



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências Biológicas e de Saúde  
Instituto Biomédico  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular

**Caracterização das Ilhas de Patogenicidade em sorovares  
de *Salmonella* multirresistentes aos antimicrobianos prevalentes em  
diferentes fontes em nosso meio.**

**Marcelle da Silva Rodrigues**

Orietadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Dalia dos Prazeres Rodrigues

Rio de janeiro

2021

**Marcelle da Silva Rodrigues**

**Caracterização das Ilhas de Patogenicidade em sorovares  
de *Salmonella* multirresistentes aos antimicrobianos prevalentes de  
diferentes fontes em nosso meio.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orietadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Dalia dos Prazeres Rodrigues

Rio de janeiro

2021

R696 Rodrigues, Marcelle da Silva  
Caracterização das Ilhas de Patogenicidade em  
sorovares de Salmonella multirresistentes aos  
antimicrobianos prevalentes em diferentes fontes em  
nosso meio / Marcelle da Silva Rodrigues. -- Rio  
de Janeiro, 2021.  
71 f.

Orientadora: Dalia Rodrigues.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do  
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Molecular e Celular, 2021.

1. ilha de patogenicidade em Salmonella . 2.  
Salmonella spp.. 3. Gene de Virulência . I.  
Rodrigues, Dalia , orient. II. Título.

**Marcelle da Silva Rodrigues**

**Caracterização das Ilhas de Patogenicidade em sorovares  
de *Salmonella* multirresistentes aos antimicrobianos prevalentes de  
diferentes fontes em nosso meio.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

**Banca examinadora:**

Dr<sup>a</sup>. Dália dos Prazeres Rodrigues

Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque

Dr<sup>a</sup>. Verônica Dias Gonçalves

Dr<sup>a</sup>. Joelma Freire de Mesquita

Dr<sup>a</sup>. Emily Moraes Roges

Have courage be kind...  
Where there is kindness there is goodness,  
and where there is goodness there is magic

**Cinderella.**

## **Agradecimento**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades. Principalmente na atual crise da saúde, que estamos enfrentando a cada dia.

A minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Dalia dos Prazeres Rodrigues pelo suporte, e toda sua atenção e incentivo. Ao grupo LABENT, por todos esses anos de caminhada, pelo apoio no trabalho do dia a dia e pelas simbólicas comemorações. Um agradecimento especial as minhas amigas Emily e Verônica.

Obrigada a minha família: minha querida filha, que ainda é um bebê, não entende muito que eu estou fazendo, minha mãe, irmão, em especial a minha avó Iraci, que me deu apoio, incentivando nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu noivo Andrew, que mesmo de longe vem torcendo e incentivando ao meu progresso todos os dias.

Agradeço a todos os professores por proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional. A pós-graduação pela oportunidade.

## Resumo

Em nosso meio o conhecimento sobre os recursos patogênicos de *Salmonella* spp. é de importância fundamental para a saúde pública particularmente entre cepas pertencentes aos sorovares mais prevalentes. Buscamos avaliar cepas de *Salmonella* spp. com características de multirresistências aos antimicrobianos, quanto a presença de marcadores de virulência contidos em ilhas de patogenicidade localizadas no cromossoma destes microrganismo. Foram selecionadas em banco de dados do LRNEB, 69 cepas de *Salmonella* spp. com perfil resistente ou intermediários para a Cefoxitina, Ceftazidima, Imipenem e Ciprofloxacina, isoladas de diferentes fontes (animais de produção, humanos e alimentos), pertencentes aos sorovares: Enteritidis, Infantis, Newport, Typhimurium, Schwarzengrund e *Salmonella enterica* O1, 4, 12, as quais foram encaminhadas por instituições públicas e privadas para diagnóstico conclusivo entre os anos de 2015 a 2017. Foi realizado PCR para a detecção dos genes *orgA*, *invA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4D*, *sopB*, *stn*, *slyA*, *phoPQ* *spvC*. Foram obtidos produtos de amplificação em 89,8% das cepas para *orgA*, em 86,9% *invA*, 95,6% *ssaQ*, 94,2% *mgtC*, 94,2% *spi4D*, 98,5% *sopB*, 88,4% *stn*, 89,8% para *slyA*, em 97,1% para *phoPQ* e em 25% para *spvC*. A detecção de genes de virulência relacionados as ilhas de patogenicidade em isolados de *Salmonella* spp, que apresentaram resistência antimicrobiana aos fármacos de eleição para controle das infecções em humanos, reforçam a importância do monitoramento constante desses genes, uma vez que apontam a presença de isolados com alto poder de infectividade, dificultando a adoção de medidas profiláticas para controle principalmente na cadeia alimentar.

Palavras chaves: Ilha de Patogenicidade de *Salmonella*, *Salmonella* spp., Genes de Virulência .

## Abstract

In our environment, the knowledge about the pathogenic resources of *Salmonella* spp. is of fundamental importance for public health, particularly among strains belonging to the most prevalent serovars. We sought to evaluate strains of *Salmonella* spp. with characteristics of multidrug resistance to antimicrobial agents, regarding the presence of virulence markers contained in islands of pathogenicity located in the chromosome of these microorganisms. We selected from the LRNEB database, 69 strains of *Salmonella* spp. with resistant or intermediary profile to Cefoxitin, Ceftazidime, Imipenem and Ciprofloxacin, isolated from different sources (production animals, humans and food), belonging to the serovars: Enteritidis, Infantis, Newport, Typhimurium, Schwarzengrund and *Salmonella enterica* O1, 4, 12, which were referred by public and private institutions for conclusive diagnosis between the years 2015 to 2017. PCR was performed for the detection of *orgA*, *invA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4D*, *sopB*, *stn*, *slyA*, *phoPQ* *spvC* genes. Amplification products were obtained in 89.8% of the strains for *orgA*, in 86.9% *invA*, 95.6% *ssaQ*, 94.2% *mgtC*, 94.2% *spi4D*, 98.5% *sopB*, 88.4% *stn*, 89.8% for *slyA*, in 97.1% for *phoPQ* and in 25% for *spvC*. The detection of virulence genes related to islands of pathogenicity in isolates of *Salmonella* spp., which showed antimicrobial resistance to drugs of choice for the control of infections in humans, reinforce the importance of the constant monitoring of these genes, since they point to the presence of isolates with high power of infectivity, hindering the adoption of prophylactic measures for control mainly in the food chain.

Keywords: *Salmonella* Pathogenicity Island, *Salmonella* spp., Virulence Genes .



## Sumário

1- Introdução .....	1
2- Revisão de literatura .....	3
2.1- Gênero de <i>Salmonella</i> .....	3
2.2- Epidemiologia .....	4
2.3- Ilha de Patogenicidade .....	7
2.4- Fatores de Virulência .....	8
2.4.1 : Ilha de patogenicidade 1 de <i>Salmonella</i> – SPI 1 .....	9
2.4.2 : Ilha de patogenicidade 2 de <i>Salmonella</i> - SPI 2 .....	10
2.4.3 : Ilha de patogenicidade 3 de <i>Salmonella</i> – SPI 3 .....	10
2.4.4 : Ilha de patogenicidade 4 de <i>Salmonella</i> – SPI 4 .....	11
2.4.5 : Ilha de patogenicidade 5 de <i>Salmonella</i> - SPI -5 .....	11
2.5 : Reguladores Trascricionais. ....	11
2.6 : Enterotoxina .....	12
2.7 : Plasmídeo de Virulência .....	13
3 - Objetivo .....	14
3.1 - Objetivo Geral; .....	14
3.2 - Objetivos Especificos .....	14
4 - Material e Métodos .....	15
4.1 - Seleção de cepas .....	15
4.2 - Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) .....	15
4.2.1 - Preparo do Inóculo .....	15
4.2.2 - Meio de Cultura .....	15
4.2.3 - Antimicrobianos empregados .....	15
4.3 - Pesquisa dos genes de virulência .....	17
4.3.1 - Amplificação do DNA Bacteriano .....	18
4.3.2 - Eletroforese e revelação do Gel .....	18
5 - Resultados .....	20
6 - Discussão .....	34
7 - Conclusão .....	41

## Lista de Quadros

Quadro 1: Distribuição do número de sorovares de cada espécie de <i>Salmonella</i> .....	4
Quadro 2 - Cepa padrão utilizada no controle de qualidade do TSA, (CLSI, 2021) .....	16
Quadro 3 - Relação de Antimicrobianos utilizados no TSA .....	16
Quadro 4 - Sequências alvo dos genes de virulência pesquisados ..	17
Quadro 5 - Componentes e concentrações para preparo do MIX de.....	18

## Lista de Figuras

Figura 1 - Percentual de resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp. de fonte alimentar. ....	23
Figura 2 - Percentual de resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp. de fonte animal .....	23
Figura 3 - Percentual de resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp. de fonte humana .....	24
Figura 4 - Pesquisa de genes de virulência de SPI-1 a 5 em <i>Salmonella</i> spp. por sorovar. ....	25
Figura 5 - Reação em cadeia polimerase nos genes <i>stn</i> , <i>phoPQ</i> , <i>slyA</i> e <i>spvC</i> em <i>Salmonella</i> spp. ....	26
Figura 6 - Reação em cadeia polimerase de <i>Salmonella</i> spp. nas cinco Ilhas de Patogenicidade por fonte de isolamento .....	26
Figura 7 - Reação em cadeia polimerase nos genes <i>stn</i> , <i>phoPQ</i> , <i>slyA</i> e <i>spvC</i> nas fontes de isolamento em <i>Salmonella</i> spp .....	27

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição das cepas <i>Salmonella</i> spp. selecionadas por ano de isolamento .....	20
Tabela 2 - Distribuição de <i>Salmonella</i> spp. por fontes de isolamento.....	20
Tabela 3 - Distribuição de <i>Salmonella</i> spp. por fonte de isolamento e ano	21
Tabela 4 - Cepas de <i>Samonella</i> spp.com alterações no perfil de suscetibilidade antimicrobiana após a realização de novo TSA para confirmação da resistência.....	21
Tabela 5 - Distribuição percentual da resistência em <i>Salmonella</i> spp. por sorovar entre os antimicrobianos testados.....	22
Tabela 6 - Cepas de <i>Salmonella</i> spp. positivas para os genes <i>orgA</i> e <i>invA</i> da SPI-1 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento .....	28
Tabela 7 - Cepas de <i>Salmonella</i> spp. positivas para o gene <i>ssaQ</i> da SPI-2 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento .....	28
Tabela 8 - Cepas de <i>Salmonella</i> spp. positivas para o gene <i>mgtC</i> da SPI-3 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento .....	29
Tabela 9 - Cepas de <i>Salmonella</i> spp. positivas para o gene <i>spi4D</i> da SPI-4 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento .....	29
Tabela 10 - Cepas de <i>Salmonella</i> spp. positivas para o gene <i>sopB</i> da SPI-5 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento .....	30
Tabela 11- Cepas de <i>Salmonella</i> spp. positivas para os genes <i>phoPQ</i> e <i>slyA</i> reguladores transcricionais distribuídas por sorovar e fonte de isolamento.	30
Tabela 12 - Cepas de <i>Salmonella</i> spp. positivas para o gene <i>snt</i> distribuída por sorovar e fonte de isolamento .....	31
Tabela 13 - Cepas de <i>Salmonella</i> spp. positivas para o gene <i>spvC</i> da ilha plasmídial .....	31
Tabela 14 - Relação entre genes de virulência, reguladores transcricionais, plasmídeo de virulência e perfil de suscetibilidade antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp.....	32

## Lista de Abreviaturas

ATCC - American Type Culture Collection  
ATP - Adenosina Trifosfato  
CAZ - Ceftazidima  
CDC - Centers for Disease Control and Prevention  
CIP - Ciprofloxacina  
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DNTP- Desorribonucleotídeos Trifosfato  
DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EU - União Europeia  
EUA - Estados Unidos da América  
FOX - Cefoxitina  
IMP - Imipenem  
IOC - Instituto Oswaldo Cruz  
Kb - Kilobases  
LABENT - Laboratório de Enterobactérias  
LRNEB - Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas  
MDR-Resistência a Múltiplas Drogas  
Mg<sup>2+</sup> - Magnésio  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio  
MH - Mueller -Hinton  
µg - Micrograma  
µm - micrómetro  
mL - Mililitros  
mM - Milímetros  
Nm - nanômetro  
°C - graus Celsius  
OFR - Open reading frame  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
pb – *Pares de Base*  
PCR - Reação em Cadeia Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

rpm - Rotação por minuto

S. - *Salmonella*

SPI- Ilha de patogenicidade em *Salmonella*

subsp. - Subespécies

T1SS - Tipe one secretion system

T3SS - Tipe three secretion system

TBE 1X - Tris borato EDTA uma vez concentrado

tRNA - RNA transportador

TSA - Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana

UFC - Unidade de Formadora de Colônia

V - Volts

## 1- Introdução

O gênero da *Salmonella* apresenta uma grande importância por ser um dos principais agentes causadores de DTA, responsáveis por uma enorme carga global de morbidade e mortalidade, causando cerca de 155.000 mortes anualmente (Majowicz *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015; Odoch *et al.*, 2017; Mohammed *et al.*, 2017). Entre os agentes de doença diarreica, *Salmonella* spp. é o patógeno que registrou maior número de óbitos com cerca de 59.000 e 420.000 vítimas até 2015, resultante de infecções de origem alimentar (OMS., 2015 )

A *Salmonella* spp. está entre os patógenos mais comuns isolados de animais destinados a produção de alimentos, sendo responsável por infecções zoonóticas em humanos e espécies animais. Assim, infecção causada por *Salmonella* spp. representa grande preocupação para a saúde pública, em relação a animais de indústrias de alimentos em todo o mundo (Mezal *et al.*,2014). Além disso, vem sendo observado o aumento de sorovares resistentes aos antimicrobianos o que, acrescido dos mecanismos de virulência, desempenha um papel importante nas infecções sistêmicas causadas por esses patógenos (Gharieb,Tartor e Khedr, 2015).

A infecção por *Salmonella* spp. geralmente ocorre após introdução do patógeno por via oral, penetração no epitélio da mucosa intestinal e sobrevivência nas células fagocíticas. A infecção sistêmica solicita a translocação para órgãos ricos em macrófagos e monócitos; baço e o fígado, onde sobrevivem e se multiplicam. Durante a infecção, *Salmonella* spp. expressa um conjunto de genes de virulência codificados em regiões discretas do genoma (El-Mouali *et al.*, 2018).

Os genes de virulência podem estar presentes no cromossomo bacteriano, plasmídeos e ilhas de patogenicidade (PAI). Estes podem desempenhar alguns papéis importantes na adesão, invasão, sobrevivência intracelular, infecção sistêmica, expressão de fimbria, resistência antimicrobiana, produção de toxinas e  $Mg^{2+}$  e absorção de ferro (Elemfareji e Thong 2013).

Foram identificadas 23 Ilhas de patogenicidade em *Salmonella* (Hayard *et al.*, 2014), entre as quais, a ilha de patogenicidade 1 é uma ilha considerada

altamente conservada, e encontrada em todos os sorovares de *Salmonella enterica*, com exceção de S. Seftenberg e S.Litchfield (Hu *et al.*; 2008 ).

Em *Salmonella enterica*, SPI1 e SPI2 são essenciais para a invasão de células epiteliais e consequente enterite e doença sistêmica (García-del, 2001; Groisman e Ochman, 1997). Segundo Marcus *et al* (2000) a SPI3 contém dez ORF(Open reading frame) organizados em seis unidades de transcrição, sendo dois desses genes, *mgtCB*, necessários para a sobrevivência e virulência. Esses genes formam um *operon* sob o controle rigoroso de *phoP/Q*. As proteínas codificadas permitem que transportem o  $Mg^{2+}$  em baixas concentrações, embora sua função como transportadores ainda seja controverso. Ao contrário de SPI1 e SPI2, a SPI3 codifica proteínas sem relação funcional entre si. Especula-se que SPI4 esteja envolvida na secreção de uma citotoxina além de ser necessária para a fase intestinal da doença (Morgan *et al.*, 2004). SPI-5 codifica proteínas relacionadas com a diarreia e a reação inflamatória da mucosa intestinal codificando proteínas efetoras das SPI1 e 2. (Júnior e Neto, 2009; Sabbagh, 2010).

Considerando-se a carência de conhecimento sobre as características patogênicas de *Salmonella* spp. é de fundamental importância para saúde pública e sanidade animal, o estudo dos fatores relacionados a patogenicidade das cepas pertencentes aos sorovares prevalentes em nosso meio, considerando as diferentes fontes. As características quanto aos fatores de virulência, particularmente entre cepas multirresistentes no Brasil, podem contribuir decisivamente para o monitoramento desse patógeno, bem como oferecer um suporte de diagnóstico as ações de prevenções necessárias.



## 2- Revisão de literatura:

### 2.1- Gênero *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae. São bastonetes Gram negativos, possuem dimensões aproximadas de 0,7-1,5 µm de largura por 2-5 µm de comprimento, não são produtores de esporos, são aero-anaeróbios facultativos, produtores de ácido (ácido sulfídrico, H<sub>2</sub>S), e gás a partir da fermentação da glicose (exceto *S. Typhi*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* ≤ 5% produzem gás), (Clarke, Gyles e Charles., 1993; Barrow.,1999; Popoff, Bockemuhl e Gheesling., 2004; D'Aoust et al.,2007; SVS, 2011). A temperatura excelente para o crescimento de *Salmonella* é de 37°C; no entanto, seu crescimento foi registrado de 4°C até 54°C; podem viver em ampla faixa de pH de 6,5 até 7,5 (Adley e Ryan, 2016; Ellermeier e Slauch, 2007).

Em 1884, *Salmonella* recebeu o nome de "*Bacillus choleraesuis*" depois que Daniel E. Salmon, um veterinário isolou de intestino de suíno. (Smith,1894; Salmonand e Smith, 1885).

A classificação das cepas de *Salmonella* baseava-se em isolamento do hospedeiro, a expressão clínica da infecção, reações bioquímicas e padrão antigênico (Strockbine *et al.*, 2015). Desde o seu primeiro isolamento, vários sistemas de nomenclaturas têm sido usados para identificar estas bactérias e atualmente compreendem a divisão do gênero em subgêneros, espécies, subespécies, grupos, subgrupos e sorovares (Swaminathan *et al.*, 2000).

A classificação do gênero *Salmonella*, a partir da identificação de antígenos, teve início em 1926, pelos trabalhos desenvolvidos por White e, posteriormente, por Kauffman, em 1930, em estudos que deram origem ao Esquema de Kauffman e White, empregado até os dias atuais e que propõe a divisão do grupo em sorogrupos e sorovares, com base na presença dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e (Vi) capsulares (De-Jong *et al.*, 2012).

O gênero *Salmonella* inclui apenas duas espécies das quais *Salmonella enterica* divide-se em *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica*, está dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica*

subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* , *S. enterica* subsp. *indica* e *S. subsp. bongori*. Esta nomenclatura reflete o entendimento atual da taxonomia de *Salmonella* ( CJ, 2005; Tindall *et al.*, 2015).

O nome do sorovar é escrito em letras romanas em estilo de letra regular (não itálico), e com a primeira letra em maiúscula. *Salmonella enterica* inclui mais de 2600 sorovares, distribuídos entre subespécies. A subespécie enterica possui maior relevância e maior número de sorovares (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014), como demonstrado na Quadro 1.

**Quadro 1:** Distribuição do número de sorovares de cada espécie de *Salmonella*.

Sorovar	Número
<i>S. entérica</i> subsp. <i>entérica</i>	1586
<i>S. entérica</i> subsp. <i>salamae</i>	522
<i>S. entérica</i> subsp. <i>arizonae</i>	102
<i>S. entérica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	338
<i>S. entérica</i> subsp. <i>houtenae</i>	76
<i>S. entérica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
Total	2659

## 2.2- Epidemiologia

*Salmonella* spp. está bastante difundida em todo o mundo. A constituição genética desta bactéria permite sua adaptação a uma variedade de ambientes e animais (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011). Nas últimas três décadas houve um aumento dos casos de salmonelose nos países desenvolvidos, que se disseminou pelo mundo atingindo níveis epidêmicos. A ocorrência maior foi em crianças menores de cinco anos e em adultos com mais de 60 anos de idade. As fontes mais comuns de infecção são produtos derivados das aves domésticas, carne suína, bovina, chocolate e alimentos preparados em superfícies mal higienizadas (Jay, J.M 2000; Shi *et al.*, 2015).

Segundo OMS, o gênero *Salmonella* é responsável por 180 milhões, ou 9% dos quadros diarreicos que acontecem mundialmente em todo ano. Sugere-se que 52% desses casos sejam provocados por sorovares paratíficas (Classificação mais recente baseada na importância da *Salmonella* como agente causador de doença nas aves e de risco para saúde pública) de *Salmonella enterica pertencente aos sorovares: Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Newport*, que representam sorotipos epidemiologicamente importantes, pois tem como reservatórios as aves e seus produtos, tendo sido associados com a maioria da carga de salmonelose humana em todo o mundo (WHO, 2016; Fagbamila *et al.*, 2017; Eguale *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018).

Nos EUA, a *Salmonella* causa anualmente aproximadamente 1,2 milhões de infecções (Boore *et al.*, 2015). Segundo um relatório do CDC, entre os anos de 1968 e 2011, das inúmeras fontes possíveis de *S. enterica sorovar Enteritidis*, o frango ocupou o topo da lista, sendo o principal veiculador deste patógeno. Para *S. enterica sorovar Typhimurium*, foram identificados 33,7% em bovinos, 13 % em suínos e 9,9% em frango como causadores de disseminação de cepas casos humanos entre fontes de isolados. (CDC,2013).

Na UE a salmonelose é a segunda zoonose mais comum, ficando atrás somente de *Campylobacter*, gerando um gasto estimado de mais de três bilhões de Euros (EFSA, 2014a). Os sorovares frequentemente notificados são, *Enteritidis* e *Typhimurium*, que representam 39,5% e 20,2% dos casos de infecções humanas respectivamente. *Salmonella enterica sorovar Infantis* ocupou a posição de quarto sorovar mais frequente na UE neste mesmo ano (EFSA, 2015).

Na Áustria em 2007 houve um total de 438 surtos de *Salmonella* provocados por fonte alimentar, onde cerca de 70% dos casos estavam relacionados a avicultura (Much *et al.*, 2009). Na zona rural da Tailândia, 84% das amostras de alimentos estavam contaminados por *Salmonella* (Bodhidatta *et al.*, 2013). Na China, cerca de 75% das DTA registradas em um ano foram atribuídas à diferentes sorovares de *Salmonella* (Wang *et al.*, 2017).

Na África subsaariana, *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* foram consideradas responsáveis por cerca de 20 a 25% dos casos de fatalidade em quadros de infecções em adultos e crianças (Feasey *et al.*, 2012).

Em países da América latina, (Argentina, Chile, Peru, Uruguai, Paraguai e Equador) foram relatados aproximadamente 406 surtos e 16.304 casos de salmonelose entre os anos 1995 e 2001, sendo este patógeno considerado como um dos mais importantes nestes países (Franco *et al.*, 2003).

No Brasil entre os anos de 2007 a 2016 as salmoneloses foram a segunda maior causa de DTA de origem bacteriana (SVS, 2016). O Brasil no ano de 2017, foi o maior exportador e o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (ABPA, 2018).

Em um estudo realizado em diferentes cidades brasileiras, foi avaliada a prevalência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango congeladas, com 2,7% de carcaças contaminadas, com maior prevalência na cidade de São Paulo. Dezoito sorotipos foram identificados sendo os mais comuns Enteritidis (48,8%), Infantis (7,6%) e Typhimurium (7,2%) (Medeiros *et al.*, 2011).

Conforme dados do Ministério da Saúde, entre os anos de 2000 e 2011, *Salmonella* spp. foi a principal causa de DTA no Brasil, associada a ocorrência de mais de 1.600 surtos ao longo desse período. Os anos em que foram registrados os maiores índices de surtos por essa bactéria foram 2001, 2002 e 2008. Por outro lado, 2010 e 2011, apresentaram os menores índices de surto. As residências foram os principais locais relacionados a esses surtos e a ingestão de alimentos mistos, ovos e produtos a base de ovos foram considerados as principais classes de alimentos envolvidos (BRASIL, 2011).

DTHA são surtos de doenças de transmissão Hídrica e Alimentar. No Brasil, no período de 2007 a 2019, foram notificados 9.030 surtos de DTHA, 160.702 doentes e 146 óbitos. Dos 9,030 surtos notificados, 3,275(36,27%) tiveram a identificação de agente etiológicos sendo o mais encontrado a *Salmonella* spp com 24,8%. (Boletim Epidemiológicos 2021)

### 2.3- Ilha de Patogenicidade:

No final da década de 90, foram descobertos agrupamento de genes em determinados cepas de bactérias, que codificaram fatores de virulência e estavam ausentes em outras da mesma espécie. Esse agrupamento de genes ficou conhecido como Ilha de Patogenicidade-PAI. A primeira descrição nas bactérias dessas ilhas ocorreu em decorrência da presença região atípica no DNA cromossômico de *Escherichia coli* (Hacker *et al.*, 1990).

As PAIs são segmentos grandes de DNA que codificam fatores de virulência, como invasão, adesão, toxinas. As Ilhas de Patogenicidade apresentam conteúdo de guanina e citosina (G+C) diferente do restante do cromossomo, geralmente estão localizadas em regiões específicas no genoma bacteriano, associadas a genes que codificam RNA transportador (Vieira, 2009).

Os genes de virulência podem estar presentes em elementos genéticos transmissíveis, como os plasmídeos, ou nas regiões específicas do cromossoma, as chamadas ilhas de patogenicidade (Van Asten e Van Dijk, 2005). A virulência em *Salmonella* é uma combinação de fatores cromossomais e plasmideais (OLIVEIRA, *et al.*, 2003), onde esta relacionado a capacidade de penetrar e replicar nas células epiteliais e de produção de toxinas (Rodrigues, 2005). Os plasmídeos são elementos genéticos que se replicam independentemente do cromossomo do hospedeiro, podendo ser encontrado na forma circular no interior de células procarióticas, apresentando porções pequenas quantidade de DNA circular extracromossomal, e não são vitais à célula bacteriana (Madigan *et al.*, 2010).

Durante o processo de infecção, a invasão das células epiteliais intestinais e a sobrevivência em macrófagos são cruciais para a patogenicidade desta bactéria intracelular e são mediados principalmente por dois sistemas de secreção do tipo III (T3SS), codificados por ilhas de patogenicidade de *Salmonella*(SPIs). O T3SS codificado por Ilha de patogenicidade de *Samonella*-1 (SPI-1), e suas proteínas efetoras são principalmente responsáveis pela invasão bacteriana, enquanto o T3SS codificado pela ilha de patogenicidade de *Salmonella*-2 (SPI-2), e suas proteínas efetoras estão

predominantemente envolvidas na sobrevivência e replicação intracelular (Ellermeir e Slauch, 2004; Figueira, Holden e Helaine, 2013).

No entanto, o T3SS codificado por SPI-1 também é necessário na produção de citosinas inflamatórias durante a interação bacteriana com macrófagos, o que sugere que T3SS codificado por SPI-1 também desempenha um papel importante na sobrevivência e replicação bacteriana em macrófagos e no estágios finais da infecção (Pavlor *et al.*, 2011).

#### **2.4- Fatores de Virulência:**

O sucesso de *Salmonella* spp. como patógeno, requer a presença de vários genes de virulência que são expressos de forma coordenada (Fass e Groisman, 2009). O gênero *Salmonella* apresenta vários fatores de virulência relacionados à resistência a condições de estresse, à invasão à célula hospedeira e à patogênese intracelular (Hansen-Wester e Hensel, 2001; Hensel, 2004; Vernikos e Parkhill, 2006).

Genes de virulência podem estar localizados em plasmídeos que abrigam genes como os do operon *spv* (Casadesús, 1999; Guerra *et al.*, 2002; De Jong *et al.*, 2012; Fabrega e Vila 2013), que partilham uma região altamente conservada designada por RABCD (plasmídeo de virulência de *Salmonella*). Genes expressos pela região *spv* promovem um rápido crescimento e sobrevivência da *Salmonella* spp. dentro das células hospedeiras sendo importante para a infecção sistêmica (Libby *et al.*, 1997). Entretanto, a maioria dos genes de virulência está localizada no cromossomo, dentro de ilhas cromossômicas (Hansen-Wester e Hensel, 2001).

Aproximadamente 23 ilhas de patogenicidade em *Salmonella* são identificadas e caracterizadas (Haywrdet *al.*, 2014; SévellecY *et al.*, 2018), entre as quais SPI-1 a SPI-5 foram consideradas a base da patogenicidade no hospedeiro (Wood *et al.*, 1998). Contudo, SPI-1 e SPI-2 são as mais estudadas e conhecidas por codificar os fatores necessários para a invasão de células não fagocíticas e sobrevivência dentro de macrófagos (Ellermeier e Slauch, 2007; Fabrega e Vila, 2013). Estas duas ilhas codificam para o sistema de secreção do tipo III (T3SS) T1SS e T2SS, respectivamente, e tem uma função importante na distribuição de diferentes proteínas efetoras no hospedeiro que medeiam a patogênese (Vishwakarma *et al.*, 2014).

#### 2.4.1 : Ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella* – SPI 1.

É a mais bem caracterizada das cinco SPIs. Trata-se de um segmento de 35-40 kb que contém 31 genes divididos que codificam produtos para T3SS e genes que codificam proteínas efectoras.

T3SS é um mecanismo de virulência comum em muitas bactérias Gram negativas. É uma estrutura “tipo agulha” capaz de atravessar a membrana da célula hospedeira, permitindo que proteínas efectoras sejam deslocadas do citoplasma bacteriano para o interior da célula eucariótica, além poder mediar secreção de proteína extracelular diretamente no citosol das células hospedeiras de eucariotos (Kubori *et al.*, 1998; Temme *et al.*, 2008).

Proteínas efectoras podem alterar as funções celulares de eucariotos e auxiliam na infecção, promovendo a invasão de células epiteliais não fagocíticas e iniciação da resposta inflamatória no intestino, além de estarem associadas na sobrevivência e persistência da bactéria no hospedeiro (Dieye *et al.*, 2009).

O operon *inv* (invasibility) da SPI-1, é composto de sete genes (*invA*, *invB*, *invC*, *invD*, *invE*, *invF* e *invG*). O gene *invA* é o primeiro no operon, que desempenha função importante na invasão de células epiteliais. *Salmonella enterica* que não tem a presença do gene *invA*, são incapazes de expressar os genes *invBC*, tornando-os impossibilitados de invadir células de mamíferos (Galán e CurtisIII, 1989; Porter e Curtiss, 1997).

Outra função associada à SPI-1 é o controle da captura de *Salmonella* spp. por células dendríticas. Um trabalho com cepas mutantes em *invC*, gene que codifica uma ATPase envolvida na geração de energia para o T3SS, mostrou que estas células foram capturadas com maior eficiência em relação à cepa selvagem, mostrando que SPI1 funcional controla o número de bactérias que adentram as células dendríticas (Hershel *et al.*, 1999).

Os genes de SPI-1 são contidos em *Salmonella* spp. são expressos sob condições impostas aos patógenos pelo microambiente do hospedeiro como o ambiente intestinal. Tais condições incluem níveis de oxigênio, osmolaridade, fase de crescimento, pH e presença de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (Durant, Corrier e Ricke, 2000). Os resultados identificados de genes

codificadores por SPI-1 com o hospedeiro parecem variar muito conforme a cepa e modelo de estudo.

#### **2.4.2 : Ilha de patogenicidade 2 de *Salmonella* – SPI 2.**

A Ilha de patogenicidade SPI2 possui uma estrutura de mosaico de pelo menos dois elementos genéticos. Na localização da porção de 25,3 Kb estão presentes genes importantes para a virulência. Esta ilha de patogenicidade codifica seu próprio T3SS com finalidade de transportar proteínas efetoras que protegem a bactéria dos mecanismos de defesa do hospedeiro permitindo a sua sobrevivência no interior dos fagócitos (Marcus *et al.*, 2000; Schmidt e Hensel *et al.*, 2004; Ochoa e Rodriguez 2005; Vieira., 2009).

Essa ilha apresenta mais de 40 genes (Vieira, 2009). Karasova (2010) promoveram estudo como mutações nas SPI-1 a SPI-5 em cepas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, e inocularam em camundongos a fim de verificar o reflexo destas mutações em relação a virulência. Os autores observaram que cepas mutantes para SPI-1, SPI-3, SPI-4 e SPI-5 foram tão virulentas quanto estirpes selvagens, levando a morte dos camundongos em três semanas após a infecção. Entretanto, camundongos infectados com cepas mutantes para SPI-2 sobreviveram à infecção, demonstrando que a virulência é dependente desta ilha de patogenicidade.

#### **2.4.3 : Ilha de patogenicidade 3 de *Salmonella* – SPI 3.**

A organização genética e funcional de SPI-3 em *Salmonella* é diferente de SPI-1 e SPI-2, estando inserida no gene de tRNA *selC*, um *locus* que serve de local de inserção de SPI em cepas de *Escherichia coli* patogênicas. Este *locus* possui cerca de 17 Kb, com uma composição de bases semelhante ao core genômico (Blanc-Potard *et al.*, 1999).

Nas SPI-3 estão presentes os genes *mgtB* e *mgtC*, necessários para sobrevivência no interior de macrófagos. Além disso o gene *mgtB* é responsável pelo transporte de magnésio quando este se encontra em baixas concentrações. Este sistema de captação de Mg<sup>2+</sup> é importante para adaptação a limitações nutricionais no interior do fagossomo (Fortes *et al.*, 2013).



#### **2.4.4 : Ilha de patogenicidade 4 de *Salmonella* – SPI 4.**

A SPI-4 está presente em diversos sorovares de *Salmonella enterica* (Amavisit *et al.*, 2003). A SPI-4 é conservada entre os diferentes sorovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, necessária para a sobrevivência no interior dos macrófagos. (Hensel, 2004). Contém um único operon, *siiA*, *siiB*, *siiC*, *siiD*, *siiE* (McClelland *et al.*, 2001). Possui o sistema de secreção TTSS para a adesina não fimbrial *siiE* que media o contato da bactéria com microvilosidades da membrana apical. *siiE* é necessária para adesão da *Salmonella* às células epiteliais polarizadas. Sem a adesão mediada pela secreção de *siiE*, impede a remodelação do citoesqueleto celular levando assim a absorção do patógeno (Gerlach *et al.*, 2007).

#### **2.4.5 : Ilha de patogenicidade 5 de *Salmonella* – SPI -5.**

A SPI-5 tem tamanho de 25 Kb e está localizada no cromossomo, sendo identificada em uma extensa variedade de *S. enterica*, incluindo *S. Typhimurium* (Wood *et al.*, 1998; Hong e Miller, 1998), codifica proteínas efetoras dos TTSS codificados por SPI-1 e SPI-2 (Hensel, 2004; Barrow *et al.*, 2010).

Constituída por sete proteínas efetoras a *sopA*, *sopB*, *sigD*, *sopD*, *sopE1*, *sopE2*, *sspH1* e *slrP*, da cuja a secreção é mediada pelo sistema de secreção do tipo III e são codificadas por genes que estão localizados fora da SPI1 (Stender *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2000).

A proteína externa B de *Salmonella*, *sopB* é uma proteína efetora que contribui para a invasão, sendo responsável por induzir inflamações e diarreias por *Salmonella*. (Wood *et al.*, 2000; Raffatellu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005).

#### **2.5 : Reguladores Transcricionais.**

O Sistema regulador *phoPQ* é necessário para a virulência de *Salmonella* spp (Gunn, Hohmann e Miller, 1996; Guo *et al.*, 1997) também tem um papel importante na sobrevivência da *Salmonella* spp no intestino e na vesícula biliar (Gncuoglu, 2013) e é ativado a pH baixo,  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , e por atividade de peptídeos antimicrobiano (Véscovi, Soncini e Groisman, 1996; Bearson, Wilson e Foster 1998; Prost, Daley e Sage, 2007)

As proteínas *phoP* e *phoQ* formam um sistema regulador de dois componentes que regula a virulência em *S. Typhimurium* (Miller, Kukral e Mekalanos, 1989 ) O *phoQ* responde a sinais indutores promovendo o estado fosforilação do *phoP* ,(shin e Groisman, 2005). A Ativação do *phoQ* é pelo pH levemente ácido, é fundamental para a virulência de *Salmonella Typhimurium* , pois a inibição da acidificação do fagossomo prejudica a sobrevivência dentro do macrófago, além da ativação do *phoP* (Martin-Orozco *et al.*, 2006), além de atuar como regulador transcricional do gene *slyA* (Shi *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008).

*Salmonella* é capaz de detectar e responder às mudanças ambientais que ocorrem durante o processo infeccioso, modulando a expressão gênica, e se adapta às condições de estresse. Um fator de transcrição envolvido neste processo é SlyA (codificado por *slyA* ), é um regulador transcricional pertencente à superfamília MarR de fatores de transcrição bacteriana (Stapleton *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2007; Dolan e Duguid, 2011; Will e Fang, 2020 ). Contribuindo para a infecção bacteriana em parte pela ativação da hemolisina e da produção de flagelo (Libb *et al.*,1994; Stapleton,Norte e Read, 2002).

Essa caracterização foi posteriormente observada por um regulador de sistema com dois componentes PhoP / PhoQ, que ativa a transcrição do gene *slyA*. Quando a privação de  $Mg^{2+}$ , a quinase PhoQ medeia a fosforilação do regulador de resposta PhoP, facilitando a ligação de PhoP aos promotores regulador operon, *phoPQ* e *slyA* (Shi *et al.*, 2004; Norte, Stapleto e Green, 2003). O gene de virulência *slyA* foi melhor caracterizado em *Salmonella Typhimurium* (Will *et al.*, 2014; Will, Navarre e Fang ,2015).

## 2.6 : Enterotoxina.

O gene *stn* é especificamente distribuído em *Salmonella* spp. independentemente de seus sorotipos ( Dinjus *et al.*, 1997 ; Makino *et al.*, 1999 ; Moore *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2009 ). O gene *stn* pode ser útil para a identificação ou detecção de *Salmonella*, ele pode estar envolvido em funções exclusivas em *Salmonella* spp. O *stn* , codifica a produção de enterotoxinas, e mostrou ser um agente causador da diarreia

(Huehn, 2010). Não estão localizados nas SPIs. Este gene de virulência atua através da manutenção da composição e integridade da membrana da *Salmonella* (Nakano *et al.*, 2012).

Segundo Chopra (1999), o *stn* tem uma atividade enterotóxica em um modelo de alça. Portanto, acredita-se que o *stn* é um fator de virulência da *Salmonella* e responsável pela enterotoxicidade. O gene *stn* em *Salmonella* enterica codifica uma proteína de aproximadamente 29kDa, utilizando um códon de início TTG, e contém um porção conservada e proteína com atividade de ribosolação de ADP. (Chopa *et al.*, 1994)

### **2.7 : Plasmídeo de Virulência.**

O Operon *spv* é conservado entre diferentes plasmídeos de virulência de vários sorotipos de *Salmonella* que produzem doenças sistêmicas. (Guiney *et al.*, 1995)

A maioria da *Salmonella* spp patogênica contém um plasmídeo de virulência pSLT que contém uma região altamente conservada de cinco genes *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC*, *spvD*, os quais foram relatados como relacionado na sobrevivência e crescimento intracelular. (Guiney e Fierer, 2011; Passaris *et al.*, 2018)

Plasmídeos de alto peso molecular contêm uma região altamente conservada chamadas de *spv*. As proteínas *spv* são necessárias para estabelecer a infecção (Matsui *et al.*, 2001). *spvC*, leva-se a acreditar que possui uma redução da resposta inflamatória intestinal, que pode ser importante durante a infecção sistêmica da *Salmonella* (Zuo *et al.*, 2020).

### **3 – Objetivo**

#### **3.1 – Objetivo Geral;**

Avaliar a variação genética de cinco Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI) em isolados de fontes humana, alimentar e animal de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*/ *S. enterica* O1,4,12, *S. Infantis*, *S. Newport*, *S. Schwarzengrund* multirresistentes aos antimicrobianos.

#### **3.2 – Objetivos Específicos:**

- Selecionar em Banco de Dados as cepas pertencentes aos sorovares prevalentes identificadas entre 2015 e 2017 em diferentes regiões do país;
- Confirmar o Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana;
- Caracterizar genes de virulência associados à SPI1, SPI2, SP3, SP4 e SP5 em *Salmonella spp.*;
- Avaliar as diferenças entre os genes virulência encontradas de acordo com sorovar e fonte de isolamento;
- Avaliar a relação entre as ilhas de patogenicidade presentes e o perfil de resistência das diversas cepas;

## **4 – Material e Métodos**

### **4.1 – Seleção de cepas**

As cepas pertencentes aos sorovares, Enteritidis, Infantis, Newport, Typhimurium, *enterica* O1,4,12 e Schwarzenrund, isoladas de fontes alimentares, humanas e de animais de produção e encaminhadas por instituições Públicas e Privadas entre os anos de 2015 a 2017, foram selecionadas em banco de dados do LRNEB, 24 cepas humanas, 23 cepas Alimentares e 22 cepas animais, sendo essas: 6 S. Enteritidis, 14 S. Infanti, 5 S. Newport, 7 S. Schwarzenrund, 33 S. Typhimurium e 4 S. *enterica* O1,4,12. Todas as amostras estão conservadas em temperatura ambiente  $25 \pm 10^{\circ}\text{C}$  em Agar Nutriente Tamponado e em SkimMilk a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2 – Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA)**

#### **4.2.1 – Preparo do Inóculo**

As cepas de *Salmonella* spp. foram semeadas por esgotamento em Ágar Nutriente 0,5%(DIFCO) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após esse período, quatro a cinco colônias foram selecionadas e repicadas em 3,0mL de Caldo MH (OXOID) e incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  até atingir turvação correspondente a 0.5 da escala de MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Foi utilizado espectrofotômetro (UNICO-1100 Spectrophotometer) para a obtenção da turbidez variável entre 0.008 a 0.010 de absorbância em comprimento de onda de 625nm.

#### **4.2.2 – Meio de Cultura**

Ágar Mueller-Hinton-MH (OXOID), foi preparado e esterilizado de acordo com as recomendações do fabricante, distribuído em placas de Petri de 100 mm de diâmetro, em volume de 22 mL, visando obtenção de camada interna de 4mm de profundidade.

#### **4.2.3 – Antimicrobianos empregados**

Foram empregados no TSA para a confirmação da Susceptibilidade as seguintes drogas das classes das Cefalosporinas, Cabapenêmicos e Quinolonas: Cefoxitina  $30\mu\text{g}$  (FOX), Ceftazidina  $30\mu\text{g}$  (CAZ); Imipenem  $10\mu\text{g}$

(IMP) e Ciprofloxacina 5µg (CIP), conforme os valores de referência padronizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para o controle de qualidade de execução e confiabilidade dos resultados obtidos, a cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 foi testada sob as mesmas condições de cultivo e incubação que as cepas em estudo (Quadro 2).

**Quadro 2** – Cepa padrão utilizada no controle de qualidade do TSA, (CLSI, 2021).

CEPA PADRÃO	FINALIDADE
<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>	Avaliação geral dos discos de antimicrobianos; Controle negativo para β-lactamases.

O inóculo padronizado foi semeado uniformemente na superfície do meio Ágar MH utilizando um *swab* e após a deposição dos discos, através de “Dispenser Disk” (OXOID), as placas foram incubadas em estufa 35°C. Após 18-24 h de incubação, a leitura do diâmetro dos halos de inibição foi realizada utilizando um paquímetro, com interpretação da suscetibilidade baseado nas recomendações do CLSI (Quadro 3).

**Quadro 3** – Relação de Antimicrobianos utilizados no TSA.

ANTIMICROBIANOS		SIGLA	DIÂMETRO DOS HALOS (mm)		
			RESISTENTE	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL
Cefalosporina	Cefoxitina	<b>FOX</b>	14	15-17	18
	Ceftazidima	<b>CAZ</b>	≤17	18-20	≥21
Carbapenêmico	Imipenem	<b>IMP</b>	≤19	20-22	≥29
Quinolona	Ciprofloxacina	<b>CIP</b>	≤20	21-30	≥31

### 4.3 – Pesquisa dos genes de virulência

A extração do DNA foi realizada pela técnica de Bolada *et al.*, 1995 com modificada (Fervura da suspensão de 99°C por 10 minutos, choque térmico a -20°C por cinco minutos e centrifugação a 12000 rpm por dois minutos ) a partir de um crescimento bacteriano em ágar nutriente 0,5%, incubado por 18-24H a 37°C,. A pesquisa dos genes de virulência foi realizada através da PCR das cepas selecionadas. Foram empregados iniciadores (“primers”) para as SPI-1 a SPI-5, reguladores transcricional e enterotoxina, de acordo com Guerra *et al.* (2000) e Soto *et al.* (2006) (quadro 4).

**Quadro 4 – Sequências alvo dos genes de virulência pesquisados.**

Gene	Função ou Localização	Sequência (5'-3')	Produto	Referência
orgA-F orgA-R	SPI-1	GATAAGGCGAAATCGTCAAATG GTAAGGCCAGTAGCAAAATTG	540 pb	Soto <i>et al.</i> (2006)
invA-F invA-R	SPI-1	TGCCTACAAGCATGAAATGG AAACTGGACCACGGTACAA	500 pb	Guerra <i>et al.</i> (2000)
ssaQ-F ssaQ-R	SPI-2	GAATAGCGAATGAAGAGCGTCC CATCGTGTTCCTCTGTAGC	677 pb	Soto <i>et al.</i> (2006)
mgtC-F mgtC-R	SPI-3	TGACTATCAATGCTCCAGTGAAT ATTACTGGCCGCTATGCTGTTG	655 pb	Soto <i>et al.</i> (2006)
spi4D-F spi4D-R	SPI-4	GAATAGAAGACAAAGCGATCATC GCTTTGTCCACGCCTTTCATC	1231 pb	Soto <i>et al.</i> (2006)
sopB-F sopB-R	SPI-5	GATGTGATTAATGAAGAAATGCC CTTATCTCAGGCGCGGGTGG	1170pb	Soto <i>et al.</i> (2006)
stn-F stn-R	Enterotoxina	TTAGGTTGATGCTTATGATGGACACCC CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG	617 pb	Guerra <i>et al.</i> (2000)
phoPQ-F phoPQ-R	Regulador Transcricional	ATGCAAAGCCCGACCATGACG GTATCGACCACCACGATGGTT	229 pb	Guerra <i>et al.</i> (2000)
slyA-F slyA-R	Regulador Transcricional	GCCAAAAGCTGAAGCTACAGGTG CGGCAGGTCAGCGTGTCTGTC	700 pb	Guerra <i>et al.</i> (2000)
spvC-F spvC-R	Plasmídeo de virulência	ACTCCTTGACAACCAAATGCGGA TGTCTTCTGCATTCGCCACCATCA	424 pb	Guerra <i>et al.</i> (2000)

#### 4.3.1 – Amplificação do DNA Bacteriano

O gene *spvC* foi detectado através da reação simplex, enquanto para os outros genes foram montados três reações multiplex (*slyA*, *stn*, *invA* e *phoPQ*; *orgA* e *mgtC*; *ssaQ*, *spi4D* e *sopB*) utilizando termociclador (THERMO PX2 ThermalCycler), com as seguintes temperaturas: Desnaturação inicial 94°C-5 min, 30 ciclos de 94°C-1 min, 60°C-1 min, 72°C-2 min e extensão final de 72°C-5 min, segundo Soto et al., 2006.

A preparação do *master MIX* (quadro 5) para cada conjunto de oligonucleotídeos, contendo todos os reagentes foi dividida em alíquotas de 23µL às quais foram adicionadas 2µL de DNA extraído de cada cepa.

**Quadro 5** – Componentes e concentrações para preparo do MIX de PCR.

Componentes	Concentração Final	Função
Tampão 10X	1X	Estabilização do pH da reação
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,5Mm	Co-fator da enzima Taq DNA polimerase
DNTP	0,2Mm	Síntese de DNA
Primers	1.0 µM/20 picomol	Oligonucleotídeo complementar para amplificação
Taq DNA polimerase	0.025 U/µl	Ligação dos oligonucleotídeos à fita molde de DNA
DNA molde	1µg	DNA a ser analisado

#### 4.3.2 – Eletroforese e revelação do Gel

Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de Agarose 1,5% (SIGMA) em tampão TBE 1X (Tris Base 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 20 mM pH8,0 - ROCHE) em 90V por *aproximadamente* 1 hora e 30 minutos. Foi utilizado como referência para o tamanho dos amplicons o marcador de peso molecular 100pb *DNA ladder* (Sigma). Após a migração, os



produtos foram corados por imersão do gel em solução de Brometo de Etídio (10µg/mL) durante 10 minutos, em seguida imersão durante 5 minutos em água destilada e posterior visualização em luz ultravioleta, através do sistema de fotodocumentação Imagem Quant 300 (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA).

## 5 – Resultados

No período de 2015 a 2017 foram identificadas, 10.170 cepas de *Salmonella* spp. no LRNEB/LABENT, das quais 2.495 pertenciam aos sorovares: Enteritidis (102), Infantis (497), Newport (47), Schwarzengrund (441), Typhimurium (1097) e *enterica* O1,4,12 (311). O monitoramento da suscetibilidade antimicrobiana apontou que entre estas, 1073 cepas apresentaram perfil intermediário-I e /ou Resistente-R aos antimicrobianos Cefoxitima (FOX), Ceftazidima (CAZ), Imipenem (IMP) e Ciprofloxacina (CIP). A partir desses resultados, foram selecionadas aleatoriamente 69 cepas das diferentes regiões do Brasil, para a avaliação de genes de virulência das cinco Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella*–SPI, reguladores transcricional e enterotoxina, cuja distribuição por ano e fonte de isolamento encontra-se nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Distribuição das cepas *Salmonella* spp. selecionadas por ano de isolamento.

Sorovar	2015	2016	2017	Total
S. Enteritidis	1	2	3	6
S. Infantis	6	4	4	14
S. Newport	1	2	2	5
S. Schwarzengrund	2	4	1	7
S. Typhimurium	14	9	10	33
S. <i>enterica</i> O1,4,12	0	3	2	4
Total	24	24	21	69

**Tabela 2** – Distribuição de *Salmonella* spp. por fontes de isolamento.

Sorovar	Humana	Alimentar	Animal	Total
S. Enteritidis	5	1	0	6
S. Infantis	3	6	5	14
S. Newport	0	2	3	5
S. Schwarzengrund	2	5	0	7
S. Typhimurium	13	7	13	33
S. <i>enterica</i> O1,4,12	1	2	1	4
Total	24	23	22	69

Através da distribuição por fonte de isolamento, *S. Typhimurium* apareceu como sorovar mais prevalente em todas as fontes de isolamento, seguida por *S. Infantis* em fonte alimentar em 2015 e *S. Enteritidis* com o mesmo número de isolados que a *S. Typhimurium* em fonte humana em 2017 (Tabela 3).

**Tabela 3 – Distribuição de *Salmonella* spp. por fonte de isolamento e ano.**

Sorovar	Humana			Alimentar			Animal		
	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017
<i>S.Enteritidis</i>	1	1	3	0	1	0	0	0	0
<i>S.Infantis</i>	0	1	2	4	1	1	2	2	1
<i>S.Newport</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	1
<i>S.Schwarzengrund</i>	0	2	0	2	2	1	0	0	0
<i>S.Typhimurium</i>	7	3	3	2	2	3	5	4	4
<i>S.enterica</i> O1,4,12	0	0	1	0	2	0	0	1	0

Em uma primeira atividade foi realizada a confirmação perda de resistência previamente existente no Banco de Dados e, foi observada diferença em alguns sorovares conforme mostra a tabela 4. Em *S.Typhimurium* e *S. Infantis* apresentaram diferenças no perfil suscetibilidade a todos os antimicrobianos testados. Os dois isolados de *Salmonella* Schwarzengrund de fonte alimentar apresentaram perdas das suas características de resistência ao Imipenem. Uma cepa de *Salmonella* Newport isolada de fonte animal passou a apresentar um perfil sensível a Ciprofloxacina.

**Tabela 4 – Cepas de *Samonella* spp.com alterações no perfil de suscetibilidade antimicrobiana após a realização de novo TSA para confirmação da resistência.**

Sorovar	N	FOX	FOX*	CAZ	CAZ*	CIP	CIP*	IMP	IMP*
<i>S. Infantis</i>	7	3	1	4	2	6	4	3	1
<i>S. Newport</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>S. Schwarzengrund</i>	2	1	1	1	1	2	2	2	0
<i>S. Typhimurium</i>	7	1	0	3	0	6	5	3	1
Total	17	5	2	8	3	15	13	6	3

FOX-Cefoxitina; CAZ-Ceftazidima ;IMP-Imipenem;CIP-Ciprofloxacina.\* teste confirmatório de perfil obtido previamente

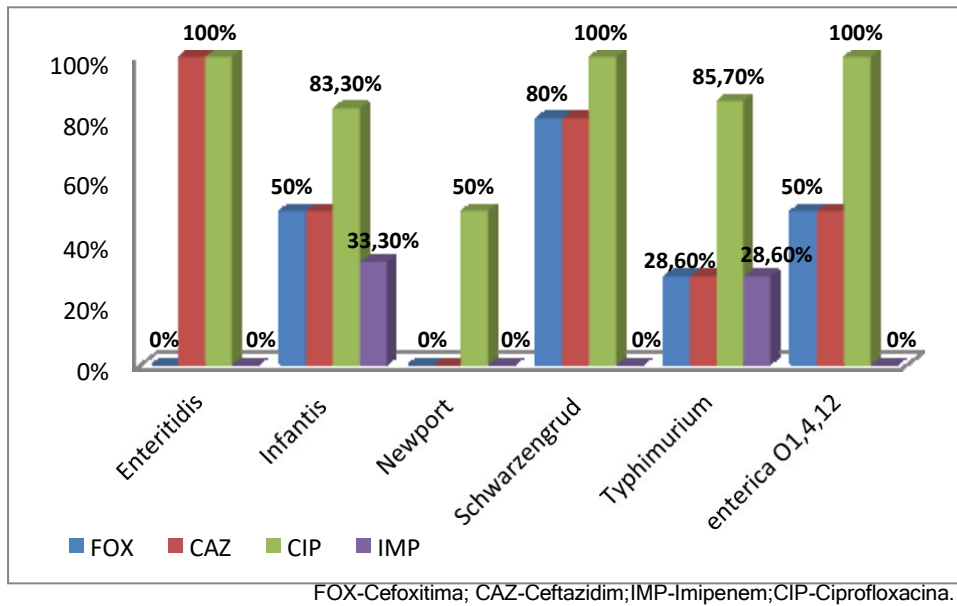
A confirmação da suscetibilidade antimicrobiana, demonstrou que os perfis de resistência/intermediário, foram mais prevalentes nos sorovares Enteritidis, Typhimurium e Infantis. Ciprofloxacina foi a droga antimicrobiana com maior percentual entre as cepas resistentes nos diferentes sorovares estudados, variando de 100% em *S. Enteritidis* a 60% em *S. Newport*. O menor percentual de resistência a Imipenem e Ceftazidima foi para as cepas de *S. Typhimurium*. O menor percentual de resistência a Cefoxitina foi para a *S. Enteritidis* (tabela 5).

**Tabela 5** – Distribuição percentual da resistência em *Salmonella* spp. por sorovar entre os antimicrobianos testados.

Sorovar	N	FOX (N)	CAZ(N)	CIP (N)	IMP (N)
<i>S. Enteritidis</i>	6	16,6(1)	33,3 (2)	100 (6)	83,3 (5)
<i>S. Infantis</i>	14	28,5(4)	35,7(5)	64,3(9)	21,4(3)
<i>S. Newport</i>	5	0(0)	0(0)	60(3)	20(1)
<i>S. Schwarzengrud</i>	7	57,1(4)	57,1(4)	100(7)	0(0)
<i>S. Typhimurium</i>	33	27,2(9)	21,2(7)	93,9(31)	12,1(4)
<i>S. enterica</i> O1,4,12	4	25(1)	25(1)	75(3)	25(1)
Total	69				

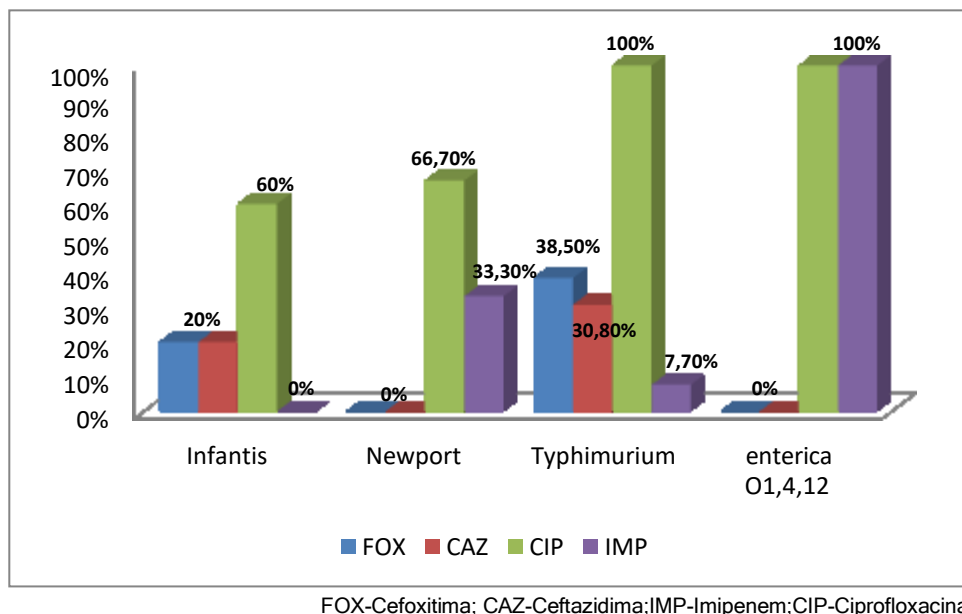
(N)= número total de cepas

Em relação a fonte de isolamento, a resistência a CIP prevaleceu elevada entre as cepas isoladas das três fontes, conforme se pode observar nas figuras 1, 2, 3; Em fonte alimentar, foi possível observar 100% de resistência a CIP e CAZ na *S. Enteritidis*. Já no sorovar Schwarzengrud, observamos 100% de resistência para CIP e 80% FOX e CAZ. (Figura 1)



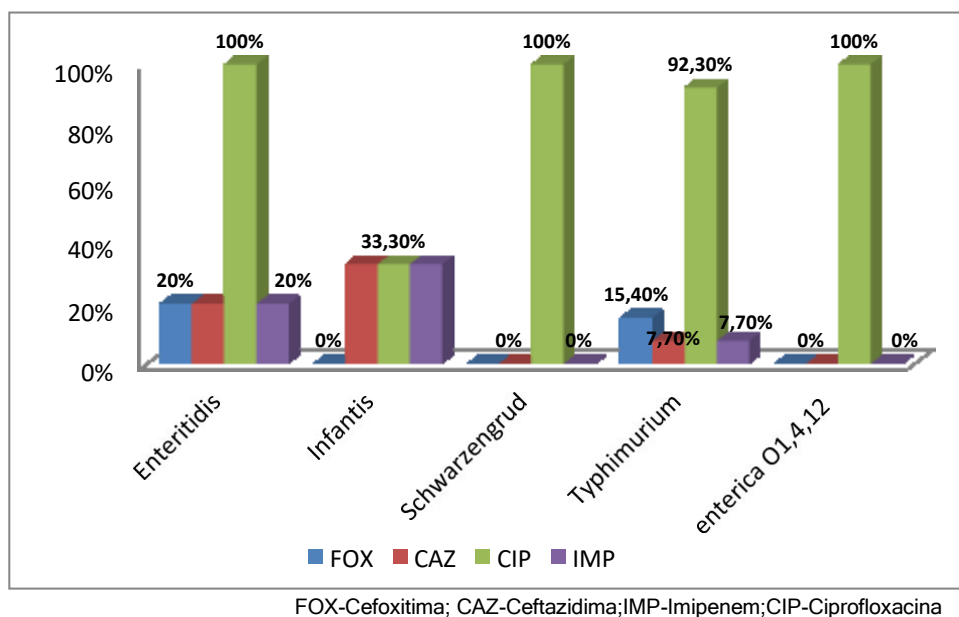
**Figura 1** – Percentual de resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. de fonte alimentar.

Entre as cepas de fonte animal a Ciproflaxocin amostrou prevalência acima de 60 % em todos os sorovares. *S. Newporte* e *S. enterica* O1, 4, 12 não apresentaram perfil de resistência para FOX e CAZ; Já a *S. Infantis* não teve resistência a Imipenem. (Figura 2)



**Figura 2** – Percentual de resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. de fonte animal.

Quanto aos isolados de fonte humana, observou-se altos índices de resistência a CIP, com mais de 90%, com exceção do sorovar *Infantis*, que apresentou 33,3% das cepas resistentes. Por outro lado, *S. Infantis* foi o sorovar com maiores percentuais de resistência a CAZ e ao IMP. Em relação à FOX, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram os únicos a apresentarem percentuais de resistência (figura 3).

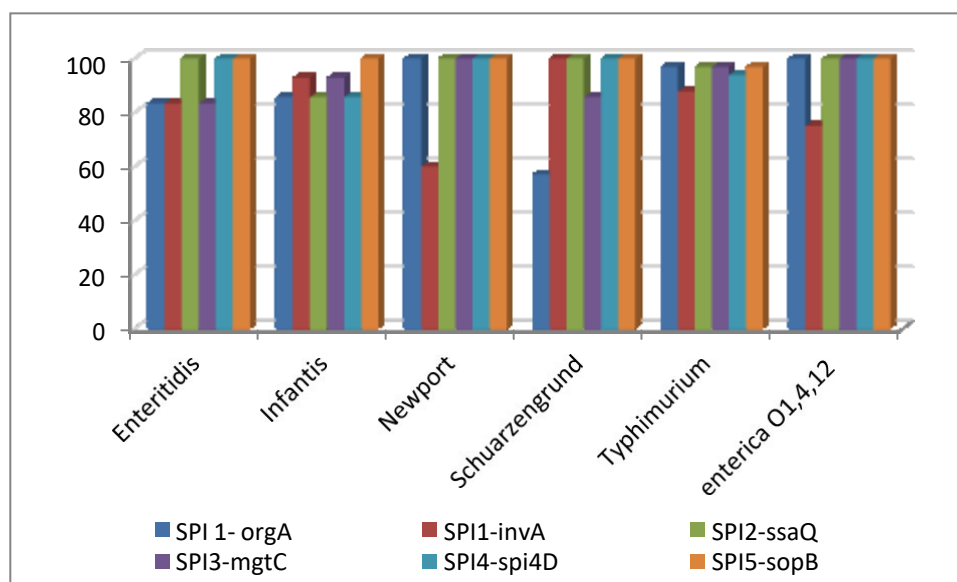


**Figura 3** – Percentual de resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. de fonte humana.

Quanto a avaliação das características de virulência, os genes das SPI foram avaliados nas 69 cepas através da PCR. Foram analisados 10 genes, sendo 9 de localização cromossômica e 1 gene localizado no plasmídeo.

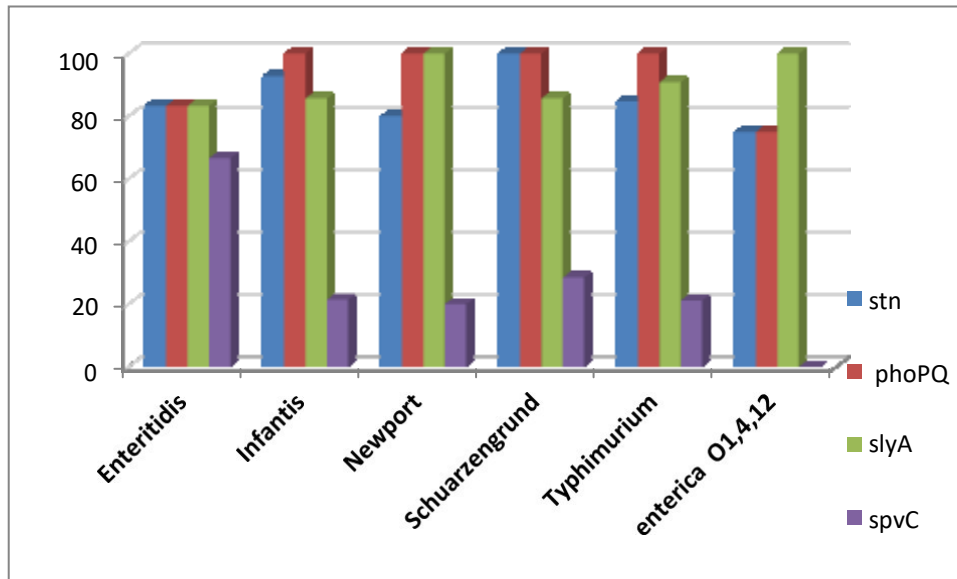
No computo geral a SPI-1 foram observadas 62 positivas para *orgA* e 60 para *invA*. 66 cepas apresentaram amplificação para o gene *ssaQ* localizado na SPI-2. Foram positivas para SPI-3 e SPI-4 65 cepas, para o gene *mgtC* e *spi4D* respectivamente. A SPI-5 *sopB*, testou 69 cepas, uma não apresentou, com 68 cepas positivas, exceto uma *S. Typhimurium* de fonte humana. Já para os reguladores transcricionais tiveram 67 e 62 cepas positivas para os genes *phoPQ* e *slyA* respectivamente. Em relação ao gene *stn* que envolve a enterotoxina foram 61 cepas positivas. Para o plasmídeo *spvC* os resultados obtidos apontaram menor percentual de positividade o qual foi observado em apenas 17 cepas.

Ao avaliar no geral os sorovares pelas 5 ilhas de patogenicidades, observou-se que todas as cepas tiveram > de 50% de amplificação para os genes nos 5 sorovares de *Salmonella* spp., ressaltando os sorovares: Enteritidis, Infantis, Typhimurium, foram os sorovares que apresentaram mais de 80% de amplificação para as cinco SPI. Destacamos os resultados obtidos quanto a amplificação observada para o gene *sopB* no qual foi obtida > 98% de amplificação nas *Salmonella* spp. (Figura 4).



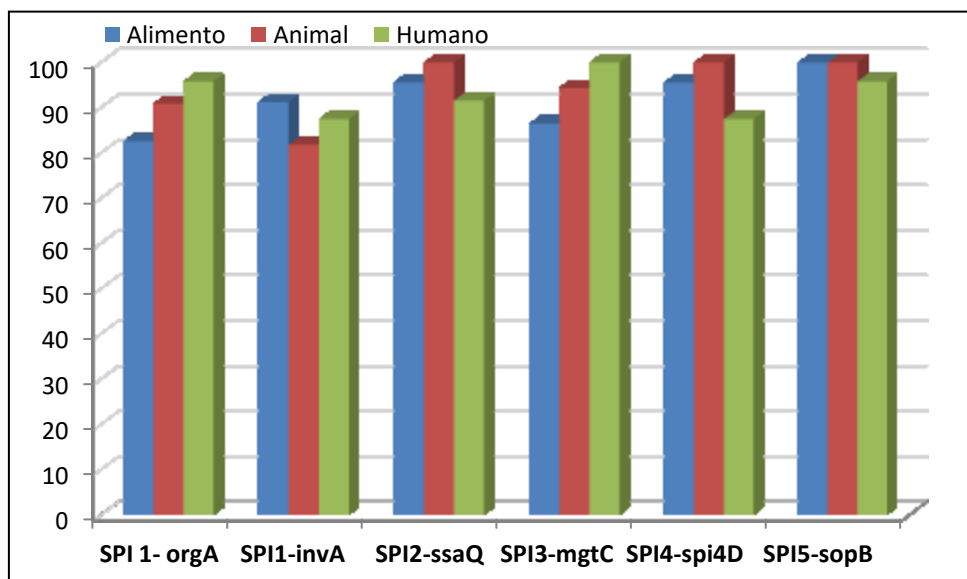
**Figura 4** – Pesquisa de genes de virulência de SPI-1 a 5 em *Salmonella* spp. por sorovar.

Ao pesquisar genes que não residem em SPI, que codificam um regulador transcricional de genes de virulência necessários para sobrevivência no macrófago, e gene que esta relacionado a ilha plasmídia (*spvC*), observou-se que a *Salmonella* Enteritidis foi a que teve maior amplificações para os genes com mas de 60% de cepas positivas. Todos os demais sorovares apresentaram amplificações para os genes *stn*, *phoPQ*, *slyA* e *spvC*, exceto *Salmonella* entérica O1,4,12 para o gene que esta relacionado ao plasmídeo o *spvC*, no qual não houve nenhuma amplificação(Figura 5).



**Figura 5** – Reação em cadeia polimerase nos genes *stn*, *phoPQ*, *slyA* e *spvC* em *Salmonella* spp.

A partir da análise de acordo com a fonte de isolamento, observa-se que houve amplificação de genes das cinco ilhas de patogenicidade de *Salmonella* em 80% das cepas independentes da fonte, com destaque para o gene *sopB* de SPI-5 o gene *sopB* (Figura 6).

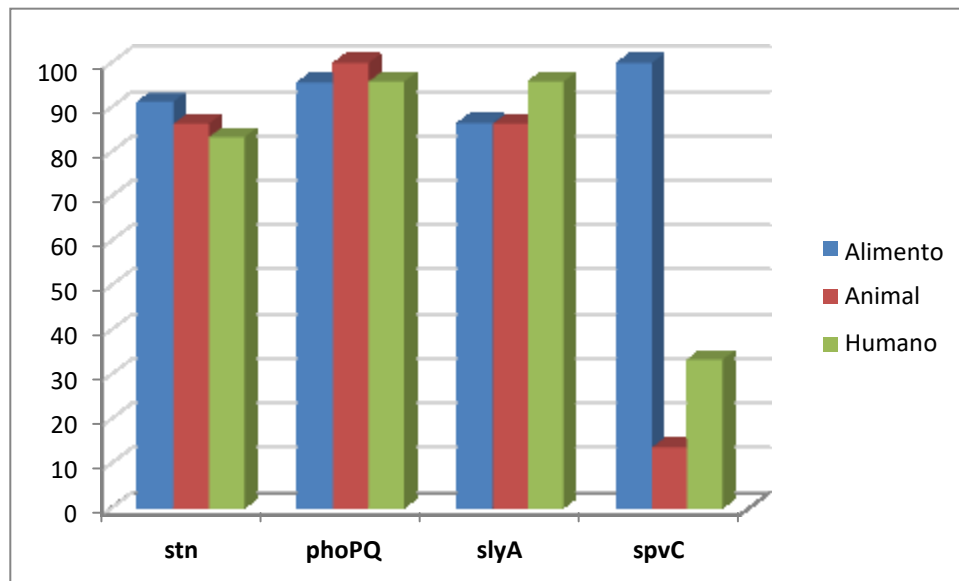


**Figura 6** – Reação em cadeia polimerase de *Salmonella* spp. nas cinco Ilhas de Patogenicidade por fonte de isolamento.



Os genes que estão envolvidos nas regulações transcricionais (*phoPQ*, *slyA*) na produção da enterotoxina (*stn*) obtiveram-se amplificação destes em 80% das cepas independentes da fonte.

Para o Plasmídeo de virulência (*spvC*), foi observada amplificação em cerca de 90% das cepas de fonte alimentar em relação as isoladas das outras fontes (figura 7).



**Figura 7** – Reação em cadeia polimerase nos genes *stn*, *phoPQ*, *slyA* e *spvC* nas fontes de isolamento em *Salmonella* spp.

Na Avaliação dos resultados obtidos na PCR de acordo com as ilhas de patogenicidade e as fonte de Isolamento, que em SPI1, relacionada aos genes *orgA* e *invA*, apenas *S. Typhimurium* e a *enterica* 01,4,12 isoladas de fonte alimentar apresentaram produtos de amplificação para os dois genes.

Em fonte animal, 100% das cepas de *S. enterica* 01, 4, 12 apresentaram produtos para os dois genes e 100% de *S. Newport* apresentaram produto para *orgA*.

Entre as cepas de origem humana, 100% de *Enteritidis* e *Infantis* apresentaram produtos de amplificação para os dois genes e 100% de *S. Typhimurium* para o gene *orgA* (Tabela 6).

**Tabela 6 –** Cepas de *Salmonella* spp. positivas para os genes *orgA* e *invA* da SPI-1 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento.

Sorovar	Alimentar			Animal			Humana		
	Nº	<i>orgA</i>	<i>invA</i>	Nº	<i>orgA</i>	<i>invA</i>	Nº	<i>orgA</i>	<i>invA</i>
<b>Enteritidis</b>	1	0 (0)	0 (0)	-	-	-	5	100 (5)	100 (5)
<b>Infantis</b>	6	83,3 (5)	100 (6)	5	80 (4)	80 (4)	3	100 (3)	100 (3)
<b>Newport</b>	2	100 (2)	50 (1)	3	100 (3)	66,6 (2)	-	-	-
<b>Schwarzengrund</b>	5	60 (3)	100 (5)	-	-	-	2	50 (1)	100 (2)
<b>Typhimurium</b>	7	100 (7)	100 (7)	13	92,3 (12)	84,6 (11)	13	100 (13)	84,6 (11)
<b>enterica O1,4,12</b>	2	100 (2)	100 (2)	1	100 (1)	100 (1)	1	100 (1)	0(0)
<b>Total</b>	23			22			24		

(N)= número total de cepas

Na SPI 2, o gene *ssaQ* foi amplificado para todos os sorovares da fonte animal. Já a fonte alimentar houve mais de 85,7 % de amplificação para todos os sorovares. A Fonte Humana destaque-se a *S. Infantis* com apenas 33,3% de amplificação para o gene *ssaQ* (Tabela 7)

**Tabela 7 –** Cepas de *Salmonella* spp. positivas para o gene *ssaQ* da SPI-2 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento.

Sorovar	Alimento		Animal		Humana	
	Nº	<i>ssaQ</i>	Nº	<i>ssaQ</i>	Nº	<i>ssaQ</i>
<b>Enteritidis</b>	1	100 (1)	-	-	5	100 (5)
<b>Infantis</b>	6	100 (6)	5	100 (5)	3	33,3 (1)
<b>Newport</b>	2	100 (2)	3	100 (3)	-	-
<b>Schwarzengrund</b>	5	100 (5)	-	-	2	100 (2)
<b>Typhimurium</b>	7	85,7 (6)	13	100 (13)	13	100 (13)
<b>enterica O1, 4, 12</b>	2	100 (2)	1	100 (1)	1	100 (1)
<b>Total</b>	23		22		24	

(N)= número total de cepas

Na SPI 3 todas as cepas da fonte humana foram positivas para o gene *mgtC*. A fonte alimentar, não observou amplificação no sorovar *Enteritidis*. Na fonte animal, ocorreram mais de 92,3% de amplificação para o gene *mgtC* (Tabela 8).

**Tabela 8** – Cepas de *Salmonella* spp. positivas para o gene *mgtC* da SPI-3 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento.

Sorovar	Alimento		Animal		Humana	
	Nº	<i>mgtC</i>	Nº	<i>mgtC</i>	Nº	<i>mgtC</i>
<b>Enteritidis</b>	1	0 (0)	-	-	5	100 (5)
<b>Infantis</b>	6	83,3 (5)	5	100 (5)	3	100 (3)
<b>Newport</b>	2	100 (2)	3	100 (3)	-	-
<b>Schwarzengrund</b>	5	80 (4)	-	-	2	100 (2)
<b>Typhimurium</b>	7	100 (7)	13	92,3 (12)	13	100 (13)
<b>enterica O1, 4, 12</b>	2	100 (2)	1	100 (1)	1	100 (1)
<b>Total</b>	23		22		24	

(N)= número total de cepas

Na SPI 4 a fonte animal apontou amplificação de 100% para todas as cepas avaliadas. Já a fonte alimentar, o sorovar Typhimurium amplificou 85,7% para o gene *spi4D*. Na fonte humana, somente 33,3% da *S. Infantis* houve amplificação para gene *spi4D*. (tabela 9).

**Tabela 9** – Cepas de *Salmonella* spp. positivas para o gene *spi4D* da SPI-4 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento.

Sorovar	Alimento		Animal		Humana	
	Nº	<i>spi4D</i>	Nº	<i>spi4D</i>	Nº	<i>spi4D</i>
<b>Enteritidis</b>	1	100 (1)	-	-	5	100 (5)
<b>Infantis</b>	6	100 (6)	5	100 (5)	3	33,3 (1)
<b>Newport</b>	2	100 (2)	3	100 (3)	-	-
<b>Schwarzengrund</b>	5	100 (5)	-	-	2	100 (2)
<b>Typhimurium</b>	7	85,7 (6)	13	100 (13)	13	92,3 (12)
<b>Enterica O1, 4, 12</b>	2	100 (2)	1	100 (1)	1	100 (1)
<b>Total</b>	23		22		24	

(N)= número total de cepas

A SPI5 foi a ilha onde ocorreu maior amplificação para as cepas avaliadas onde as fontes de isolamento alimentar e animal tiveram amplificação de 100% para o gene *sopB*. Já entre as cepas de fonte a humana, todas

tiveram amplificação de 100%, exceto o sorovar Typhimurium com 92,3% de amplificação para o gene *sopB* (Tabela 10).

**Tabela 10** – Cepas de *Salmonella* spp. positivas para o gene *sopB* da SPI-5 distribuídas por sorovar e fonte de isolamento.

Sorovar	Alimento		Animal		Humana	
	Nº	<i>sopB</i>	Nº	<i>sopB</i>	Nº	<i>sopB</i>
<b>Enteritidis-</b>	1	100 (1)	-	-	5	100 (5)
<b>Infantis</b>	6	100 (6)	5	100 (5)	3	100 (3)
<b>Newport</b>	2	100 (2)	3	100 (3)	-	-
<b>Schwarzengrund</b>	5	100 (5)	-	-	2	100 (2)
<b>Typhimurium</b>	7	100 (7)	13	100 (13)	13	92,3 (12)
<b>enterica O1 ,4, 12</b>	2	100 (2)	1	100 (1)	1	100 (1)
<b>Total</b>	23		22		24	

(N)= número total de cepas

Para os genes que estão relacionados à regulação transcricional, *phoPQ* não houve amplificação em cepa da *Salmonella enterica* O1,4,12 da fonte humana, enquanto para as demais fontes e sorovares, houve amplificação de 100%. Não houve amplificação para os genes *phoPQ* e *slyA* para *S. Enteritidis* da fonte Alimentar (Tabela 11)

**Tabela 11-** Cepas de *Salmonella* spp. positivas para os genes *phoPQ* e *slyA* reguladores transcricionais distribuídas por sorovar e fonte de isolamento.

Sorovar	Alimentar			Animal			Humana		
		<i>phoPQ</i>	<i>slyA</i>	Nº	<i>phoPQ</i>	<i>slyA</i>	Nº	<i>phoPQ</i>	<i>slyA</i>
<b>Enteritidis</b>	1	0 (0)	0 (0)	-	-	-	5	100 (5)	100 (5)
<b>Infantis</b>	6	100 (6)	83,3 (5)	5	100 (5)	80 (4)	3	100 (3)	100 (3)
<b>Newport</b>	2	100 (2)	100 (2)	3	100 (3)	100 (3)	-	-	-
<b>Schwarzengrund</b>	5	100 (5)	80 (4)	-	-	-	2	100 (2)	100 (2)
<b>Typhimurium</b>	7	100 (7)	100 (7)	13	100 (13)	84,6 (11)	13	100 (13)	92,3 (12)
<b>enterica O1, 4, 12</b>	2	100 (2)	100 (2)	1	100 (1)	100 (1)	1	0 (0)	100 (1)
<b>Total</b>	23			22			24		

(N)= número total de cepas

No gene *stn* de enterotoxina, não foi observado na fonte alimentar amplificação para o S. Enteritidis. Na fonte animal houve amplificação para mais de 80% dos sorovares. Na fonte humana, não houve amplificação para sorovar *enterica* O1,4,12 (Tabela 12).

**Tabela 12 – Cepas de *Salmonella* spp. positivas para o gene *snt* distribuída por sorovar e fonte de isolamento**

Sorovar	Alimento		Animal		Humana	
	Nº	<i>stn</i>	Nº	<i>stn</i>	Nº	<i>stn</i>
<b>Enteritidis-</b>	1	0 (0)	-	-	5	100 (5)
<b>Infantis</b>	6	100 (6)	5	80 (4)	3	100 (3)
<b>Newport</b>	2	50 (1)	3	100 (3)	-	-
<b>Schwarzengrund</b>	5	100 (5)	-	-	2	100 (2)
<b>Typhimurium</b>	7	100 (7)	13	84,6 (11)	13	76,9 (10)
<b><i>enterica</i> O1, 4, 12</b>	2	100 (2)	1	100 (1)	1	0 (0)
<b>Total</b>	23		22		24	

(N)= número total de cepas

Na ilha plasmidial, no geral o gene *spvC*, mostrou baixas amplificações para os sorovares, independente da fonte de isolamento, como pode ser observado na tabela 13. A *Salmonella enterica* O1,4,12 sem amplificação para nenhuma das fontes de isolamento. A S. Enteritidis amplificação de 100% na fonte alimentar e 60% na fonte humana . (Tabela 13)

**Tabela 13 – Cepas de *Salmonella* spp. positivas para o gene *spvC* da ilha plasmidial**

Sorovar	Alimento		Animal		Humana	
	Nº	<i>spvC</i>	Nº	<i>spvC</i>	Nº	<i>spvC</i>
<b>Enteritidis-</b>	1	100 (1)	-	-	5	60 (3)
<b>Infantis</b>	6	33,3 (2)	5	20(1)	3	0 (0)
<b>Newport</b>	2	0 (0)	3	33,3(1)	-	-
<b>Schwarzengrund</b>	5	40 (2)	-	-	2	0 (0)
<b>Typhimurium</b>	7	14,2 (1)	13	7,6 (1)	13	38,4 (5)
<b><i>enterica</i> O1, 4, 12</b>	2	0 (0)	1	0	1	0 (0)
<b>Total</b>	23		22		24	

(N)= número total de cepas

**Tabela 14 –** Relação entre genes de virulência, reguladores transcricionais, plasmídeo de virulência e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana em *Salmonella* spp.

Nº da Cepa	fonte	sorovar	Genes de virulência										Perfil de suscetibilidade antimicrobiana
			orgA	invEA	slyA	ssaQ	mgtC	phoPQ	stn	spi4D	sopB	spvC	
673	AL	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT, IMP
1538	AL	Schwarzengrund	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, TCY, FOX, CAZ, NAL, CIP
2280	AL	Infantis	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, STR, CIP
2432	AL	Infantis	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, TCY, FOX, CAZ, STR, NAL, NIT, CIP, IMP
2453	AL	Infantis	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, CHL, TCY, FOX, CAZ, STR, NAL, CIP
2960	AL	Schwarzengrund	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, TCY, CAZ, NAL, CIP
4963	AL	Infantis	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, TCY, FOX, CAZ, NAL, CIP
6445	AL	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, TCY, FOX, CAZ, CIP, NAL, CIP
1147	AL	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, TCY, FOX, CAZ, NAL, CIP
1335	AL	enterica sub. 01, 4, 12	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, CIP, GEN, NAL, SXT
2493	AL	Schwarzengrund	N	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, TCY, FOX, CAZ, NAL, NIT, CIP
2724	AL	enterica sub. 01, 4, 12	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, TCY, FOX, CAZ, NAL, CIP
4502	AL	Enteritidis	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P	CAZ, NAL, NIT, CIP
5734	AL	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	FOX, STR, NAL, NIT, CIP
377	AL	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT, NIT
980	AL	Schwarzengrund	P	P	N	P	N	P	P	P	P	N	AMP, TCY, FOX, CAZ, NAL, CIP
2651	AL	Typhimurium	P	P	P	N	P	P	P	N	P	N	AMP, CHL, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT
7	AN	Newport	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	GEN, SXT, NIT, CIP
2385	AN	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, CHL, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT
2406	AN	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT, NIT
3003	AN	Infantis	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, TCY, FOX, NAL
6906	AN	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	TCY, FOX, CAZ, NAL, NIT, CIP
6914	AN	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	NAL, CAZ, CIP
6922	AN	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	TCY, FOX, CAZ, NAL, NIT, CIP, IMP
7007	AN	Infantis	P	N	N	P	P	P	N	P	P	N	GEN, IMP, NIT, CIP
136	AN	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, TCY, FOX, NAL, CAZ, CIP
991	AN	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT
7086	AN	Typhimurium	P	P	N	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, CIP, GEN, NAL
7698	AN	Typhimurium	N	P	P	P	N	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT
956	AN	Infantis	N	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, FOX, CAZ, STR, NAL, CIP
958	AN	Typhimurium	P	P	N	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT

(Continua)

**Tabela 14 –** Relação entre genes de virulência, reguladores transcricionais, plasmídeo de virulência e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana em *Salmonella* spp (Continuação).

Nº da Cepa	fonte	sorovar	Genes de virulência										Perfil de suscetibilidade antimicrobiana	
			orgA	invEA	slyA	ssaQ	mgtC	phoPQ	stn	spi4D	sopB	spvC		
1603	AN	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, FOX, STR, CIP, GEN, NAL, SXT
2371	AN	Typhimurium	P	N	P	P	P	P	N	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, STR, GEN, NAL, SXT, NIT, CIP
2392	AN	Typhimurium	P	N	P	P	P	P	N	P	P	P	N	AMP, TCY, STR, GEN, NAL, SXT, NIT, CIP
1328	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	TCY, NAL, NIT, CIP
2359	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, TCY, FOX, CIP
4655	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, TCY, STR, GEN, NAL, CIP, IMP
5306	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT, NIT
5478	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	STR, CIP, NIT
6233	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, TCY, STR, CIP, GEN, NAL, SXT
6966	HU	Typhimurium	P	N	N	P	P	P	N	P	P	P	N	AMP, CHL, FOX, CAZ, STR, NAL, CIP
757	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, STR, CIP, NAL
5528	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, FOX, STR, CIP, GEN, NAL, SXT, NIT
6459	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, CHL, TCY, STR, GEN, NAL, CIP
6612	HU	Schwarzengrund	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	TCY, STR, NAL, CIP
6749	HU	Enteritidis	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	CAZ, CIP, IMP
7023	HU	Infantis	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	AMP, TCY, CAZ, STR, NAL, SXT, NIT, CIP
7492	HU	Schwarzengrund	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	NAL, NIT, CIP
935	HU	Enteritidis	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	CIP, NAL, NIT
3247	HU	Enteritidis	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	NAL, NIT, CIP
4044	HU	Enteritidis	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	NAL, NIT, CIP
4090	HU	Typhimurium	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	AMP, CHL, TCY, STR, CIP, NAL, NIT

AL=Alimento; AN=Animal; HU= Humano; P=POSITIVO; N=Negativo; AMP=Ampicilina; CHL=Cloranfenicol; TCY=Tetraciclina; CAZ=Ceftazidima; FOX=Cefoxitina; CIP=Ciprofloxacina; IMP=Imipenem; SXT=Sulfametaxazol-Trimetopim; GEN=Gentamicina; NIT=Nitrofurantoína;STR=Estreptomicina; NAL= Ácido Nalidíxico

## 6 – Discussão

Salmonelose é classificada como uma doença de origem alimentar e zoonótica, sendo assim humanos podem adquirir a infecção a partir de uma variedade de fontes e vias de transmissão, tornando um problema na saúde pública (Pires *et al.*, 2012).

Segundo o CDC, é estimado que os Estados Unidos, tem cerca de 1,35 milhões de infecções ocasionadas por *Salmonella* a cada ano, com 26,500 hospitalizados e 420 mortes (CDC, 2019). Relatórios de vigilância do FoodNet (2016), relataram que nos anos de 2006, 2011 e 2016 os sorovares Enteritidis, Newport e Typhimurium estiveram no ranking entre os 3 primeiros sorovares de origem humana (CDC, 2016). Na União Europeia a prevalência foi dos sorovares *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Infantis e Newport (EFSA, 2018).

Os sorovares Enteritidis e Typhimurium são conhecidos por sua relevância epidemiológica e podem ser transmitidos por alimentos de origem animal, como carne bovina, suína, aves e ovos contaminados (Sakugawa *et al.*, 2008; Gal-Mor *et al.*, 2014; WHO, 2015).

Estudos mostram que nos países como Estados Unidos, Dinamarca e Tailândia, *Salmonella* Schwarzengrund é um dos sorovares responsáveis por infecções em humanos e aves, enquanto na China, esse mesmo sorovar não é muito frequente. (Aarestrup *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013).

*Salmonella* Infantis é responsável por doenças humanas e apresentou a quarta posição entre os sorovares de maior frequência como agentes causadores de Salmonelose na Europa entre 2006 a 2016, além de ser frequentemente isolados em aves. (EFSA e CDPC, 2018; Marder, *et al.*, 2018; EFSA., 2019).

Nas ultimas décadas a *Salmonella* Newport vem sendo associada casos de gastroenterites humana nos Estados Unidos e na Europa (Sangal *et al.*, 2010 e Nuccio *et al.*, 2014).

Entre as cinco fontes de isolamentos classificadas pelo LRNEB/LABENT, sendo elas: humanos, animal, materia prima, alimentar, foram selecionadas 24 cepas de origem humana e 22 cepas de origem animal, já que as fontes humanos e animais são os principais fontes responsáveis pela



circulação de *Salmonella* spp, contribuindo para ocorrência de casos de surtos aleatoriamente (Carvajal-Restrepo *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2010) e também 22 cepas de origem alimentar, já fonte alimentar tem um maior impacto na saúde pública (Corbellini *et al.*, 2016; Im *et al.*, 2016).

O uso excessivo e o abuso generalizado de antimicrobianos na produção animal de alimentos e medicina humana têm contribuído para o aumento da incidência de resistência antimicrobiana, particularmente MDR (Arslan e Eyi., 2010). A resistência antimicrobiana é reconhecida como um dos maiores desafios da saúde pública mundial no século XXI (Doménech *et al.*, 2015). Notavelmente, de acordo com os dados disponíveis, a China teve a maior taxa de crescimento mundial da resistência antimicrobiana de patógenos (Ren *et al.*, 2016). Com o uso generalizado de antimicrobianos na produção pecuária, isolados resistentes de *Salmonella* podem se espalhar rapidamente para a população humana pelo consumo de produtos de carne contaminada (Zhu *et al.*, 2019). A intensidade da resistência varia globalmente, mas a taxa de resistência está em ascensão (Ifeanyichukwu *et al.*, 2017; Mağa *et al.*, 2015; Velasquez *et al.*, 2018).

O perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. pode ser dinâmico, isso significa que o perfil detectado alguns anos atrás, pode não ser o mesmo do isolado, obtido em tempos atuais. Podemos sugerir que as alterações no perfil de suscetibilidade antimicrobiana após a realização de novo TSA como mostra a tabela 4, pode estar relacionada a “conjugação”, e transferência de plasmídeo. Foi observado um resultado semelhante em relação a confirmação do teste de sustentabilidade segundo o trabalho de Tsai e Hsiangs ( 2005) que encontrou perfil sensível a ciprofoxacina nas cepas de *Salmonella* spp. isoladas na cidade de Tawain em 2001 em relação a cepas antigas.

Foram selecionados quatro antimicrobianos para a confirmação do perfil de resistência, escolha esta que se deu devido à significância clínica. Entre estes, as fluoroquinolonas constituem a classe de antimicrobianos mais prescritos no mundo, além de ser utilizada tanto na medicina humana, para tratar de infecções graves, como na medicina veterinária (FAO/WHO/OIE, 2008; Morgan- Linnell *et al.*, 2009, OMS, 2017).

No que diz a respeito à resistência antimicrobiana por fonte de isolamento alimentar, animal e humana, a confirmação do perfil de resistência foi elevado. Assim como na literatura, acredita-se que a utilização indiscriminada de antimicrobianos tanto para tratamento de doença humana, como na medicina veterinária, e também a utilização para melhorar dos índices zootécnicos de animais de produção, acaba contribuindo para o surgimento de bactérias multirresistentes em todo o mundo. Existem indícios que ao uso indiscriminado em animais de produção pode transmitir resistência antimicrobiana aos seres humanos através de seus produtos e derivados. (Hur *et al.*, 2012).

Entre os antimicrobianos selecionados, a resistência a ciprofloxacina foi que confirmou maior percentual, principalmente para sorovares que estão diretamente relacionados a fonte humana, pois a ciprofloxacina é utilizado principalmente em tratamento humano. Tais resultados corroboram com alguns trabalhos na literatura, como Aljindan (2020) entre os anos de 2011 a 2018 observou um aumento de 50% de resistência a Ciprofloxacina em *Salmonella* spp. em isolados humanos de diferente nacionalidade, além do aumento significativo de resistência a cefoxitina condizente aos resultados por nos detectados.

A disseminação de isolados MDR vem sendo apontado na literatura como potencialmente grave: 60,7% na Coreia (Seo *et al.*, 2019), 88,1% no sul da China (Chen *et al.*, 2020) e 100% no Egito (Sallam *et al.*, 2014).

O alto nível de resistência antimicrobiana estava diretamente relacionado ao uso de antimicrobianos de baixo custo e de amplo espectro no criação de gado e aves, resultando em um número crescente de bactérias resistentes aos antimicrobianos e MDR. A disseminação de bactérias MDR de animais para humanos ameaça a saúde humana em todo o mundo e pode resultar na ineficácia para o tratamento de algumas doenças. Assim, é necessário fortalecer o monitoramento das tendências do espectro de resistência de *Salmonella* para o controle de isolados MDR.

É interessante relatar a investigação conduzida por Li (2020), o qual avaliando um possível risco de infecções humanas transmitidas por alimentos associadas ao consumo de ovos contaminados por *Salmonella* Enteritidis, Infantis e Typhimurium, não encontrado nenhuma resistência a ciprofloxacina,

do mesmo modo que para a ceftazidime e imipenem. Distinto do que observamos, onde a nestes três sorovares isolados de humanos, encontramos cepas resistente a Ceftazidima e Imipem.

O possível uso excessivo dos antimicrobianos em diversos setores seja ele na área humana, animal ou alimentar, vem contribuindo para o aumento de resistência em cepas de *Salmonella* spp de diferentes fontes, o que torna um problema na saúde pública, devido a redução de alternativas terapêuticas em casos de infecções humanas (Aerestrup *et al.*, 2008; O'Neill J, 2016).

A patogenicidade da *Salmonella* é mediada pela interação de numerosos genes de virulência, localizados nas SPI, plasmídeos, lipopolissacarídeos e enterotoxinas (Farahani *et al.*, 2018). SPI são grupos de genes de virulência em cromossomos contendo a maioria dos genes de virulência de *Salmonella* (Chaudhary *et al.*, 2015). Até o momento, 23 SPI foram identificados em *Salmonella*, da qual SPI-1 a SPI-5 foram bem estudados (Bem Salem *et al.*, 2017). Além disso, genes de virulência transmitidos por plasmídeo, como como *spvB* e *spvC*, foram relatados para promover a sobrevivência e crescimento de *Salmonella* em células hospedeiras, agravando a gravidade da enterite (Oueslati *et al.*, 2016). Embora existam poucos estudos sobre a prevalência, dos genes de virulência carregados por *Salmonella*, a China tem uma elevada incidência de salmonelose, a partir do consumo de alimentos origem animal, reconhecidos como as principais fontes de disseminação da *Salmonella*, especialmente frango, porco e pato (Yang *et al.*, 2019).

Em *Salmonella enterica* SPI1 a SP5 são consideradas as ilhas mais importantes que afetam todo o processo da salmonelose incluindo a sua invasão, proliferação e as respostas ao hospedeiro. (Lou *et al.*, 2019).

No cômputo geral genes contidos as ilhas de patogenicidade SPI5, SPI2, SPI3, SPI4, e a SPI1, foram os genes mais detectados. SP5 é necessária para a enteropatogenicidade, enquanto SPI2 é considerada a ilha mas importante para virulência, por possuir os genes considerado necessários para a sobrevivência em macrófagos. O SPI3 desempenha o papel na sobrevivência no interior do macrófago e a SPI4 é responsável na adesão as células epiteliais (Ilyas *et al.*, 2017 ; Gao, Wang e Ogunremi *et al.*, 2019) SPI5 são co-

reguladores dos genes SPI 1 ou SPI2, sendo ele um sistema duplamente controlado.

Foram detectadas ampliações dos genes localizados nas cinco ilhas de patogenicidade em *Salmonella* em mais de 60% das cepas analisadas, equivalente ao estudo Espinoza (2017), que considera esperada a detecção das 5 ilhas de patogenicidade, pois são comuns em todas as *Salmonella enterica*. Em trabalho de Andesfh (2019), foi observada 100% amplificação para as 5 ilhas estudadas sendo detectados os genes *invA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4D* e *pipA*.

Todas as cepas do sorovar Infantis e 85% do sorovar Typhimurium foram positivas para o gene *invA*. Esses resultados foram semelhantes ao encontrado por Faganello (2018), que reportou 100% das cepas de origem animal nos sorovares Infantis, Typhimurium, Enteritidis e Schwarzengrund, positivas para o gene *invA*.

Não foi detectado o *invA* na cepa de *Salmonella* Enteritidis de origem alimentar avaliada neste estudo, divergente dos resultados encontrados por Hur, Jawale e Lee (2012) em que 93% das cepas analisadas de isolados de frango de corte na Coreia foram positivas.

Todos os isolados de *Salmonella* Typhimurium de origem alimentar apresentaram o gene *invA* corroborando com o trabalho de Osman (2014), que detectou 100% de cepas positivas para o gene *invA*.

Todas as *S. Infantis* na fonte alimentar e humana, foram positivas para os genes *invA* e *sopB*, constataram no trabalho de Almeida (2013), onde de 35 cepas de *S. Infantis* isolados de fonte humana e alimentar constataram que todas as cepas carregavam os genes *invA* e *sopB*.

No sorovar Typhimurium para o gene *mgtC* todas as cepas de origem alimentar foram positivas, divergindo dos resultados de Osman (2014), que não observou positividade para este gene em nenhuma das cepas de *S. Typhimurium* avaliadas em seu estudo.

Já em relação os genes *spi4D* e *ssaQ*, 85,7% dos isolados de *S. Typhimurium* de origem alimentar foram positivas. No trabalho de Osman (2014), somente 25% das cepas foram positivas para esses dois genes.

O sorovar Enteritidis desta mesma fonte, teve amplificação para o gene *spi4D*, o que confere com um estudo de Xia (2020), onde as cepas de

S.Enteritidis isoladas de cobras comestíveis, apresentaram ampliações para este gene.

Todas as cepas da fonte animal foram positivas para o gene *sopB*. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Faganello (2018), que relatou 100% de positividade para as cepas dos sorovares Infantis e Typhimurium.

Todos os sorovares *Salmonella* de fonte alimentar apresentaram 100% de positividade para o gene *sopB*. Semelhante ao trabalho de Osman (2014), que confirmou que as 4 cepas de S.Typhimurium de origem alimentar foram positivas para o gene *sopB*. Já o relato de Hur (2017), apontou que 93% das cepas analisadas, de isolados de frango, para o sorovar Enteritidis foram positivas para o gene.

A região *spv* parece promover rápido crescimento e sobrevivência da *Salmonella* dentro das células do hospedeiro, sendo importante para a infecção sistêmica em animais experimentais (Soto *et al.*, 2006). Neste estudo a amplificação do gene *spvC* foi reduzida (24%) em todas as fontes de isolamento avaliadas. Tais resultados apresentam semelhança com o trabalho de Martins (2010), onde suas cepas de S.Typhimurium de origem animal foram todas negativas. Gulig (1990), assegura através de suas observações que o plasmídeo de virulência causa infecção sistêmica progressiva dos órgãos reticuloendoteliais em animais experimentais.

No entanto os plasmídeos não afetam a capacidade de *Salmonella* spp. causar infecção intestinal e danos no hospedeiro, visto que em cepas de origem humana, 70% dos isolados foram negativos para esse gene. Swamy (1996), sugeriram que o *spvC* pode não desempenhar um papel crucial para gastroenterite típica causada por *Salmonella* em humanos, sendo 85% dos seus isolados negativos para este gene. Por outro lado três cepas negativas (1,8%) para o gene *spvC* foram relatadas por Soto (2006) enquanto Castilla (2006), relataram a ausência do gene em 7,2% das cepas que analisaram. Heithoff (2008), comparando S. Typhimurium isoladas de animais e de doença humana, verificaram que 34% das cepas provenientes de indivíduos com gastroenterite eram destituídas do plasmídeo. Assim, a relevância do plasmídeo de virulência para o desencadeamento da doença humana é questionável,

diante da considerável redundância de fatores de virulência codificados no genoma do micro-organismo.

## 7 – Conclusão

Foi possível observar uma variação entre os genes pertencentes às cinco ilhas de patogenicidade de *Salmonella* nas cepas isoladas de diferentes fontes e apresentando perfil de resistência antimicrobiana;

Todas as cepas de *Salmonella* spp. selecionadas entre os anos 2015 a 2017, confirmaram seu perfil de suscetibilidade pelo teste de difusão em discos nas drogas avaliadas;

Das 69 cepas avaliadas confirmaram que 60% tem o perfil reistentência para ciprofloxacina, 21,2% Ceftazidima, 16,6% Cefoxitina, e 12,1% para Imipenem;

Foi possível caracterizar os genes em SPI1 em 50% para *orgA*, em 60% para *invA*; SPI2 em 80% para *ssaQ*; SPI3 em 80% para *mgtC*; SPI4 em 80% para *spi4D*; SPI5 em 98% para *sopB* presentes na cepas;

Foi possível observar diferenças entre as fontes de isolamento e os sorovares no que diz respeito aos genes encontrados dentro das cinco ilhas, genes relacionados regulações transcricionais e o gene plasmidial, podendo significar que os genes cromossomais pertecem ilhas mais conservadas enquanto o plasmidial pode ser perdido ao longo do tempo;

Podemos observar a relação associada a presença da ilha de patogenicidade associada as cepas de multirresistência.

## 8 – Referências Bibliográficas

Aarestrup F. M.;Hendriksen R. S.;Lockett J.;Gay K.;Teates K.;McDermott P. F.;White D. G.;Hasman H.;Sorensen G.;Bangtrakulnonth A.;Pornreongwong S.;Pulsrikarn C.;Angulo F. J.;Gerner-Smidt P. (2007) International spread of multidrug-resistant Salmonella Schwarzengrund in food products. *Emerg Infect Dis* 13 (5):726-731. doi:10.3201/eid1305.061489.

Aarestrup F. M.;Wegener H. C.;Collignon P. (2008) Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6 (5):733-750. doi:10.1586/14787210.6.5.733.

ABPA - Associação Brasileira de proteína animal 2018 Relatório Anual. Disponível em :<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2018/10/relatorio-anual-2018.pdf> Acessado em: Janeiro 2019.

Adley C.;Ryan M. (2016) The Nature and Extent of Foodborne Disease. In. doi:10.1016/B978-0-12-800723-5.00001-2.

Aljindan R. Y.;Alkharsah K. R. (2020) Pattern of increased antimicrobial resistance of Salmonella isolates in the Eastern Province of KSA. *J Taibah Univ Med Sci* 15 (1):48-53. doi:10.1016/j.jtumed.2019.12.004.

Almeida F.;Pitondo-Silva A.;Oliveira M. A.;Falcao J. P. (2013) Molecular epidemiology and virulence markers of Salmonella Infantis isolated over 25 years in Sao Paulo State, Brazil. *Infect Genet Evol* 19:145-151. doi:10.1016/j.meegid.2013.07.004.

Amavisit P.;Lightfoot D.;Browning G. F.;Markham P. F. (2003) Variation between pathogenic serovars within Salmonella pathogenicity islands. *J Bacteriol* 185 (12):3624-3635. doi:10.1128/JB.185.12.3624-3635.2003.

Andesfha E.;Indrawati A.;Mayasari N.;Rahayuningtyas I.;Jusa I. (2019) Detection of Salmonella pathogenicity island and Salmonella plasmid virulence genes in Salmonella Enteritidis originated from layer and broiler farms in Java Island. *J Adv Vet Anim Res* 6 (3):384-393. doi:10.5455/javar.2019.f358.

Arslan S.;Eyi A. (2010) Occurrence and antimicrobial resistance profiles of Salmonella species in retail meat products. *J Food Prot* 73 (9):1613-1617. doi:10.4315/0362-028x-73.9.1613.

Baloda S. B.;Krovacek K.;Eriksson L.;Linne T.;Mansson I. (1995) Detection of aerolysin gene in Aeromonas strains isolated from drinking water, fish and foods by the polymerase chain reaction. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 18 (1):17-26. doi:10.1016/0147-9571(94)e0001-a..

Barrow P. A. (1999) Salmonella infections in poultry – problems and new thoughts on the possibilities of control. *Braz J Poult Sci* 1 (1):9-16.



Barrow P. A.; Jones M. A.; Thomson N. (2010) Salmonella. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. pp 231-265. doi:<https://doi.org/10.1002/9780470958209.ch14>.

Bearson B. L.; Wilson L.; Foster J. W. (1998) A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* 180 (9):2409-2417. doi:10.1128/jb.180.9.2409-2417.1998.

Ben Salem R.; Abbassi M. S.; Garcia V.; Garcia-Fierro R.; Fernandez J.; Kilani H.; Jaouani I.; Khayeche M.; Messadi L.; Rodicio M. R. (2017) Antimicrobial drug resistance and genetic properties of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis circulating in chicken farms in Tunisia. *J Infect Public Health* 10 (6):855-860. doi:10.1016/j.jiph.2017.01.012.

Blanc-Potard A. B.; Groisman E. A. (1997) The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* 16 (17):5376-5385. doi:10.1093/emboj/16.17.5376.

Blanc-Potard A. B.; Solomon F.; Kayser J.; Groisman E. A. (1999) The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 181 (3):998-1004. doi:10.1128/JB.181.3.998-1004.1999.

Bodhidatta L.; Srijan A.; Serichantalergs O.; Bangtrakulnonth A.; Wongstitwilairung B.; McDaniel P.; Mason C. J. (2013) Bacterial pathogens isolated from raw meat and poultry compared with pathogens isolated from children in the same area of rural Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 44 (2):259-272.

Boletim Epidemiológico | Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Número Especial. ISSN 9352-7864. Disponível em: Acessado em: <[https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/marco/3/boletim\\_especial\\_doencas\\_negligenciadas.pdf](https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/marco/3/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf)> Acesso em : Janeiro 2021

Boore A. L.; Hoekstra R. M.; Iwamoto M.; Fields P. I.; Bishop R. D.; Swerdlow D. L. (2015) *Salmonella enterica* Infections in the United States and Assessment of Coefficients of Variation: A Novel Approach to Identify Epidemiologic Characteristics of Individual Serotypes, 1996-2011. *PLoS One* 10 (12):e0145416. doi:10.1371/journal.pone.0145416.

BRASIL(2011). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. Brasília, DF. Acesso: Março 2018.

Cardona-Castro N.; Sánchez-Jiménez M.; Usuga-Silva L.; Arboleda-Naranjo M.; Garzón E.; Vélez A.; Wiesner M.; Muñoz N.; Agudelo C. (2007) Characterization of two typhoid fever outbreaks in Apartadó, Antioquia, 2005. *Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud* 27:236-243.

CARVAJAL RESTREPO H. D.;SÁNCHEZ JIMÉNEZ M. M.;CARDONA CASTRO N. M. (2010) Detecção de serotipos de salmonella entérica de origen animal en habitantes de cuatro regiones de colombia %J CES Medicina. 24:107-108.

Castilla K. S.;Ferreira C. S. A.;Moreno A. M.;Nunes I. A.;Ferreira A. J. P. (2006) Distribution of virulence genes sefC, pefA and spvC in Salmonella Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 37 (2):5.

CDC- Centers for disease control and prevention., An Atlas of *Salmonella* in the United States, 1968-2011: Laboratory-based Enteric Disease Surveillance. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services,2013. Acesso: Dezembro 2018 .

CDC- Centers for disease control and prevention.. Disponível em :< <https://www.cdc.gov/salmonella/pdf/enteritidis-508c.pdf> e <https://www.cdc.gov/salmonella/pdf/typhimurium-508c.pdf>., 2018 Acesso: Dezembro 2018.

CDC- Centers of Disease Control and Prevention . Disponível em : < [www.cdc.gov/salmonella/general/index.html](http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html).>2019 Acesso em : Agosto 2021.

CDC-Centers for Disease Control and Prevention. National enteric disease surveillance: salmonella annual report. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. Disponível em : <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>. 2016. Acesso: julho 2020.

Chaudhary J. H.;Nayak J. B.;Brahmbhatt M. N.;Makwana P. P. (2015) Virulence genes detection of Salmonella serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. Veterinary world 8 (1):121-124. doi:10.14202/vetworld.2015.121-124.

Chen Z.;Bai J.;Wang S.;Zhang X.;Zhan Z.;Shen H.;Zhang H.;Wen J.;Gao Y.;Liao M.;Zhang J. (2020) Prevalence, Antimicrobial Resistance, Virulence Genes and Genetic Diversity of Salmonella Isolated from Retail Duck Meat in Southern China. Microorganisms 8 (3). doi:10.3390/microorganisms8030444.

Chopra A. K.;Huang J. H.;Xu X.;Burden K.;Niesel D. W.;Rosenbaum M. W.;Popov V. L.;Peterson J. W. (1999) Role of Salmonella enterotoxin in overall virulence of the organism. Microb Pathog 27 (3):155-171. doi:10.1006/mpat.1999.0294.

Chopra A. K.;Peterson J. W.;Chary P.;Prasad R. (1994) Molecular characterization of an enterotoxin from Salmonella typhimurium. Microb Pathog 16 (2):85-98. doi:10.1006/mpat.1994.1010.

- Clarke, R. C.; Gyles, C. L.; Charles, O. T. Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2 ed. Ames: Iowa State University, 133-153. (1993).
- Corbellini L. G.; Júnior A. B.; de Freitas Costa E.; Duarte A. S.; Albuquerque E. R.; Kich J. D.; Cardoso M.; Nauta M. (2016) Effect of slaughterhouse and day of sample on the probability of a pig carcass being Salmonella-positive according to the Enterobacteriaceae count in the largest Brazilian pork production region. *International journal of food microbiology* 228:58-66. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.030.
- D'Aoust, J. Y.; Maurer, J; Doyle, M. P.; Beuchat, L. R. *Salmonella* species in Food. Microbiology. 3.ed. Washington:ASM Press,. cap. 10, p. 187-219. (2007).
- de Jong H. K.; Parry C. M.; van der Poll T.; Wiersinga W. J. (2012) Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLOS Pathogens* 8 (10):e1002933. doi:10.1371/journal.ppat.1002933.
- Dieye Y.; Ameiss K.; Mellata M.; Curtiss R., 3rd (2009) The Salmonella Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by Salmonella enterica serovar Typhimurium. *BMC Microbiol* 9:3-3. doi:10.1186/1471-2180-9-3.
- Dinjus U.; Hänel I.; Müller W.; Bauerfeind R.; Helmuth R. (1997) Detection of the induction of Salmonella enterotoxin gene expression by contact with epithelial cells with RT-PCR. *FEMS microbiology letters* 146 (2):175-179. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10189.x.
- Dolan K. T.; Duguid E. M.; He C. (2011) Crystal structures of SlyA protein, a master virulence regulator of Salmonella, in free and DNA-bound states. *The Journal of biological chemistry* 286 (25):22178-22185. doi:10.1074/jbc.M111.245258.
- Domenech E.; Jiménez A.; Pérez R.; Ferrús M.; Escriche I. (2015) Risk characterization of antimicrobial resistance of Salmonella in meat products. *Food Control* 57. doi:10.1016/j.foodcont.2015.04.001.
- Durant J. A.; Carrier D. E.; Ricke S. C. (2000) Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the hilA and invF genes of Salmonella typhimurium. *J Food Prot* 63 (5):573-578. doi:10.4315/0362-028x-63.5.573.
- Eguale T. (2018) Non-typhoidal Salmonella serovars in poultry farms in central Ethiopia: prevalence and antimicrobial resistance. *BMC Vet Res* 14 (1):217. doi:10.1186/s12917-018-1539-4.
- El Mouali Y.; Gaviria-Cantin T.; Sánchez-Romero M. A.; Gibert M.; Westermann A. J.; Vogel J.; Balsalobre C. (2018) CRP-cAMP mediates silencing of Salmonella

virulence at the post-transcriptional level. *PLoS genetics* 14 (6):e1007401. doi:10.1371/journal.pgen.1007401.

Ellermeier C. D.; Slauch J. M. (2004) RtsA coordinately regulates DsbA and the Salmonella pathogenicity island 1 type III secretion system. *J Bacteriol* 186 (1):68-79. doi:10.1128/jb.186.1.68-79.2004.

Ellermeier J. R.;Slauch J. M. (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Current opinion in microbiology* 10 (1):24-29. doi:10.1016/j.mib.2006.12.002.

Eluu S.;Ejikeugwu C.;Iroha I.;Ogonna A.;Iroha C.;Ajah M.;Moses I.;Nwakaeze E.;Ngozi A.;Agabus N. (2017) Prevalence and antibiogram of *Salmonella* species isolated from poultry products in Ebonyi State, Nigeria. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 3:353-359. doi:10.5455/javar.2016.c-172.

Espinoza R. A.;Silva-Valenzuela C. A.;Amaya F. A.;Urrutia Í M.;Contreras I.;Santiviago C. A. (2017) Differential roles for pathogenicity islands SPI-13 and SPI-8 in the interaction of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhi with murine and human macrophages. *Biological research* 50 (1):5. doi:10.1186/s40659-017-0109-8.

European Food Safety A.;European Centre for Disease P.;Control (2018) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA journal European Food Safety Authority* 16 (12):e05500. doi:10.2903/j.efsa.2018.5500.

European Food Safety A.;European Centre for Disease P.;Control (2019) The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA journal European Food Safety Authority* 17 (12):e05926. doi:10.2903/j.efsa.2019.5926.

Fàbrega A.;Vila J. (2013) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews* 26 (2):308-341. doi:10.1128/cmr.00066-12.

Fagbamila I. O.;Barco L.;Mancin M.;Kwaga J.;Ngulukun S. S.;Zavagnin P.;Lettini A. A.;Lorenzetto M.;Abdu P. A.;Kabir J.;Umoh J.;Ricci A.;Muhammad M. (2017) *Salmonella* serovars and their distribution in Nigerian commercial chicken layer farms. *PLoS One* 12 (3):e0173097. doi:10.1371/journal.pone.0173097.

Farahani R.;Ehsani P.;Rad M. (2018) Molecular Detection, Virulence Genes, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance of *Salmonella enterica* Serotype enteritidis Isolated from Poultry and Clinical Samples. *Jundishapur Journal of Microbiology* 11. doi:10.5812/jjm.69504.

Fass E.;Groisman E. A. (2009) Control of Salmonella pathogenicity island-2 gene expression. *Current opinion in microbiology* 12 (2):199-204. doi:10.1016/j.mib.2009.01.004.

Feasey N. A.;Dougan G.;Kingsley R. A.;Heyderman R. S.;Gordon M. A. (2012) Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* 379 (9835):2489-2499. doi:10.1016/S0140-6736(11)61752-2.

Fernandes S. A.;Tavechio A. T.;Ghilardi A. C.;Dias A. M.;Almeida I. A.;Melo L. C. (2006) Salmonella serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 48 (4):179-184. doi:10.1590/s0036-46652006000400001.

Figueira R.;Watson K. G.;Holden D. W.;Helaine S. (2013) Identification of salmonella pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar typhimurium: implications for rational vaccine design. *mBio* 4 (2):e00065. doi:10.1128/mBio.00065-13.

Fortes T. P.;Fagundes M. Q.;Vasconcelos F. A.;Timm C. D.;Silva É. F. d. (2012) Salmonella enterica pathogenicity islands: a review. *Rev Inst Adolfo Lutz* 71:219-227.

Franco, B. D.; Landgraf, M; Destro, M.T; Gelli, D., Foodborne diseases in Southern South America. In: *International handbook of foodborne pathogens*. [s.l: s.n.]. p. 733-743. (2003).

Galán J. E.;Curtiss R., 3rd (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow Salmonella typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (16):6383-6387. doi:10.1073/pnas.86.16.6383.

Gal-Mor O.;Boyle E. C.;Grassl G. A. (2014) Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal Salmonella enterica serovars differ. *Frontiers in microbiology* 5:391. doi:10.3389/fmicb.2014.00391.

Gao R.;Wang L.;Ogunremi D. (2019) Virulence Determinants of Non-typhoidal Salmonellae. In. doi:10.5772/intechopen.88904.

García Vescovi E.;Soncini F. C.;Groisman E. A. (1996) Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of Salmonella virulence. *Cell* 84 (1):165-174. doi:10.1016/s0092-8674(00)81003-x.

Gerlach R. G.;Jäckel D.;Stecher B.;Wagner C.;Lupas A.;Hardt W. D.;Hensel M. (2007) Salmonella Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cellular microbiology* 9 (7):1834-1850. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00919.x.

Gharieb R. M.;Tartor Y. H.;Khedr M. H. (2015) Non-Typhoidal Salmonella in poultry meat and diarrhoeic patients: prevalence, antibiogram, virulotyping, molecular detection and sequencing of class I integrons in multidrug resistant strains. *Gut pathogens* 7:34. doi:10.1186/s13099-015-0081-1.

Goncuoglu M.;Ayaz N. D.;Ellerbroek L.;bilir ormancı F.;Uludag M.;Erol I. (2013) PhoP/Q carrying Salmonella in bile of cattle. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 60:123-128. doi:10.1501/Vetfak\_0000002565.

Groisman E. A.;Ochman H. (1997) How Salmonella became a pathogen. *Trends in microbiology* 5 (9):343-349. doi:10.1016/s0966-842x(97)01099-8.

Guerra B.;Soto S.;Helmuth R.;Mendoza M. C. (2002) Characterization of a self-transferable plasmid from Salmonella enterica serotype typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46 (9):2977-2981. doi:10.1128/aac.46.9.2977-2981.2002.

Guiney D. G.;Fierer J. (2011) The Role of the spv Genes in Salmonella Pathogenesis. *Frontiers in microbiology* 2:129. doi:10.3389/fmicb.2011.00129.

Guiney D. G.;Libby S.;Fang F. C.;Krause M.;Fierer J. (1995) Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in Salmonella. *Trends in microbiology* 3 (7):275-279. doi:10.1016/s0966-842x(00)88944-1.

Gulig P. A. (1990) Virulence plasmids of Salmonella typhimurium and other salmonellae. *Microb Pathog* 8 (1):3-11. doi:10.1016/0882-4010(90)90003-9.

Gunn J. S.;Hohmann E. L.;Miller S. I. (1996) Transcriptional regulation of Salmonella virulence: a PhoQ periplasmic domain mutation results in increased net phosphotransfer to PhoP. *J Bacteriol* 178 (21):6369-6373. doi:10.1128/jb.178.21.6369-6373.1996.

Guo L.;Lim K. B.;Gunn J. S.;Bainbridge B.;Darveau R. P.;Hackett M.;Miller S. I. (1997) Regulation of lipid A modifications by Salmonella typhimurium virulence genes phoP-phoQ. *Science (New York, NY)* 276 (5310):250-253. doi:10.1126/science.276.5310.250.

Hacker J.;Bender L.;Ott M.;Wingender J.;Lund B.;Marre R.;Goebel W. (1990) Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal Escherichia coli isolates. *Microb Pathog* 8 (3):213-225. doi:10.1016/0882-4010(90)90048-u.

Hayward M. R.;AbuOun M.;La Ragione R. M.;Tchorzewska M. A.;Cooley W. A.;Everest D. J.;Petrovska L.;Jansen V. A.;Woodward M. J. (2014) SPI-23 of *S. Derby*: role in adherence and invasion of porcine tissues. *PLoS One* 9 (9):e107857. doi:10.1371/journal.pone.0107857.

Heithoff D. M.;Shimp W. R.;Lau P. W.;Badie G.;Enioutina E. Y.;Daynes R. A.;Byrne B. A.;House J. K.;Mahan M. J. (2008) Human Salmonella clinical isolates distinct from those of animal origin. *Applied and environmental microbiology* 74 (6):1757-1766. doi:10.1128/aem.02740-07.

Hensel M. (2004) Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica. *International journal of medical microbiology : IJMM* 294 (2-3):95-102. doi:10.1016/j.ijmm.2004.06.025.

Hensel M.;Nikolaus T.;Egelseer C. (1999) Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of Salmonella pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 31 (2):489-498. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01190.x.

Hofer E.;dos Reis E. M. (1994) Salmonella serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 36 (1):7-9. doi:10.1590/s0036-46651994000100002.

Hu Q.;Coburn B.;Deng W.;Li Y.;Shi X.;Lan Q.;Wang B.;Coombes B. K.;Finlay B. B. (2008) Salmonella enterica serovar Senftenberg human clinical isolates lacking SPI-1. *Journal of clinical microbiology* 46 (4):1330-1336. doi:10.1128/jcm.01255-07.

Huehn S.;La Ragione R. M.;Anjum M.;Saunders M.;Woodward M. J.;Bunge C.;Helmuth R.;Hauser E.;Guerra B.;Beutlich J.;Brisabois A.;Peters T.;Svensson L.;Madajczak G.;Littrup E.;Imre A.;Herrera-Leon S.;Mevius D.;Newell D. G.;Malorny B. (2010) Virulotyping and antimicrobial resistance typing of Salmonella enterica serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog Dis* 7 (5):523-535. doi:10.1089/fpd.2009.0447.

Hur J.;Jawale C.;Lee J. H. (2012) Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. *Food Research International* 45 (2):819-830. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.014.

Im J.;Nichols C.;Bjerregaard-Andersen M.;Sow A. G.;Lofberg S.;Tall A.;Pak G. D.;Aaby P.;Baker S.;Clemens J. D.;Espinoza L. M.;Konings F.;May J.;Monteiro M.;Niang A.;Panzner U.;Park S. E.;Schutt-Gerowitt H.;Wierzba T. F.;Marks F.;von Kalckreuth V. (2016) Prevalence of Salmonella Excretion in Stool: A Community Survey in 2 Sites, Guinea-Bissau and Senegal. *Clin Infect Dis* 62 Suppl 1:S50-55. doi:10.1093/cid/civ789.

Issenhuth-Jeanjean S.;Roggentin P.;Mikoleit M.;Guibourdenche M.;de Pinna E.;Nair S.;Fields P. I.;Weill F. X. (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in microbiology* 165 (7):526-530. doi:10.1016/j.resmic.2014.07.004.

Jay, J. M. *Modern Food Microbiology*. 6th ed ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc (2000).

Jones M. A.;Wood M. W.;Mullan P. B.;Watson P. R.;Wallis T. S.;Galyov E. E. (1998) Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect Immun* 66 (12):5799-5804. doi:10.1128/IAI.66.12.5799-5804.1998.

Judicial Commission Of The International Committee On Systematics Of P. (2005) The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *Int J Syst Evol Microbiol* 55 (Pt 1):519-520. doi:10.1099/ijs.0.63579-0.

Júnior, A. B.; Neto, O. C.F.; Silva, E.N.; DI,F.J.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F.Doenças das Salmoneloses. em aves, 2ª edição, Ed. FACTA, Campinas. (2009).

Kubori T.;Matsushima Y.;Nakamura D.;Uralil J.;Lara-Tejero M.;Sukhan A.;Galán J. E.;Aizawa S. I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science (New York, NY)* 280 (5363):602-605. doi:10.1126/science.280.5363.602.

Lee K.;Iwata T.;Shimizu M.;Taniguchi T.;Nakadai A.;Hirota Y.;Hayashidani H. (2009) A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification. *Journal of applied microbiology* 107 (3):805-811. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04263.x.

Lee K.-M.;Runyon M.;Herrman T.;Phillips R.;Hsieh J. (2014) Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control* 47:264-276. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.011.

Li B.;Liu C.;Liu L.;Li S.;Fan N.;Hou H.;Jin J.;Xing Y. (2018) Prevalence and etiologic agent of *Salmonella* in livestock and poultry meats in Huai'an City during 2015-2016. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research* 47:260-300.

Li Y.;Yang X.;Zhang H.;Jia H.;Liu X.;Yu B.;Zeng Y.;Zhang Y.;Pei X.;Yang D. (2020) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in the commercial eggs in China. *International journal of food microbiology* 325:108623. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108623.

Libby S. J.;Adams L. G.;Ficht T. A.;Allen C.;Whitford H. A.;Buchmeier N. A.;Bossie S.;Guiney D. G. (1997) The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect Immun* 65 (5):1786-1792. doi:10.1128/iai.65.5.1786-1792.1997.



Libby S. J.;Goebel W.;Ludwig A.;Buchmeier N.;Bowe F.;Fang F. C.;Guiney D. G.;Songer J. G.;Heffron F. (1994) A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (2):489-493. doi:10.1073/pnas.91.2.489.

Lou L.;Zhang P.;Piao R.;Wang Y. (2019) *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front Cell Infect Microbiol* 9:270. doi:10.3389/fcimb.2019.00270.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Dunlap, P.L.; Clark, D.P.(2010) *Bacterial Genetics Principles*In: *Microbiologia de Brock*. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, p.278-283.

Majowicz S. E.;Musto J.;Scallan E.;Angulo F. J.;Kirk M.;O'Brien S. J.;Jones T. F.;Fazil A.;Hoekstra R. M. (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50 (6):882-889. doi:10.1086/650733.

Mąka Ł.;Maćkiw E.;Ścieżyńska H.;Popowska M. (2015) Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. Isolated from food other than meat in Poland. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM* 22. doi:10.5604/12321966.1167701.

Makino S.;Kurazono H.;Chongsanguam M.;Hayashi H.;Cheun H.;Suzuki S.;Shirahata T. (1999) Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. *The Journal of veterinary medical science* 61 (11):1245-1247. doi:10.1292/jvms.61.1245.

Marcus S. L.;Brumell J. H.;Pfeifer C. G.;Finlay B. B. (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and infection* 2 (2):145-156. doi:10.1016/s1286-4579(00)00273-2.

Marder Mph E. P.;Griffin P. M.;Cieslak P. R.;Dunn J.;Hurd S.;Jervis R.;Lathrop S.;Muse A.;Ryan P.;Smith K.;Tobin-D'Angelo M.;Vugia D. J.;Holt K. G.;Wolpert B. J.;Tauxe R.;Geissler A. L. (2018) Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2017. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 67 (11):324-328. doi:10.15585/mmwr.mm6711a3.

Martins. L.M; Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada as zoonoses)- da Faculdade de Medicina .São Paulo. (2010).

- Matsui H.;Bacot C. M.;Garlington W. A.;Doyle T. J.;Roberts S.;Gulig P. A. (2001) Virulence plasmid-borne spvB and spvC genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J Bacteriol* 183 (15):4652-4658. doi:10.1128/jb.183.15.4652-4658.2001.
- Medeiros M. A.;Oliveira D. C.;Rodrigues Ddos P.;Freitas D. R. (2011) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health* 30 (6):555-560. doi:10.1590/s1020-49892011001200010.
- Mezal E. H.;Sabol A.;Khan M. A.;Ali N.;Stefanova R.;Khan A. A. (2014) Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. *Food microbiology* 38:67-74. doi:10.1016/j.fm.2013.08.003.
- Mohammed M.;Le Hello S.;Leekitcharoenphon P.;Hendriksen R. (2017) The invasome of *Salmonella* Dublin as revealed by whole genome sequencing. *BMC infectious diseases* 17 (1):544. doi:10.1186/s12879-017-2628-x.
- Moncrief M. B.;Maguire M. E. (1998) Magnesium and the role of MgtC in growth of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 66 (8):3802-3809. doi:10.1128/IAI.66.8.3802-3809.
- Moore M. M.;Feist M. D. (2007) Real-time PCR method for *Salmonella* spp. targeting the stn gene. *Journal of applied microbiology* 102 (2):516-530. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03079.x.
- Nakano M.;Yamasaki E.;Ichinose A.;Shimohata T.;Takahashi A.;Akada J. K.;Nakamura K.;Moss J.;Hirayama T.;Kurazono H. (2012) *Salmonella* enterotoxin (Stn) regulates membrane composition and integrity. *Disease models & mechanisms* 5 (4):515-521. doi:10.1242/dmm.009324.
- Norte V. A.;Stapleton M. R.;Green J. (2003) PhoP-responsive expression of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium slyA gene. *J Bacteriol* 185 (12):3508-3514. doi:10.1128/jb.185.12.3508-3514.
- Nuccio S. P.;Baumler A. J. (2014) Comparative analysis of *Salmonella* genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut. *mBio* 5 (2):e00929-00914. doi:10.1128/mBio.00929-14;
- O'Neill J. . Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. <https://amr-review.org/>.(2016).

Ochoa I. M. F.;Rodríguez A. V. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. In, 2005.

Odoch T.;Wasteson Y.;L'Abée-Lund T.;Muwonge A.;Kankya C.;Luke N.;Tegule S.;Skjerve E. (2017) Prevalence, antimicrobial susceptibility and risk factors associated with non-typhoidal *Salmonella* on Ugandan layer hen farms. *BMC Veterinary Research* 13. doi:10.1186/s12917-017-1291-1.

Okada N.;Oi Y.;Takeda-Shitaka M.;Kanou K.;Umeyama H.;Haneda T.;Miki T.;Hosoya S.;Danbara H. (2007) Identification of amino acid residues of *Salmonella* SlyA that are critical for transcriptional regulation. *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 2):548-560. doi:10.1099/mic.0.29259-0.

Oliveira S. D. d.;Rodenbusch C. R.;Michael G. B.;Cardoso M. I. R.;Canal C. W.;Brandelli A. (2003) Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:123-124. doi:doi.org/10.1590/S1517-83822003000500042.

Osman K. M.;Marouf S. H.;Mehana O. A.;AlAtfeehy N. (2014) *Salmonella* enterica serotypes isolated from squabs reveal multidrug resistance and a distinct pathogenicity gene repertoire. *Rev Sci Tech* 33 (3):997-1006. doi:10.20506/rst.33.3.2336.

Oueslati W.;Rjeibi M. R.;Mhadhbi M.;Jbeli M.;Zrelli S.;Ettriqui A. (2016) Prevalence, virulence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. strains, isolated from beef in Greater Tunis (Tunisia). *Meat Sci* 119:154-159. doi:10.1016/j.meatsci.2016.04.037.

Passaris I.;Cambré A.;Govers S. K.;Aertsen A. (2018) Bimodal Expression of the *Salmonella* Typhimurium spv Operon. *Genetics* 210 (2):621-635. doi:10.1534/genetics.118.300822.

Pavlova B.;Volf J.;Ondrackova P.;Matiasovic J.;Stepanova H.;Crhanova M.;Karasova D.;Faldyna M.;Rychlik I. (2011) SPI-1-encoded type III secretion system of *Salmonella* enterica is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. *Veterinary research* 42 (1):16. doi:10.1186/1297-9716-42-16.

Pires S. M.;Vieira A. R.;Hald T.;Cole D. (2014) Source attribution of human salmonellosis: an overview of methods and estimates. *Foodborne Pathog Dis* 11 (9):667-676. doi:10.1089/fpd.2014.1744.

Pires S. M.;Vieira A. R.;Perez E.;Lo Fo Wong D.;Hald T. (2012) Attributing human foodborne illness to food sources and water in Latin America and the Caribbean using data from outbreak investigations. *International journal of food microbiology* 152 (3):129-138. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.018.

Pires S. M.;Vigre H.;Makela P.;Hald T. (2010) Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe. *Foodborne Pathog Dis* 7 (11):1351-1361. doi:10.1089/fpd.2010.0564.

Popoff M. Y.;Bockemühl J.;Gheesling L. L. (2004) Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in microbiology* 155 (7):568-570. doi:10.1016/j.resmic.2004.04.005.

Prost L. R.;Daley M. E.;Le Sage V.;Bader M. W.;Le Moual H.;Klevit R. E.;Miller S. I. (2007) Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Molecular cell* 26 (2):165-174. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.008.

Raffatellu M.;Wilson R. P.;Chessa D.;Andrews-Polymenis H.;Tran Q. T.;Lawhon S.;Khare S.;Adams L. G.;Bäumler A. J. (2005) SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 73 (1):146-154. doi:10.1128/iai.73.1.146-154.

Ren D.;Chen P.;Wang Y.;Wang J.;Liu H.;Liu H. (2016) Phenotypes and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* isolated from retail chicken and pork in Changchun, China. *Journal of Food Safety* 37. doi:10.1111/jfs.12314.

Rodrigues, D.P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e materiais avícolas. In: conferência apinco de ciência e tecnologia avícolas, 2005. Anais..., Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, v.2, p.223-228. (2005).

Sallam K.;Mohammed M.;Hassan M.;Tamura T. (2014) Prevalence, molecular identification and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from retail beef products in Mansoura, Egypt. *Food Control* 38:209-214. doi:10.1016/j.foodcont.2013.10.027.

Salmonand, D.;Smith, T.; "Report on swine plague," US Bureau of Animal Industries. 2<sup>nd</sup> Annual Report 184, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, USA, . (1885).

Sánchez-Jiménez M. M.;Cardona-Castro N.;Canu N.;Uzzau S.;Rubino S. (2010) Distribution of pathogenicity islands among Colombian isolates of *Salmonella*. *Journal of infection in developing countries* 4 (9):555-559. doi:10.3855/jidc.670.

Sanchez-Vargas F. M.;Abu-El-Haija M. A.;Gomez-Duarte O. G. (2011) *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis* 9 (6):263-277. doi:10.1016/j.tmaid.2011.11.001.

Sangal V.;Harbottle H.;Mazzoni C. J.;Helmuth R.;Guerra B.;Didelot X.;Paglietti B.;Rabsch W.;Brisse S.;Weill F. X.;Roumagnac P.;Achtman M. (2010) Evolution

and population structure of *Salmonella enterica* serovar Newport. *J Bacteriol* 192 (24):6465-6476. doi:10.1128/JB.00969-10.

Schmidt H.;Hensel M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical microbiology reviews* 17 (1):14-56. doi:10.1128/CMR.17.1.14-56.2004.

Seo K. W.;Kim J. J.;Mo I. P.;Lee Y. J. (2019) Molecular characteristic of antimicrobial resistance of *Salmonella Gallinarum* isolates from chickens in Korea, 2014 to 2018. *Poult Sci* 98 (11):5416-5423. doi:10.3382/ps/pez376.

Sévellec Y.;Vignaud M. L.;Granier S. A.;Lailier R.;Feurer C.;Le Hello S.;Mistou M. Y.;Cadel-Six S. (2018) Polyphyletic Nature of *Salmonella enterica* Serotype Derby and Lineage-Specific Host-Association Revealed by Genome-Wide Analysis. *Frontiers in microbiology* 9:891. doi:10.3389/fmicb.2018.00891.

Shi C.;Singh P.;Ranieri M. L.;Wiedmann M.;Moreno Switt A. I. (2015) Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. *Critical reviews in microbiology* 41 (3):309-325. doi:10.3109/1040841x.2013.837862.

Shi Y.;Latifi T.;Cromie M. J.;Groisman E. A. (2004) Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance *ugtL* gene by the *Salmonella* PhoP and SlyA regulatory proteins. *The Journal of biological chemistry* 279 (37):38618-38625. doi:10.1074/jbc.M406149200.

Shinohara N.;Barros V.;Jimenez S.;Machado E.;Dutra R.;Lima Filho J. L. (2008) *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciencia & Saude Coletiva - CIENC SAUDE COLETIVA* 13. doi:10.1590/S1413-81232008000500031.

Silva K. C.;Fontes L. C.;Moreno A. M.;Astolfi-Ferreira C. S.;Ferreira A. J.;Lincopan N. (2013) Emergence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase CTX-M-2-producing *Salmonella enterica* serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57 (7):3458-3459. doi:10.1128/aac.05992-11.

Smith T. J. U. B. A. I. B. (1894) The hog-cholera group of bacteria. 6:6-40

Soto S. M.;Rodriguez I.;Rodicio M. R.;Vila J.;Mendoza M. C. (2006) Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. *J Med Microbiol* 55 (Pt 4):365-373. doi:10.1099/jmm.0.46257-0.

Stapleton M. R.;Norte V. A.;Read R. C.;Green J. (2002) Interaction of the *Salmonella typhimurium* transcription and virulence factor SlyA with target DNA and identification of members of the SlyA regulon. *The Journal of biological chemistry* 277 (20):17630-17637. doi:10.1074/jbc.M110178200.

Stender S.;Friebel A.;Linder S.;Rohde M.;Miold S.;Hardt W. D. (2000) Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* 36 (6):1206-1221. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01933.x.

Strockbine, N.; Bopp,C.; Fields,P.; Kaper,J.; Nataro,J.; “*Escherichia, Shigella, and Salmonella,*” in *Manual of Clinical Microbiology*,J.Jorgensen,M.Pfaller,K.Carrolletal.,ASM Press,Washington,DC,U SA11:685-713, (2015).

SVS. Secretaria de vigilância em saúde. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolpho Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, p.5. (2011).

Swamy S. C.;Barnhart H. M.;Lee M. D.;Dreesen D. W. (1996) Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Applied and environmental microbiology* 62 (10):3768-3771. doi:10.1128/aem.62.10.3768-3771.1996.

Temme K.;Salis H.;Tullman-Ercek D.;Levskaia A.;Hong S. H.;Voigt C. A. (2008) Induction and relaxation dynamics of the regulatory network controlling the type III secretion system encoded within *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Mol Biol* 377 (1):47-61. doi:10.1016/j.jmb.2007.12.044.

Tindall B. J.;Grimont P. A. D.;Garrity G. M.;Euzéby J. P. (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55 (Pt 1):521-524. doi:10.1099/ijs.0.63580-0.

van Asten A. J.;van Dijk J. E. (2005) Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS immunology and medical microbiology* 44 (3):251-259. doi:10.1016/j.femsim.2005.02.002.

Velasquez C. G.;Macklin K. S.;Kumar S.;Bailey M.;Ebner P. E.;Oliver H. F.;Martin-Gonzalez F. S.;Singh M. (2018) Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolated from poultry farms in southeastern United States. *Poult Sci* 97 (6):2144-2152. doi:10.3382/ps/pex449.

Vernikos G. S.;Parkhill J. (2006) Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22 (18):2196-2203. doi:10.1093/bioinformatics/btl369.

Vieira M. A. M. (2009) Ilha de Patogenicidade/ Pathogenicity Islands/ Islas de Patogenicidad. *Mundo saúde* 33 (4):406-414.

- Vishwakarma V.;Pati N. B.;Ray S.;Das S.;Suar M. (2014) TTSS2-deficient hha mutant of Salmonella Typhimurium exhibits significant systemic attenuation in immunocompromised hosts. *Virulence* 5 (2):311-320. doi:10.4161/viru.27605.
- Will W. R.;Bale D. H.;Reid P. J.;Libby S. J.;Fang F. C. (2014) Evolutionary expansion of a regulatory network by counter-silencing. *Nature communications* 5:5270. doi:10.1038/ncomms6270.
- Will W. R.;Fang F. C. (2020) The evolution of MarR family transcription factors as counter-silencers in regulatory networks. *Current opinion in microbiology* 55:1-8. doi:10.1016/j.mib.2020.01.002.
- Will W. R.;Navarre W. W.;Fang F. C. (2015) Integrated circuits: how transcriptional silencing and counter-silencing facilitate bacterial evolution. *Current opinion in microbiology* 23:8-13. doi:10.1016/j.mib.2014.10.005.
- Wood M. W.;Jones M. A.;Watson P. R.;Hedges S.;Wallis T. S.;Galyov E. E. (1998) Identification of a pathogenicity island required for Salmonella enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 29 (3):883-891. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00984.x.
- Wood M. W.;Jones M. A.;Watson P. R.;Siber A. M.;McCormick B. A.;Hedges S.;Rosqvist R.;Wallis T. S.;Galyov E. E. (2000) The secreted effector protein of Salmonella dublin, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. *Cellular microbiology* 2 (4):293-303. doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00054.x.
- World Health O. (2015) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization, Geneva.
- World Health O. (2016) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization, Geneva.
- Xia Y.;Li H.;Shen Y. (2020) Antimicrobial Drug Resistance in Salmonella enteritidis Isolated From Edible Snakes With Pneumonia and Its Pathogenicity in Chickens. *Frontiers in veterinary science* 7:463. doi:10.3389/fvets.2020.00463.
- Yang X.;Wu Q.;Zhang J.;Huang J.;Chen L.;Wu S.;Zeng H.;Wang J.;Chen M.;Wu H.;Gu Q.;Wei X. (2019) Prevalence, Bacterial Load, and Antimicrobial Resistance of Salmonella Serovars Isolated From Retail Meat and Meat Products in China. *Frontiers in microbiology* 10:2121. doi:10.3389/fmicb.2019.02121.

Zhang Y.;Higashide W.;Dai S.;Sherman D. M.;Zhou D. (2005) Recognition and ubiquitination of Salmonella type III effector SopA by a ubiquitin E3 ligase, HsRMA1. *The Journal of biological chemistry* 280 (46):38682-38688. doi:10.1074/jbc.M506309200.

Zhao G.;Weatherspoon N.;Kong W.;Curtiss R., 3rd;Shi Y. (2008) A dual-signal regulatory circuit activates transcription of a set of divergent operons in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (52):20924-20929. doi:10.1073/pnas.0807071106.

Zhu A.;Zhi W.;Qiu Y.;Wei L.;Tian J.;Pan Z.;Kang X.;Gu W.;Duan L. (2018) Surveillance study of the prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in pork from open markets in Xuzhou, China. *Food Control* 98. doi:10.1016/j.foodcont.2018.07.035.

Zuo L.;Zhou L.;Wu C.;Wang Y.;Li Y.;Huang R.;Wu S. (2020) *Salmonella* spvC Gene Inhibits Pyroptosis and Intestinal Inflammation to Aggravate Systemic Infection in Mice. *Frontiers in microbiology* 11:562491. doi:10.3389/fmicb.2020.562491.