximo de 8 e 14 *amplicons*, respectivamente. Em estudo similar, Suh e Song (2006) avaliaram a diversidade genética de 22 amostras de *S. Enteritidis* a partir dos iniciadores ERIC-PCR e BOX, dispendo de temperaturas de anelamento de 52°C e 53°C, respectivamente, e observaram, em média, 10 e 15 bandas polimórficas. Hashemi, Babhiani-Arani (2015) também empregaram temperaturas de anelamento entre 49°C, 50°C e 52°C para os oligonucleotídeos BOX, ERIC-PCR e REP-PCR durante a tipagem de 74 amostras de *Salmonella* spp. de fonte humana. Com todos eles, foi obtido excelente poder discriminatório, por meio de perfis genéticos compartilhando, em média, 13, 17 e 21 bandas polimórficas, respectivamente. Segundo Versalovic *et al.* (1991) e Rasschaert *et al.* (2005), o número ótimo de bandas para rep-PCR é de 8 a 15.

Nossos resultados demonstraram que REP-PCR apresentou reprodutibilidade, tipabilidade e habilidade em discriminar amostras de um mesmo sorotipo. Nos diferentes sorotipos, embora REP-PCR tenha apresentado elevado índice de diversidade (ID 0,89) (Tabela 1), observou-se que a técnica não foi suficientemente discriminativa, pois alguns sorotipos diferentes partilharam o mesmo perfil eletroforético. De acordo com Lozano-Villegas *et al.* (2019), um maior poder discriminatório nem sempre corresponde a uma representação mais precisa da relação epidemiológica. Isso ocorre porque a eficácia de um método de tipagem não é determinada exclusivamente pela capacidade de discriminar as amostras não relacionadas, mas também pela capacidade de formar agrupamentos biológicos significativos (Herrera-Sanchez *et al.* 2020). Weigel *et al.* (2004) afirmam que a heterogeneidade de sorotipos em agrupamentos genéticos não deve, por si só, ser uma fonte de grande preocupação na validação dos métodos de genotipagem, pois os padrões não possuem associação com os genes que codificam os antígenos O e H, que formam a base da classificação sorológica.

Alguns autores afirmam que eventos genéticos aleatórios poderiam justificar limitações discriminatórias, o que poderia justificar parte dos nossos resultados. De acordo com Gogoi *et al.* (2018), mutações pontuais, inserções e deleções de DNA podem alterar os padrões moleculares comprometendo tipagem bacteriana. Tobes *et al.* (2006) também corroboraram esta hipótese, ao comprovarem que sequências rep-PCR são regiões alvo específico para inserção de elementos móveis (em especial *transposons*) nos genomas de *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* e *Sinorhizobium meliloti*.

Na literatura, a habilidade de rep-PCR discriminar amostras de diferentes sorotipos é controversa. De maneira geral, grande parte das publicações discorrem sobre essa possibilidade, inclusive sugerindo o emprego do método como triagem sorológica para envio de amostras aos Laboratórios de Referência ou sua utilização para prever amostras não tipáveis sorologicamente, com base na relação molecular de sorotipos conhecidos (Rasschaert *et al.*, 2005). No trabalho de Johnson *et al.* (2001), a tipagem de 70 amostras de *Salmonella* spp. (14 sorotipos) por rep-PCR (ERIC-PCR e BOX1AR) permitiu a identificação de erros históricos de sorotipagem e forneceu atribuições presumíveis de sorogrupos para outras amostras com fórmula antigênica incompleta ou indeterminada. Essa habilidade de discriminar sorotipos por rep-PCR também foi demonstrada nos trabalhos de Rasschaert *et al.* (2005); Alcoocer *et al.* (2006); Chenu *et al.* (2011); Gogoi *et al.* (2018); Prasertsse *et al.* (2019) e Poonchareon *et al.* (2019).

Nossos resultados estão em consonância com outros trabalhos, nos quais rep-PCR não foi suficientemente discriminativa para predizer a tipagem sorológica. Zomorodi *et al.* (2020), por exemplo, empregando idêntico conjunto de *primers* e condições da PCR (temperatura de anelamento), investigaram a diversidade genética de 74 amostras *Salmonella* spp., (11 sorotipos) e concluíram que sorotipos distintos nem sempre apresentaram diferenças de polimorfismo genético, haja vista a evidência de perfis indistinguíveis entre amostras de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Tsevie* e *S. Senftenberg*. Conclusão idêntica também foi observada por Kerketta *et al.* (2016), durante a tipagem de 19 sorotipos de *Salmonella* spp. ao utilizarem os iniciadores para ERIC-PCR e GTG5 e Lim *et al.* (2005), ao genotiparem 57 sorotipos de *Salmonella* spp. com ERIC-PCR.

Insuficiência na predição sorológica de *Salmonella* spp. a partir de rep-PCR não está reservada a pesquisas, cujo ensaios são realizados manualmente. Alguns estudos que utilizam rep-PCR automatizada (sistema Diversilab) também não foram capazes de discriminar todos os sorotipos confrontados cegamente. Wise *et al.* (2009) ao avaliarem 44 amostras de *Salmonella* (previamente identificadas por sorologia) e compararem seus perfis eletroforéticos com os dados da biblioteca genômica disponível no *software* do equipamento, identificaram somente 28 (63,3%) correspondências entre os perfis sorológicos e os moleculares. Alguns padrões foram compatíveis com dois dos sorotipos presentes na biblioteca e outros não apresentaram correspondência com nenhum daqueles (similaridade menor que 95%), sugerindo que uma biblioteca expandida seria necessária para maior utilidade e eventual substituição da sorotipagem convencional.

Em pesquisa similar, Ben-Darif *et al.* (2010), ao confrontarem o polimorfismo genético de 71 amostras de *Salmonella* spp. (21 sorotipos) procedentes de salmonelose humana, com 333 perfis genéticos de mais de 100 sorotipos, obtidos por meio de rep-PCR e mantidos em uma biblioteca genômica *on-line*, observaram uma associação sorológica precisa em apenas 45 amostras (63% dos casos). Segundo os autores, os perfis de rep-PCR depositados nestes bancos nem sempre são suficientes para predizer os sorotipos. Uma solução seria a utilização pelo sistema de análises de eletroforogramas que poderiam auxiliar na caracterização das amostras bacterianas.

A limitação dos métodos de tipagem molecular para diferenciar sorotipos de *Salmonella* spp. não é uma particularidade do método rep-PCR. Silva (2012), após genotipar por PFGE, “padrão ouro”, 87 amostras de *Salmonella* spp. procedentes de vários Estados brasileiros, observou que os sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Schwarzengrund* compartilhavam o mesmo perfil eletroforético ou eram intimamente relacionados a outros sorotipos de *S. Typhimurium*. De acordo com os autores, isto é possível pois mudanças de um ou mais nucleotídeos podem alterar os sinais de transcrição genética ou a leitura dos genes que codificam os antígenos utilizados para discriminação de sorotipos.

Os métodos de tipagem molecular são utilizados com frequência para diferenciar amostras epidêmicas das não epidêmicas, pertencentes à mesma linhagem, linhagens relacionadas, possivelmente relacionadas ou diferentes (Tavechio, 2006; Kottwitz, 2009). Esta diferenciação ocorre com base nos diferentes padrões de bandas polimórficas, originados a partir de diferentes eventos genéticos (Gogoi *et al.*, 2018). A identificação de populações clonais, rastreabilidade da origem, disseminação, incidência e prevalência no espaço temporal são informações importantes para conhecer os reservatórios naturais dos clones e identificar as fontes de contaminação nos surtos e casos esporádicos, bem como aprofundar as medidas de controle (Kottwitz, 2009; Lozano-Villegas *et al.* 2019).

Neste trabalho, rep-PCR permitiu compreender as interações filogenéticas das amostras de *Salmonella* spp. circulantes no Estado de Minas Gerais ao longo de mais de uma década (2003 a 2017). Ao avaliarmos o polimorfismo genético das amostras isoladas de diferentes alimentos, períodos e regiões do Estado, nos deparamos com uma população de *Salmonella* spp. composta por um genoma relativamente variável (14 padrões eletroforéticos exclusivos de *S. Enteritidis*, seguido de seis de *S. Typhimurium* e 11 dos demais sorotipos), porém, com muitas bactérias,

principalmente, *intra* sorotipos (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*), compartilhando elevada similaridade genética.

A presença de genomas com alta variabilidade genética *inter clusters* (menor que 80% de similaridade), a exemplo dos sorotipos de *S. Enteritidis* nº 23 e 39 (Figura B) e *S. Typhimurium* nº 47 e 67 (Figura C), sugere a inexistência de uma relação clonal, indicando que a disseminação destas amostras foi predominantemente horizontal entre as diferentes fontes de contaminação. Por outro lado, grupos de alta similaridade genética ou considerados indistinguíveis como o observado no agrupamento de *S. Enteritidis*, *subcluster C5* (Figura B), corroboram a existência de uma estrutura genética populacional comum ou, ainda, a evidência de elevado grau de clonabilidade.

Previamente a estes resultados, esperávamos que as amostras de um mesmo sorotipo apresentassem expressiva biodiversidade dada às suas características temporal, geográfica e de matrizes (alimentos). Entretanto, o que observamos foi uma estreita relação genética e ampla ocorrência de amostras clonais. No agrupamento de *S. Enteritidis*, por exemplo, os *clusters C* e *D* alocaram amostras com mais de 80% de similaridade e os *subclusters C1, C2, C4, C5* e *D1* bactérias indistinguíveis (100% de similaridade) (Figura B). A observação de 17 perfis idênticos (*C5*) em *S. Enteritidis* identificadas em 16 surtos de DTA ocorridos entre 2003 e 2017, corrobora não apenas a hipótese de disseminação clonal deste sorotipo ao longo dos anos, mas também posiciona, em tese, a mesorregiões Central e Sul de Minas como pontos de partida deste perfil, visto que os primeiros clones deste padrão (*S. Enteritidis* nº 02 e *S. Enteritidis* nº 05) foram detectados primeiramente nesta região em 2004 e, posteriormente nas regiões de Campo das Vertentes, Alto Paranaíba, Oeste, Norte e Metropolitana.

A presença de clones de *S. Enteritidis* ao longo dos anos em várias regiões geográficas de Minas Gerais está em harmonia com outros trabalhos que reportam prevalência regional de amostras deste sorotipo com alta homogeneidade genética, particularmente, naquelas do mesmo fagotipo. Porwollik *et al.* (2005), por exemplo, ao investigarem por meio de sequenciamento, alterações no conteúdo gênico de 27 amostras de *S. Enteritidis*, isoladas entre 1948 a 1994 de vários países e fontes humana e não humana, concluíram que quase todos os genomas eram muito semelhantes entre si. Somente duas amostras divergiram significativamente das demais. Segundo esses autores, as amostras mais recentes não apresentaram diferenças consistentes em relação a aquelas de 60 anos atrás, sugerindo a inexistência de grandes adições genômicas (genes inteiros) para que *S. Enteritidis* se tornasse o sorotipo mais prevalente em muitos países.

No Brasil, estudo mais recente conduzido por Campioni *et al.* (2018) utilizaram resultados do sequenciamento genômico de 256 cepas de *S. Enteritidis* isoladas durante um período de 48 anos (período pré e pós-epidêmico) para avaliarem a biodiversidade. Segundo os autores, a maioria das amostras isoladas entre 1980 e 1993 se agrupavam entre si e divergiam daquelas identificadas após 1994. Os resultados sugeriram também a existência de uma linhagem pós-epidêmica, possivelmente introduzida no país por meio da importação de aves na década de 1990, pois somente essa linhagem detinha a região fágica SE20, um marcador presente em amostras de *S. Enteritidis* dispersas mundialmente. Os trabalhos de Morales *et al.* (2005); Oliveira *et al.* (2007); Olson *et al.* (2007); Shah *et al.* (2011) e Hormansdorfer *et al.* (2017) também afirmam que *S. Enteritidis*, muitas vezes, se caracteriza por grupos fortemente clonais e com baixa heterogeneidade genética, os quais somente são discriminados a partir de vários métodos de tipagem molecular.

Similaridade superior a 80% também foi observada nos *clusters* A e B de *S. Typhimurium* (Figura C). Segundo Gebreyes *et al.* (2006), o sorotipo *S. Typhimurium* também tem sido apontado como altamente clonal e disseminado, conforme comprovado em seu estudo após caracterizarem 196 amostras procedentes de 18 granjas suínas, coletadas durante três anos nos dois principais sistemas comerciais de produção nos EUA. Neste trabalho, foram observados 16 grupos clonais compartilhando, pelo menos, 70% de similaridade, sendo 14 deles exclusivos de um dos dois sistemas de produção. Na África subsaariana, a grande maioria das infecções disseminadas por *S. Typhimurium* entre 1995 e 2010 resultou de duas linhagens (I e II) cuja expansão clonal iniciou por volta de 1985. É possível que ambas as linhagens tenham emergido de um ancestral comum a partir da seleção de linhagens resistentes a antimicrobianos utilizados em tratamentos de salmonelose (Branchu *et al.*, 2018). Em nosso estudo, diferentemente do sorotipo *S. Enteritidis*, no qual 40 amostras foram genotipadas, apenas 12 de *S. Typhimurium* estavam disponíveis para tipagem. Assim, associações geográficas e temporal da disseminação clonal de um perfil único nas amostras de *S. Typhimurium* não seriam prudentes devido à baixa abrangência de bactérias analisadas neste grupo sorológico.

Em avaliações nas quais apenas um método não é suficiente para discriminar todas as amostras devido ao alto grau de similaridade genética entre os indivíduos, uma alternativa é conciliar a análise com resultados de outros métodos genotípicos e/ou fenotípicos. Segundo Bessa *et al.* (2007), a conjugação de métodos assegura uma melhor caracterização microbiana e permite o rastreamento epidemiológico baseado na associação de informações genéticas e fenotípicas independentes. Campioni *et al.* (2012), Sabat *et al.* (2013) e Almeida (2016) afirmam, por

exemplo, que a biotipagem, sorotipagem, tipagem fágica e os perfis de resistência antimicrobiana são propriedades fenotípicas clássicas amplamente utilizadas em todo o mundo e se associados à métodos moleculares, permitem aumentar significativamente a distinção entre os indivíduos populacionais.

Neste estudo, a análise combinada dos métodos fenotípicos, susceptibilidade antimicrobiana (Capítulo II) e dos métodos genotípicos, pesquisa dos genes de virulência e do gene *PT4* (Capítulo III) com a tipagem por REP-PCR aumentou a discriminação das amostras de *S. Enteritidis*, resultando em 29 padrões combinados e um ID combinado de 0,95 (Tabela 2). O padrão C5 (Figura B), composto por 17 amostras com idêntico polimorfismo de bandas, foi subdividido em oito perfis únicos após análise conjunta dos dados. No sorotipo *S. Typhimurium*, 11 perfis foram gerados pela análise conjunta dos dados, resultando em um ID combinado de 0,94. Para os demais sorotipos, o índice de discriminação foi máximo, pois todas as amostras foram devidamente segregadas.

É possível que a conjugação dos nossos resultados com outros oligonucleotídeos da família rep-PCR ou outra técnica molecular (Ribotipagem, PFGE, MLST e, em especial, sequenciamento do genoma total) resultasse em um nível mais discriminatório na população de *Salmonella* spp. analisada. No experimento de Hashemi, Baghbani-Arani (2015), por exemplo, a simples combinação dos iniciadores BOXAIR com ERIC-PCR ou com REP-PCR, foi suficiente para diferenciar as 74 amostras de *Salmonella* spp. de diversas origens, isoladas no Iran, entre 2012 e 2013. Esse fato é relevante quando se deseja conhecer a origem precisa e o histórico de um isolado. Contudo, é preciso considerar que a eficácia da discriminação não deve ser determinada exclusivamente pela capacidade de diferenciar cepas não relacionadas, mas também pela habilidade de formar agrupamentos biologicamente e epidemiologicamente significativos (Lozano-Villegas *et al.* 2019, Herrera-Sanchez, 2020).

Enfatizamos que, relevante seria complementar os dados genéticos e fenotípicos extraídos destes experimentos, com outras abordagens epidemiológicas, clínicas e demográficas relacionadas à ocorrência de salmonelose humana no Estado de Minas Gerais. Isso corroboraria para maior compreensão desta zoonose no Estado e, possivelmente, para a elaboração e implantação de ações de prevenção e controle mais assertivas. Neste sentido, estimulamos que estudos similares, acrescidos destes outros dados, sejam realizados e que um monitoramento contínuo das principais características fenotípicas, genéticas e epidemiológicas dos principais

patógenos isolados de alimentos que circulam em Minas Gerais, especialmente *Salmonella* spp., seja fomentado pelos setores de Vigilância em Saúde do Estado e Municípios.

5. CONCLUSÃO

O método rep-PCR, utilizado para caracterização genotípica de *Salmonella* spp., apresentou potencial diagnóstico comprovado pela sua reprodutibilidade, tipabilidade e poder discriminatório. Em se tratando de polimorfismo genético, observou-se que as amostras de *Salmonella* spp. isoladas em Minas Gerais ao longo de mais de uma década possuem um genoma relativamente variável; porém, com muitos sorotipos compartilhando elevada similaridade genética e, em alguns casos, impressões digitais indistinguíveis. Por meio desses resultados, foi possível observar a circulação de um único indivíduo entre várias regiões do Estado e distintos períodos, corroborando a hipótese de circulação clonal de alguns sorotipos, principalmente, de *S. Enteritidis*.

Maior habilidade de discriminar agrupamentos biologicamente e epidemiologicamente relacionados foi alcançada com a associação dos métodos fenotípicos e genotípicos. Adicionalmente, ressaltamos que, para evitar dados de deformação, é aconselhado que os resultados desta pesquisa não sejam considerados independentes, mas interpretados no contexto de todos os dados epidemiológicos, clínicos e demográficos disponíveis em outras fontes sobre a doença infecciosa em investigação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Ezequiel Dias (Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Biologia Molecular) pela cessão do material biológico e estrutura laboratorial para realização dos ensaios biológicos.

REFERÊNCIAS

- ALBUFERA, U.; VIAL-BHUGALOO, P.; ISSACK, M.I.; FAKIM, J.Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.322–327, 2009.
- ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K.M.P.; VIDOTTO, M.C.; OLIVEIRA, T.C.M. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. amostras de carcaças de frango por rep e eric-PCR e fagotipagem do serovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.411-420, 2006.
- ALMEIDA, F. **Caracterização molecular de linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos, alimentos, animais e ambientes no Brasil**. Tese [Doutorado Biociências Aplicadas à Farmácia] Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. 116p.

ALMEIDA, F.; MEDEIROS, M.I.C.; RODRIGUES, D.P.; FALCÃO, J.P. Genotypic diversity, pathogenic potential and the resistance profile of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983 to 2013 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p.1395–1407, 2015.

ALMEIDA, F.; SILVA, A.P.; 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**, v. 19, p.145 -151, 2013.

ALVES, A. HENRIQUES, I.; TACÃO, M.; CORREIA. **Tipagem genética em microrganismos**. Universidade de Aveiro, Aveiro, 2003.

ANJAY, A.K.; AGARWAL, R.K.; RAMEES, T.P.; DUBAL, Z.B.; KAUSHIK, P.; KUMAR, M.S.; DUDHE, N.C.; MILTON, A.A.P.; ABHISHEK, B.; KUMAR, B.; SHAGUFTA, B. Molecular typing of *Salmonella* Typhimurium and *S. Enteritidis* serovars from diverse origin by ERIC-PCR. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v.9, n.3, p. 2627-2634, 2015.

APHA – American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. In: ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. Capítulo 37, 7^a ed, 2001, 676p.

BEN-DARIF, E.; DE PINNA, E.; THRELFALL, E.J.; BOLTON, F.J.; UPTON, M.; FOR, A.J. Comparison of a semi-automated rep-PCR system and multilocus sequence typing for differentiation of *Salmonella* enterica isolates. **Journal of Microbiological Methods**. v.81, p.11–16, 2010.

BESSA, M.C.; MICHAEL, G.B.; CANU, N.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M.; RABSCH, W.; RUBINO, S. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.83, p.302–310, 2007.

BORAH, P. **Molecular typing of bacterial pathogens with special reference to *Salmonella***. 2018. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/332523417_Molecular_typing_of_bacterial_pathogens_with_special_reference_to_Salmonella Acesso em: julho/2020

BRANCHU, P.; BAWN, M.; KINGSLEY, R.A. Genome Variation and Molecular Epidemiology of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Pathovariants. **Infection and Immunity**, v.86, n.8, p.1-17, 2018.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A.M.M.; FALCAO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v.32, p.254-264, 2012.

CAMPIONI, F.; CAO, G.; KASTANIS, G.; JANIES, D.A.; BERGAMINI, A.M.M.; RODRIGUES, D.P.; STONES, R.; BROWN, E. ALLARD, M.W.. Changing of the Genomic Pattern of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in Brazil over a 48 year-period revealed by Whole Genome SNP Analyses. **Scientific Reports**, v.8, p.1-7, 2018.

CARNEIRO, M.R.P. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* Panama isoladas de fontes humana e não humana na região nordeste do Brasil**. Tese [Doutorado em Ciências Biológicas- Microbiologia] - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009. 75p.

CARVALHO, F.C.T.; RODRIGUEZ, M.T.T., MENEZES, F.G.R.; SOUSA, O.V.; HOFER, E.; VIEIRA, R.H.S.F. (2017). Ecotypes and virulence factors of *Salmonella* spp. detected in shrimp farms in State of Ceara, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.39, n.4, p.469-474, 2017.

CHENU, J.W.; COX, J.M.; PAVIC, A. Classification of *Salmonella* enterica serotypes from Australian poultry using repetitive sequence-based PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, p.185–196, 2011.

CHMIELEWSKI, R.; WIELICZKO, A.; KUCZKOWSKI, M.; MAZURKIEWICZ, M.; GROSKI, M.U. Comparison of ITS Profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella* Enteritidis Isolates from Poland. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 49, n.4, p.163-180, 2002.

COX, N.A, FRYE, J.G., MCMAHON, W., JACKSON, R.C., RICHARDSON, J., COSBY, D.E., MEAD, G., DOYLE, M.P. *Salmonella*. In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M.L. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 15^a ed. Washington: APHA Press, 2015, p.445-475.

ENG, S.K.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N.S.A.; SER, H.L.; CHAN, K.G.; LEE, L.H. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v.8, n.3, p.284-293, 2015.

FARDSANEI, F. NIKKHAHI, F., BAKHSHI, B., ZAHRAI SALEIHI, T., ASRAFI TAMAI, I., SOLTAN DALLAL, M.M. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food in human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG)5-PCR and ERIC-PCR. **New Microbes and New Infections**, v.14, p.24-30, 2016.

FERRARI, R.G.; ROSARIO, D.K.A.; CUNHA-NETO, A.; FIGUEIREDO E.E.S.; CONTE-JUNIOR, C.A. Worldwide Epidemiology of Salmonella Serovars in AnimalBased Foods: a Meta-analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.85, n.14, p.1-21, 2019.

FOLEY, S.L.; WHITE, D.G.; McDERMOTT, P.F.; WALKER, R.D.; RHODES, B.; FEDORKA-CRAY, P.J.; SIMJEE, S.; ZHAO, S. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.10, p.3569–3577, 2006.

FLAWS, M.; BUCKINGHAM, L. **Detection and Identification of Microorganisms**. In: BUCKINGHAM, L.; FLAWS, M. Molecular diagnostics: fundamentals, methods, and clinical applications. 1^a ed. FA Davis Co, 2007. 462p.

GEBREYES, W.A.; ALTIER, C.; THAKUR, S. Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches. **Epidemiology Infection**, v.134, p.187–198, 2006.

GOGOI, P.; BORAH, P.; HUSSAIN, I.; DAS, L.; HAZARIKA, G.; TAMULY, S.; BARKALITAA, L.M. Efficacy of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Repetitive Element Sequence-Based PCR in Typing of *Salmonella* Isolates from Assam, India. May **Journal of Clinical Microbiology**, v.56, n.5, p.1-6, 2018.

HASHEMI, A.; BAGHBANI-ARANI, F. The effective differentiation of *Salmonella* isolates using four PCR-based typing methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, p. 1530-1540, 2015.

- HERRERA-SANCHEZ, M.P. HERNANDEZ-RODRIGUES, R.; RONDON-BARRAGAN, I.S. Molecular characterization of antimicrobial resistance and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR as a molecular typing tool for *Salmonella* spp. isolated from poultry and humans. **Veterinary World**, v.13, n.9, p.1771-1779, 2020.
- HIETT, K.; SEAL, B. Use of Repetitive Element Palindromic PCR (rep-PCR) for the Epidemiologic Discrimination of Foodborne Pathogens. **Methods in Molecular Biology**, v. 555, p.49-58, 2009.
- HUNTER, P.; GASTON, M. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: An Application of Simpson's Index of Diversity. **Journal of Clinical Microbiology**. v.26, n.11, p.2465-2466, 1988.
- HYEON, J.Y.; CHON, J.W.; GYUN HWANG, I.; KWAK, H.S.; KIM, M.S.; KIM, S.K.; CHOI, I.S.; SONG, G.S.; PARK, C.; SEO, K.H. Prevalence, Antibiotic Resistance, and Molecular Characterization of *Salmonella* Serovars in Retail Meat Products. **Journal of Food Protection**, v.74, n.1., p. 161–166, 2011.
- HYEON, J.H.; CHON, J.W.; PARK, J.H.; KIM, M.S.; OH, Y.H.; CHOI, I.S.; SEO, K.H. A Comparison of Subtyping Methods for Differentiating *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates Obtained from Food and Human Sources. **Osong Public Health Res Perspect**. v.4, n.1, p.27–33, 2013.
- HORMANSDORFER, S.; MESSELHAUBER, U.; RAMPP, A.; SCHONBERGER, K.; DALLMAN, T.; ALLERBERGER, F.; KORNSCHOBBER, C.; SING, A.; WALLNER, P.; ZAPF, A. Re-evaluation of a 2014 multi-country European outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 14b using recent epidemiological and molecular data. **Eurosurveillance**, v. 22, n.50, p.17-24, 2017.
- JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C.; AZAR, M.; BOXRUD, D.J.; BESSER, J.M; THURN, J.R. Molecular analysis of a hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak usin modified repetitive element PCR fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3452-3460, 2001.
- KERKETTA, P.; AGARWAL, R.K. SAILO, B.; KUMAR, P.P.; GOYAL, R. KATARIA, J.L.; KUMAR, A. Evaluation of ERIC and (GTG)₅ fingerprinting to differentiate various serotypes of *Salmonella* from diverse sources. **Indian Journal of Animal Research**, v.51, p.1-7, 2016.
- KOTTWIZ, L.B.M. ***Salmonella* spp.: avaliação epidemiológica de surtos notificados no Paraná e caracterização de amostras epidêmicos e de origem avícola**. Tese [Doutorado em Ciências de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009. 124p.
- LIM, H.; LEE, K.H.; HONG, C.H.; BAHK, G.J. CHOI, W.S.C. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp.. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n.4, p.411 – 418, 2005.
- LOZANO-VILLEGAS, K.; HERNÁNDEZ, R.R.; BARRAGÁN, I.R. Effectiveness of six molecular typing methods as epidemiological tools for the study of *Salmonella* isolates in two Colombian regions. **Veterinary World**, v.12, n.12, p.1998-2006, 2019.
- MESQUITA, F.B. **Estimativa dos custos associados a surtos de salmonelose veiculada por produtos de origem animal para o Sistema Único de Saúde do Brasil**. Dissertação

[Mestrado em Ciência Animal] – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2016. 91p.

MORALES, C.A.; PORWOLLIK, S.; FRYE, J.G.; KINDE, H.; MCCLELLAND, M.; GUARD-BOULDIN, J. Correlation of phenotype with the genotype of egg-contaminating *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.4388–4399, 2005.

OLIVEIRA, S.D.; BESSA, M.C.; SANTOS, L.R.; CARDOSO, M.R.I.; BRANDELLI, A.; CANAL, C.W. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.720/728, 2007.

OLSON, A.B.; AMDRUSOALK, A.K.; TRACZ, D.M.; BOUDIN, J.G.; WALTER, D.; NG, L.K.; MAKI, A.; JAMIESON, F. e GILMOUR, W. Limited genetic diversity in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT13. **BMC Microbiology**, v.7, n.87, p.1-10, 2007.

POONCHAREON, K. PULSRIKARN, C.; NUANMUANG, N.; KHAMAI, P. Effectiveness of BOX-PCR in Differentiating Genetic Relatedness among *Salmonella enterica* Serotype 4,[5],12:i:- Isolates from Hospitalized Patients and Minced Pork Samples in Northern Thailand. **International Journal of Microbiology**, p.1-11, 2019.

PORWOLLIK, S.; SANTIVIAGO, C.A.; CHENG, P.; FLOREA, L.; JACKSON, S.; MCCLELLAND, M. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.6545–6555, 2005.

PRASERTSSE, T.; CHOKESAJJAWATEZZ, N.; SANTIYANONT, P.; CHUAMMITRI, P.; DEEUDOM, M.; TADEE, P.; PATCHANEE, P. Quantification and rep-PCR characterization of *Salmonella* spp. in retail meats and hospital patients in Northern Thailand. **Zoonosis Public Health**, p.1-9, 2019.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHS, H.; GRIJSPEEDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRIKX, M. Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR Typing Methods for Molecular Discrimination of *Salmonella enterica* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3615-3623, v.43, n.8, 2005.

RILEY, L.W. **Epidemiologia Molecular**. In: BRACHMAN, P.; ABRUTYN, E. Infecções bacterianas de seres humanos. Springer, Boston, MA. 2009. p. 69-89.

SABAT, A.J.; BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJLL, J.M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A.W. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Eurosurveillance**, v.18, n.4, p.1-14, 2013.

SHAH, D.H.; ZHOU, X.; ADDWEBI, T.; DAVIS, M.A.; ORFE, L.; CALL, D.R.; GUARD, J.; BESSER, T. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. **Microbiology**, v. 157, n.5, p.1428-1445, 2011.

SILVA, Q.M. **Epidemiologia molecular das salmonelas de sete Estados Brasileiros**. Dissertação [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2012. 97p.

SUH, D.K.; SONG, J.C. Analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolated from human and chickens by repetitive sequence-PCR fingerprinting, antibiotic resistance and plasmid profiles. **Journal Veterinary Science**, v.7, n.1, p.37-41, 2006.

TAVECHIO, A.T. **Comparação fenotípica e genotípica entre cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo 1,4,[5],12:i:- e de *Salmonella* Typhimurium**. Tese [Doutorado em Ciências] – Universidade de São Paulo. 2006.114p.

TEJADA, T.S.; SILVA, C.S.J.; LOPES, N.A.; SILVA, D.T.; AGOSTINETTO, A.; SILVA, E.F.; MENEZES, B.D.; TIMM, C.D. DNA Profiles of *Salmonella* spp.. isolated from Chicken Products and From Broiler and Human Feces. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.18, n.4, p.693-700, 2016.

TIONG, V.; THONG, K.L.; YUSOF, M.Y.M.; HANIFAH, Y.A.; SAM, J.I.C.; HASSAN, H. Macrorestriction Analysis and Antimicrobial Susceptibility Profiling of *Salmonella enterica* at a University Teaching Hospital, Kuala Lumpur. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.65, n.3, p.317-322, 2010.

TOBES, R.; PAREJA, E. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. **BMC Genomics**, v.7, n.62, p.1-12, 2006.

UGORSKI, M.; CHMIELEWSKI, R. REP and ERIC repetitive DNA sequences in bacteria--diagnostic significance. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, v. 54, n.1, p.3-15, 2000.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.24, p.6823 -6831, 1991.

ZOMORODI, A.F.; RADI, M.; HASHEMITABAR, G.H.R; SALIMIZAND.H. Molecular typing of cephalosporin resistant serovars of *Salmonella enterica* from poultry and farm animals. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v.23, n.2, p.178-186, 2020.

WEIGEL, R.M.; QIAO, B. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. **Veterinary Microbiology**, p. 205–217, 2004.

WINOKUR, P.L. Molecular epidemiological techniques for *Salmonella* strain discrimination. **Frontiers in Bioscience**, v.8, p.14-24, 2003.

WISE, M.G.; SIRAGUSA, R.G.; PLUMBLEE, J.; HEALY, M.; CRAY, P.J.; SEAL, B.S. Predicting *Salmonella enterica* serotypes by repetitive sequence-based PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.18–24, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em Minas Gerais, a salmonelose humana é uma das principais Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Desde a implantação do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica em Saúde, pelo Ministério da Saúde/Brasil, em 1999, o Estado de Minas Gerais se destaca nacionalmente nos processos de notificação e de investigação de surtos de DTA. Entretanto, a caracterização fenotípica e genotípica dos microrganismos identificados nestes eventos sempre foi uma lacuna nos dados oficiais de monitoramento dos surtos de DTA.

Por meio deste trabalho, buscamos dispor de diferentes metodologias tradicionais e moleculares que permitissem caracterizar fenotípica e genotipicamente amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em Minas Gerais/Brasil por mais de uma década (2003 a 2017). Nossos resultados demonstraram a prevalência de *S. Enteritidis* e de *S. Typhimurium* entre sorotipos de *Salmonella* spp.; os principais veículos de transmissão de *Salmonella* spp. nos surtos de DTA; a presença de amostras de *Salmonella* spp. fenotipicamente resistentes a pelo menos um antimicrobiano, em especial às quinolonas e ao nitrofurano; o potencial patogênico das amostras de *Salmonella* spp., devido a presença de alguns genes de virulência e a circulação clonal de amostras de *Salmonella* spp., por meio da genotipagem bacteriana (REP-PCR), no Estado de Minas Gerais.

Para experimentação futura, o emprego de outras metodologias tal como, sequenciamento do genoma bacteriano, poderá acrescentar informações mais discriminatórias, úteis para o conhecimento da biodiversidade genética de *Salmonella* spp.. Nossos resultados também poderiam ser robustecidos a partir de estudos similares com amostras de *Salmonella* spp., isoladas de material clínico (coprocultura) de pacientes humanos expostos aos surtos de salmonelose no Estado de Minas Gerais, em período semelhante. A caracterização fenotípica e genotípica de ambas as amostras de *Salmonella* spp., bromatológica e clínica, contribuiria de forma considerável, para uma completa descrição das amostras de *Salmonella* spp. que circulam em Minas Gerais e uma melhor compreensão epidemiológica da salmonelose humana neste território.

Caracterizar os microrganismos que despontam como principais causadores de DTA no Estado de Minas Gerais é parte de um trabalho essencial para Vigilância em Saúde para adoção de quaisquer medidas preventivas no futuro, bem como análise daquelas implantadas até o momento. Essa caracterização também pode contribuir para oportuna investigação de eventos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), a partir da identificação do agente microbiano

potencialmente causador do surto em amostras biológicas dos doentes, bem como fontes alimentares ou ambientais suspeitas, além de responder a perguntas, tais como: “Os casos estão relacionados?”, “Existe uma fonte comum de infecção?”, “Qual a possível origem do patógeno”?, “Há transmissão por contato pessoa-a-pessoa ou por animais?”, “Que medidas podem ser adotadas para limitar o número de casos?”.

Por fim, espera-se que este trabalho seja identificado como pesquisa precursora para um amplo monitoramento da salmonelose humana no Estado de Minas Gerais e, também, como referência para novos estudos em todo país.

ANEXO A – Resultados da identificação fenotípica e molecular das amostras de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos implicados em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Estado de Minas Gerais/Brasil, de 2003 a 2017

Nº	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA										IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR				
	Bioquímica tradicional – IAL Rugai					Bioquímica automatizada - VITEK II					Proteômica - MALDI-TOF		Ácido desoxirribonucleico		
	Identificação	I	L	S	H	Gs	GI	U	Li	M	Identificação	* % de confiança	Identificação	* score	Gene <i>InvA</i>
1	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,336	Positivo
2	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,447	Positivo
3	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,372	Positivo
4	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,365	Positivo
5	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,363	Positivo
6	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,470	Positivo
7	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,335	Positivo
8	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	97 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,150	Positivo
9	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,354	Positivo
10	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,198	Positivo
11	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,170	Positivo
12	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,378	Positivo
13	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,308	Positivo
14	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,321	Positivo
15	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,353	Positivo
16	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,070	Positivo
17	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,328	Positivo
18	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,240	Positivo
19	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,310	Positivo
20	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,351	Positivo

Nº	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA										IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR				
	Bioquímica tradicional – IAL Rugai										Bioquímica automatizada - VITEK II		Proteômica - MALDI-TOF		Ácido desoxirribonucleico
	Identificação	I	L	S	H	Gs	GI	U	Li	M	Identificação	* % de confiança	Identificação	* score	Gene <i>InvA</i>
21	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,417	Positivo
22	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,268	Positivo
23	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,407	Positivo
24	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,225	Positivo
25	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,341	Positivo
26	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,365	Positivo
27	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,275	Positivo
28	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,295	Positivo
29	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,406	Positivo
30	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,254	Positivo
31	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	97 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,410	Positivo
32	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,364	Positivo
33	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,465	Positivo
34	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,431	Positivo
35	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,420	Positivo
36	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,470	Positivo
37	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	96 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,462	Positivo
38	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,408	Positivo
39	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,515	Positivo
40	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	96 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,401	Positivo

N ^o	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA										IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR				
	Bioquímica tradicional – IAL Rugai					Bioquímica automatizada - VITEK II					Proteômica - MALDI-TOF		Ácido desoxirribonucleico		
	Identificação	I	L	S	H	Gs	GI	U	Li	M	Identificação	* % de confiança	Identificação	* score	Gene <i>InvA</i>
41	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,526	Positivo
42	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,426	Positivo
43	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,279	Positivo
44	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,385	Positivo
45	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	P	N	P	P	N	N	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,350	Positivo
46	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,416	Positivo
47	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,423	Positivo
48	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,507	Positivo
49	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	P	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,451	Positivo
50	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	97 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,431	Positivo
51	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,402	Positivo
52	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	P	P	P	P	N	N	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,401	Positivo
53	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,511	Positivo
54	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	P	P	P	P	N	N	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,279	Positivo
55	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,414	Positivo
56	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,429	Positivo
57	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,462	Positivo
58	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	P	P	P	P	N	N	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,401	Positivo
59	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,407	Positivo
60	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	P	P	P	P	N	N	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,444	Positivo

N ^o	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA										IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR				
	Bioquímica tradicional – IAL Rugai										Bioquímica automatizada - VITEK II		Proteômica - MALDI-TOF		Ácido desoxirribonucleico
	Identificação	I	L	S	H	Gs	Gl	U	Li	M	Identificação	* % de confiança	Identificação	* score	Gene <i>InvA</i>
61	<i>Salmonella</i> spp	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,255	Positivo
62	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,448	Positivo
63	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	95 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,470	Positivo
64	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,388	Positivo
65	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	98 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,399	Positivo
66	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,469	Positivo
67	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,414	Positivo
68	<i>Salmonella</i> spp	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,367	Positivo
69	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	91 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,502	Positivo
70	<i>Salmonella</i> spp.	N	N	N	P	P	P	N	P	P	<i>Salmonella</i> spp.	99 %	<i>Salmonella</i> spp.	2,315	Positivo

Legenda: N – Negativo; P – Positivo; I – indol; L – LTD; S – Sacarose; H – H₂S; Gs – Gas; Gl – Glicose; U – Ureia; Li- Lisina; M – motilidade

* VER TABELA DE INTERPRETAÇÃO NOS ANEXOS B e C.

ANEXO B - Categoria da identificação pelo Vitek

Categoria da identificação	Probabilidade
Excelente	96-99% probabilidade
Muito Bom	93-95% probabilidade
Bom	89-92% probabilidade
Aceitável	85-88% probabilidade
Fraca identificação	2 ou 3 <i>taxons</i> com mesmo biopadrão
Não identificado	> 3 <i>taxons</i> com mesmo biopadrão

ANEXO C - Categoria da identificação pelo MALDI – TOF

Categoria da identificação	score
Alta probabilidade de identificação da espécie	2.300-3.000
Identificação do gênero segura e provável identificação da espécie	2.000-2.229
Provável identificação do gênero	1.700-1.999
Nenhuma identificação possível	0.000-1.699