



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Emanuela Mendes Cardoso

**Caracterização genômica de Salmonella Heidelberg isoladas da cadeia de
produção de frango**

Florianópolis

2024

Emanuela Mendes Cardoso

Caracterização genômica de *Salmonella* Heidelberg isoladas da cadeia de produção de frango

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof.a; Dra. Fabienne Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner

Florianópolis

2024

Cardoso, Emanuela Mendes

Caracterização genômica de Salmonella Heidelberg isoladas da cadeia de produção de frango / Emanuela Mendes Cardoso ; orientador, Fabienne Ferreira, coorientador, Juliano De Dea Lindner, 2024.

67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Segurança alimentar. 3. frango de corte. 4. Salmonella. 5. análise de genoma. I. Ferreira, Fabienne . II. Lindner, Juliano De Dea. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Emanuela Mendes Cardoso

Título: Caracterização genômica de *Salmonella* Heidelberg isoladas da cadeia de produção de frango

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 05 de abril de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Glauber Wagner Dr.

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Profa Thais Cristine Marques Sincero Dra

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências pelo Programa de Pós-Graduação Biotecnologia e Biociências.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.a Fabienne Ferreira, Dra
Orientador(a)

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida, família e amigos. Agradeço aos meus pais Rosanea e Sebastião, por proporcionarem, incentivarem e estarem ao meu lado me apoiando ao longo de toda a minha trajetória.

Aos meus amigos que estiveram presente, me apoiaram em todo meu percurso, sempre acreditando e incentivando meus projetos.

Deixo um agradecimento especial a orientadora Fabienne Ferreira e coorientador Juliano De Dea Lindner pelo incentivo e dedicação. Aos membros da banca, por sua disponibilidade e contribuição a pesquisa.

A todos, muito obrigada.

RESUMO

A rápida expansão da produção de frangos de corte no Brasil tem apresentado significativos desafios sanitários dentro da indústria avícola. Entre esses desafios, a bactéria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Heidelberg (*Salmonella* Heidelberg) destaca-se em surtos globais de salmonelose. Este estudo analisou 13 genomas de *Salmonella* Heidelberg isolados da cadeia de produção pré-abate de frangos de corte no Brasil. Ao conduzir análises in silico desses genomas, o estudo investigou potenciais surtos com base em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs; do inglês: *single nucleotide polymorphisms*) e identificou genes que codificam resistência a antimicrobianos, sanitizantes e fatores de virulência. Além disso, elementos genéticos móveis (MGE; do inglês: *mobile genetic elements*) foram identificados para avaliar seu papel potencial na propagação de genes de resistência por meio de transferência horizontal de genes. Uma classificação de risco também foi aplicada com base nos resistomas. Os genomas revelaram uma alta prevalência de genes que conferem resistência a aminoglicosídeos, fosfomicina, sulfonamidas, tetraciclina e genes relacionados à resistência a compostos de amônia quaternária. O estudo também identificou seis ilhas de patogenicidade da *Salmonella* (SPI; do inglês *Salmonella pathogenicity island*) e mais de 100 genes que codificam fatores de virulência. A associação de MGE com genes codificantes de resistência a antimicrobianos *sul2* e *blaCMY-2* levantou preocupações sobre a transferência potencial para outras bactérias, representando um risco substancial para a disseminação de mecanismos de resistência, de acordo com o protocolo de risco utilizado. Além disso, a análise de SNPs indicou relações filogenéticas próximas entre alguns isolados, sugerindo surtos em potencial. Este estudo aprimora nossa compreensão de isolados de *Salmonella* Heidelberg, lançando luz sobre cenários de potenciais surtos e identificando fatores de risco críticos para a transmissão, abrindo caminho para a implementação de estratégias eficazes de controle, monitoramento e tratamento na indústria avícola.

Palavras-chave: Segurança alimentar, frango de corte, *Salmonella*, análise de genoma, resistência a antimicrobianos, elementos genéticos móveis.

ABSTRACT

Genomic characterization of *Salmonella* Heidelberg isolated from the Brazilian poultry production chain

The rapid expansion of broiler chicken production in Brazil has presented significant health challenges within the poultry industry. Among these challenges is the bacteria *Salmonella* enterica subsp. enterica serotype Heidelberg (*Salmonella* Heidelberg) stands out in global outbreaks of salmonellosis. This study analyzed 13 *Salmonella* Heidelberg genomes isolated from Brazil's pre-slaughter production chain of broiler chickens. In silico analyses of these genomes investigated potential outbreaks based on single nucleotide polymorphisms (SNPs) and identified genes that encode resistance to antimicrobials, sanitizers, and virulence factors. Furthermore, mobile genetic elements (MGE) were identified to evaluate their potential role in the propagation of resistance genes through horizontal transfer. A risk classification was also applied based on the resistomes. The genomes revealed a high prevalence of genes that confer resistance to aminoglycosides, phosphomycin, sulfonamides, tetracycline, and genes related to resistance to quaternary ammonium compounds (sanitizers used in the production chain). The study also identified six *Salmonella* pathogenicity islands (SPI) and more than 100 genes that encode virulence factors. The association of MGE with antibiotic resistance-encoding genes *sul2* and *bla*CMY-2 raised concerns about a potential transfer to other bacteria, posing a substantial risk for spreading resistance mechanisms under the risk protocol used. Furthermore, SNP analysis indicated close phylogenetic relationships between some isolates, suggesting potential outbreaks. This study enhances our understanding of *Salmonella* Heidelberg isolates, shedding light on potential outbreak scenarios and identifying critical risk factors for transmission, paving the way for implementing effective control, monitoring, and treatment strategies in the poultry industry.

Keywords: food safety, broiler chicken, *Salmonella*, genome analysis, antibiotic resistance, mobile genetic elements.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Famílias gênicas únicas em cada sorovar de <i>Salmonella</i>	18
Figura 2 - Processo de colonização e disseminação da <i>Salmonella</i>	20
Figura 3 - Elementos genéticos móveis (MGEs) e transferência horizontal de genes (HGT)	27
Figura 4 - Classificação dos riscos de detecção de genes de resistência em resistomas	29
Figura 5 - Ecologia da transmissão de <i>Salmonella</i>	32
Figura 6 – Informações gerais sobre a localização e data de coleta dos isolados bacterianos.....	34
Figura 7 - Árvore filogenética com base na análise comparativa de SNPs -	40
Figura 8 - Número de SNPs para investigação de surtos	41
Figura 9 - Distribuição de genes de resistência a antimicrobianos e sanitizantes.....	43
Figura 10 - Genes de virulência encontrados nos genomas de <i>S. Heidelberg</i> e que diferiram entre os isolados.	48
Figura 11- Distribuição de Elementos Genéticos Móveis (MGE) entre os genomas de <i>S. Heidelberg</i>	49
Figura 12 - Posição genômica de elementos genéticos móveis (MGE), genes de resistência a antimicrobianos e sanitizantes	50
Figura 13 - Distribuição de plasmídeos e seus genes de resistência a antimicrobianos associados entre os genomas de <i>S. Heidelberg</i>	53
Figura 14 - Distribuição de bacteriófagos entre os genomas de <i>S. Heidelberg</i>	54
Figura 15 - Classificação de risco dos genes de resistência	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais fatores de virulência em <i>Salmonella</i>	21
Quadro 2 - Classificação distância SNP	37
Quadro 3 - Genes de resistência a sanitizantes	38
Quadro 4 - Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Locus (MLST) para investigação de surtos	39
Quadro 5 - Fatores de virulência <i>in silico</i> presente em todas as amostras de <i>S. Heidelberg</i>	47
Quadro 6 - Dados do genoma da sequence read archive(SRA)	67
Quadro 7 – Antibiograma realizado por Soares <i>et al.</i> 2023	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ARB - Bactérias Resistência a Antimicrobianos
- ARG - Genes de Resistência a Antimicrobianos
- BLASTn - *Basic Local Alignment Nucleotide*
- BRAs - Bactérias resistentes a antimicrobianos
- CARD - *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*
- CCs - Complexos Clonais
- CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos)
- CGE - *Center for Genomic Epidemiology*(Centro de Epidemiologia Genômica)
- ComTns - Transposons Compostos
- MGE – Elementos Genéticos Móveis
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FOS - Fosfomicina
- GRAs -Gene de Resistência a Antimicrobianos
- HGT -Transferência Horizontal de Genes
- ICEs - Elementos Integrativos e Conjugativos
- In – Integrans
- IR - Repetições Invertidas
- IS - Sequências de Inserção
- MITEs - Repetições Invertidas em Miniatura
- MLST - *Multiple Locus Sequence Typing* (Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Locus)
- QACs - Compostos de Amônia Quaternária
- SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms* (Polimorfismos de um Único Nucleotídeo)
- SPIs - *Salmonella Pathogenicity Islands* (Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella*)
- SPV - *Salmonella Plasmid Virulence* (Plasmídeo Virulência *Salmonella*)
- ST - *Sequence Typing* (Tipo de Sequência)
- SUL - Sulfonamida
- TET - Tetraciclina
- Tn - Transposons
- WGS - *Whole Genome Sequencing* (Sequenciamento do Genoma Completo)
- WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1.1	AVICULTURA	16
1.2	SALMONELLA E SALMONELLA HEIDELBERG	17
1.2.1	Fatores de virulência	21
1.2.2	Resistência aos antimicrobianos e sanitizantes	24
1.3	SALMONELLA NO CONTEXTO DE SAÚDE ÚNICA.....	30
2	OBJETIVO	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	GENOMAS BACTERIANOS	34
3.2	INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEL SURTO	36
3.3	IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	37
3.4	IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE GENES DE RESISTÊNCIA À SANITIZANTES.....	38
3.5	IDENTIFICAÇÃO IN SILICO GENES DE VIRULÊNCIA	38
3.6	ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS (MGE)	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	INVESTIGAÇÃO DE SURTO.....	39
4.2	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES	42
4.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	46
4.4	ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS	49
4.4.1	Plasmídeos	53
4.5	IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE BACTERÍOFAGOS	54
4.6	CLASSIFICAÇÃO DE RISCO NO RESISTOMA.....	55
5	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A – SEQUENCE READ ARCHIVE (SRA) DO GENBANK	67
	ANEXO B – DETECTION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS FROM NARES OF ELDERLY LIVING IN A BRAZILIAN NURSING HOME	68

ANEXO C – GENOMIC CHARACTERIZATION OF SALMONELLA HEIDELBERG ISOLATED FROM THE BRAZILIAN POULTRY PRODUCTION CHAIN.....	69
ANEXO D – ANTIBIOGRAMA CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> HEIDELBERG	70

INTRODUÇÃO

1.1 AVICULTURA

A produção e consumo de carne de aves desempenham um papel importante na indústria alimentícia, especialmente no Brasil, que se destaca como um dos principais produtores e exportadores mundiais (Nhung; Chansiripornchai; Carrique-Mas, 2017). Em 2022, o país produziu uma quantidade significativa de frango de corte, que além de atender as demandas interna, destaca-se como principal exportador de carne de frango do mundo, exportando para 155 países, como Arábia Saudita, Japão, países da União Europeia, China e Emirados Árabes (Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária, 2024)

Essa produção é concentrada principalmente nos estados da Região Sul do Brasil, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, que juntos correspondem a cerca de 78% de todas as exportações brasileiras de frango de corte (ABPA, 2022). A avicultura intensiva envolve o aumento da densidade populacional das aves e geração de resíduos. É caracterizada por operações verticalmente integradas entre diversos setores, que vão desde a criação, até o processamento de carcaças (Medina-Santana *et al.*, 2022). Durante a criação, os frangos de corte permanecem em camas aviárias, formadas por uma camada de substrato, que tem como objetivo facilitar a absorção, evaporação das excretas e trazer conforto térmico. Conforme ocorre o uso dessas camas, forma-se uma mistura de materiais, composta por maravalha, acrescida de excretas das aves (que contém bactérias gastrointestinais de frango e ração não digerida), restos de ração, penas, pele, insetos e outros materiais de origem do frango, representando um dos principais resíduos da avicultura intensiva. Este pode ser um ambiente propício para a disseminação e contaminação de microrganismos com potencial patogênico (Oladeinde *et al.*, 2018).

Assim, mesmo adotando medidas de biossegurança e boas práticas de saneamento, algum nível de contaminação nesses produtos e no ambiente de criação é praticamente inevitável. Esta contaminação pode estar associada à presença e transmissão de *Salmonella* potencialmente patogênica nos ambientes, em qualquer etapa da criação animal, desde rações contaminadas, presença de roedores e aves silvestres que facilitam a dispersão de microrganismos, até durante o abate, em que

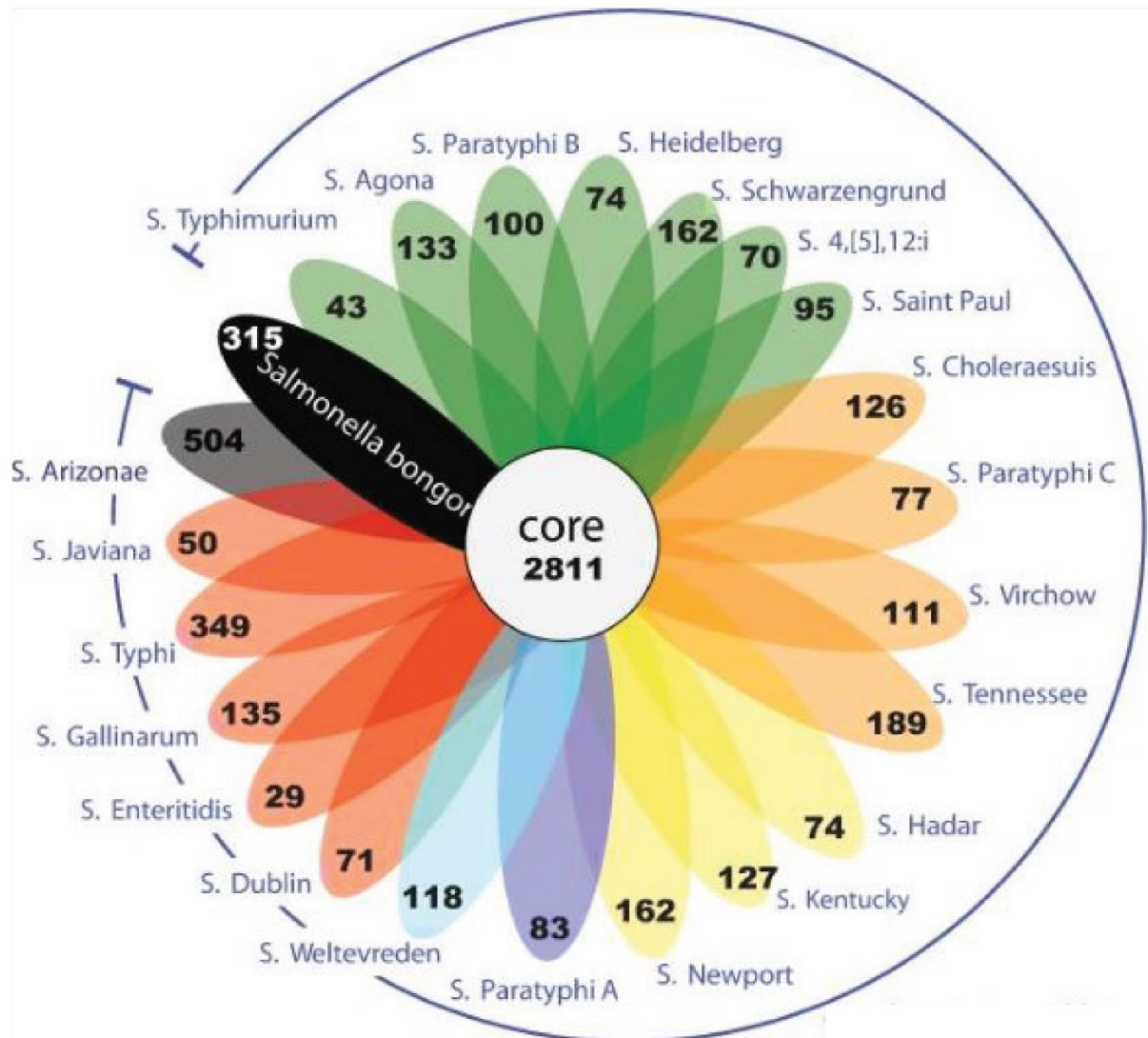
as carcaças podem estar contaminadas por bactérias encontradas no conteúdo intestinal dos animais (Medina-Santana *et al.*, 2022; Zeng *et al.*, 2021).

1.2 SALMONELLA E SALMONELLA HEIDELBERG

Salmonella é o gênero de uma bactéria pertencente à ordem Enterobacteriales e família Enterobacteriaceae (Adeolu *et al.*, 2016). Esta bactéria foi relatada pela primeira vez por Daniel Elmer Salmon (1850-1914), um veterinário americano patologista. *Salmonella* apresenta-se como bastonetes curtos (1 a 2 µm), Gram-negativas, anaeróbias facultativas e não formadores de endósporos. Esse gênero divide-se em duas espécies principais de importância clínica: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (Al-Khafaji; Al-Bayati; Al-Dahmoshi, 2021).

A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies, que incluem pelo menos 2.500 sorotipos, que se distinguem por variações em antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (Yu *et al.*, 2018). Os genomas de *Salmonella* consistem em um único cromossomo circular, com uma extensão média de 4.77.897 pares de bases (pb), variando de 4.460.105 pb. Adicionalmente, é comum encontrar DNA extracromossômico (plasmídeo) na maioria dos sorovares de *S. enterica*. Observa-se uma predominância de famílias de genes conservados entre cepas do mesmo sorovar, como Heidelberg, Typhi e Typhimurium, e esta tendência se correlaciona fortemente com a distância evolutiva entre essas espécies. Uma análise do pangenoma indicou que o gênero *Salmonella* continuará expandindo seu tamanho devido ao surgimento de novos genes específicos de cepas, enquanto seu core-genoma permanecerá estável (Chand; Alam; Singh, 2020). O pangenoma é definido como o conjunto de todos os genes presentes em uma determinada espécie e pode ser subdividido em genoma acessório, presente em apenas alguns dos genomas, e genoma central, presente em todos os genomas (Brockhurst *et al.*, 2019). Na figura 1 podemos visualizar a representação do número médio de famílias gênicas encontradas em cada genoma como sendo exclusivo do seu sorovar.

Figura 1 - Famílias gênicas únicas em cada sorovar de Salmonella.



Fonte: Traduzido de (Jacobsen *et al.*, 2011). Flowerplot apresenta o tamanho do core genoma, as pétalas estão representadas os sorogrupos pelas cores e o número médio de famílias gênicas encontradas em cada genoma como sendo exclusivo do sorovar.

A patogenicidade de *Salmonella* spp. depende do sorotipo, imunidade do hospedeiro e virulência da bactéria. Em geral, a salmonelose é causada por sorotipos específicos, tifóides e não tifóides, do gênero *Salmonella*. A subespécie *enterica* tem maior número de sorotipos, sendo responsável por 99% dos isolamentos em animais de sangue quente. Em humanos, as principais doenças causadas por *Salmonella enterica* subsp *enterica* são: salmonelose não-tifóide não invasiva (NTS), salmonelose não tifóide invasiva (iNTS) (principalmente associadas aos sorotipos Enteritidis e Typhimurium) e febre tifóide (principalmente associadas aos sorotipos Typhi e Paratyphi), comumente designadas *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Typhi* e *S. Paratyphi* (Chlebicz; Śliżewska, 2018). Estes sorotipos, além de *S. Newport*, e *S.*

Heidelberg (iNTS) são responsáveis por infecções com mais frequência. Cabe ressaltar que alguns sorotipos são patógenos apenas para animais específicos, como *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorotipo Gallinarum e Pullorum (*S. Gallinarum* e *S. Pullorum*), que infectam aves e podem causar prejuízos à avicultura (Yu *et al.*, 2018).

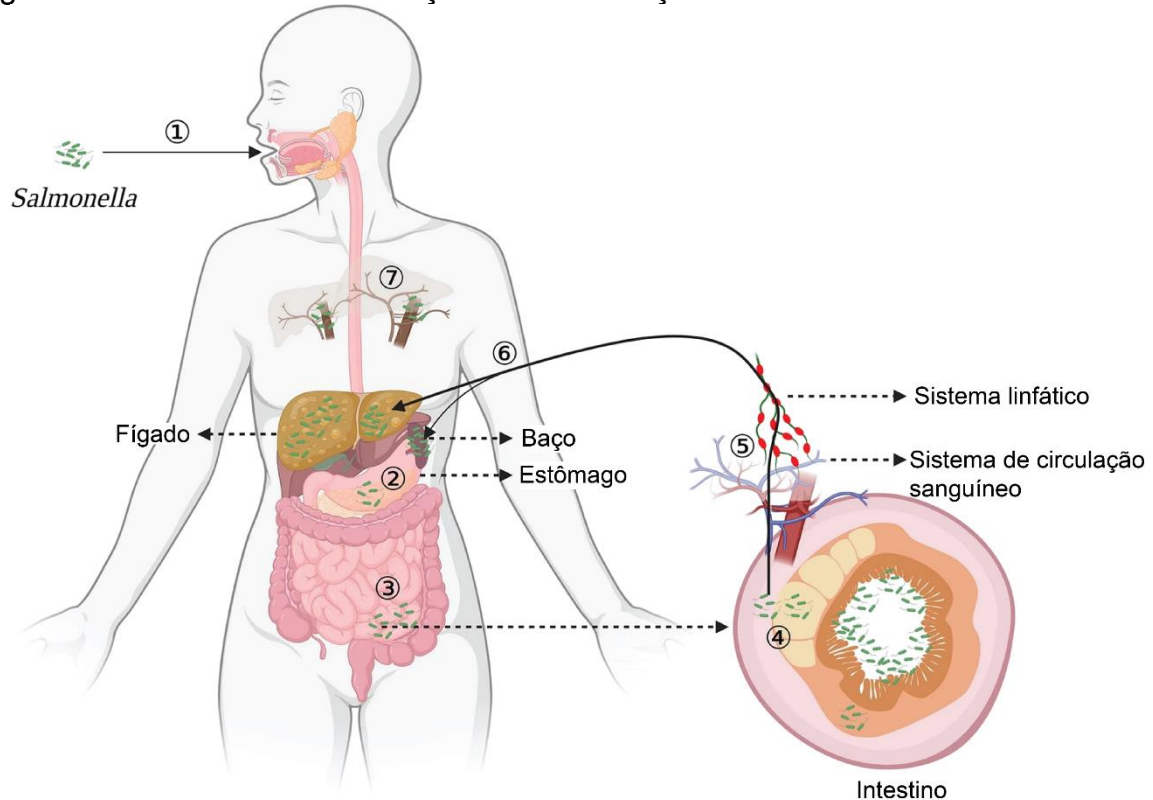
Salmonella enterica subsp. *enterica* sorotipo Heidelberg (denominada como *Salmonella* Heidelberg ou *S. Heidelberg*) foi descoberta na cidade de Heidelberg na Alemanha, em 1933 (HABBS, 1933). No Brasil, tem sido isolada desde 1962, em aves e produtos derivados (Hofer; Silva Filho; Reis, 1997). Em 2016, *S. Heidelberg* estava entre os 12 dos 20 sorotipos de *Salmonella* mais frequentemente relatado em humanos nos Estados Unidos. Em 2011, ocorreram registros de surtos de infecções causadas por este sorotipo em 34 estados norte-americanos, associados a ingestão de carne de peru, afetando 136 pessoas. No mesmo ano, identificou-se um aumento de infecções em Nova York e Nova Jersey, com 190 casos associados ao consumo de fígado de frango grelhado. Entre 2013 e 2014, 634 pessoas foram infectadas por esta bactéria, em sete surtos identificados em 29 estados nos Estados Unidos. Investigações epidemiológicas indicaram que o consumo de frango da marca *Foster Farms* foi a fonte deste surto de infecções (CDC, 2011, CDC, 2014).

No Brasil, entre o período de 2013 a 2022, foram notificados 6.523 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), com 107.513 doentes e 112 óbitos. Entre estas notificações, 24,8% foram identificados como salmoneloses (BRASIL, 2023). No país, somente a febre tifóide é de notificação compulsória, tornando difícil o conhecimento de dados epidemiológicos acerca de sorotipos não tifóides. Adicionalmente, estima-se que há uma subnotificação dos casos de salmoneloses, por razões como casos que não chegam a ser diagnosticados, dificuldade de acesso aos serviços de saúde, não reconhecimento de casos suspeitos e uso precoce de antimicrobianos em situações ainda indefinidas (da Costa, 2020).

A salmonelose destaca-se como uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais significativas globalmente, com uma variedade de fontes alimentares associadas, incluindo carne de aves como frango e peru, além de carne vermelha de bovino e suíno, ovos, frutas, brotos, vegetais diversos e até mesmo produtos alimentícios processados. Sua presença não se limita apenas aos alimentos, estendendo-se também a ambientes aquáticos, naturais e interações entre seres humanos e animais. Após a ingestão de alimentos contaminados por células de

Salmonella, estas podem colonizar tanto o intestino grosso quanto o delgado do hospedeiro (CDC, 2023). A representação esquemática Figura 1 (Li *et al.*, 2023) ilustra o processo de colonização e disseminação da *Salmonella*: 1) A *Salmonella* ingerida entra no sistema gastrointestinal do hospedeiro por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados; 2) Esta bactéria sobrevive ao ambiente altamente ácido do estômago; 3) Posteriormente, coloniza o revestimento do intestino do hospedeiro; 4) Invade as células M e os enterócitos presentes no epitélio intestinal; 5) As *Salmonella* liberadas dessas células são fagocitadas por células fagocíticas, sendo então disseminadas através dos sistemas linfático e circulatório; 6) Ocorre a colonização de órgãos internos, tais como fígado, baço e rins; 7) Finalmente, há um incremento no número de *Salmonella* que penetram nos vasos sanguíneos dos diferentes órgãos afetados, culminando na ocorrência de bacteremia. Os principais sintomas da salmonelose incluem cólicas abdominais, diarreia e febre, os quais tipicamente se manifestam entre 6 a 72 horas após a exposição ao agente patogênico (Centers for Disease Control and Prevention, 2019; Liu *et al.*, 2023).

Figura 2 - Processo de colonização e disseminação da *Salmonella*



Fonte: Traduzido de Liu *et al.* 2023.

A figura ilustra o processo de colonização e disseminação da *Salmonella* no hospedeiro. No item (1) *Salmonella* (2) Sobrevivência ao ambiente (3) Colonização no intestino (4) Invasão as células. (5)

Disseminação pelos sistemas linfático e circulatório. (6) Colonização órgãos internos. (7) Aumento do número de *Salmonella* entra nos vasos sanguíneos

1.2.1 Fatores de virulência

A patogenicidade, é capacidade de um microrganismo de causar a doença, e depende de vários fatores, como, estado imunológico do hospedeiro, espécies microbianas envolvidas na exposição, características genéticas e moleculares associadas a determinantes de virulência e/ou resistência (Biondo, 2022). Para que *Salmonella* colonize seu hospedeiro, passando pelas etapas de adesão, invasão às células e evasão dos mecanismos imunológicos, são necessários atributos específicos, como os fatores de virulência, que desempenham papel crucial nos mecanismos de patogênese/infecciosos. Genes codificantes de fatores de virulência podem ser identificados em diferentes locais do genoma bacteriano, incluindo elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons, integrons, etc.), ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPIs; do inglês: *Salmonella pathogenicity islands*) e DNA associado a infecção por bacteriófagos (Yan *et al.*, 2022). Estão descritos no Quadro 1 os principais fatores de virulência em *Salmonella* spp, os genes associados à codificação destes fatores., bem como suas respectivas funções.

Quadro 1 - Principais fatores de virulência em *Salmonella*

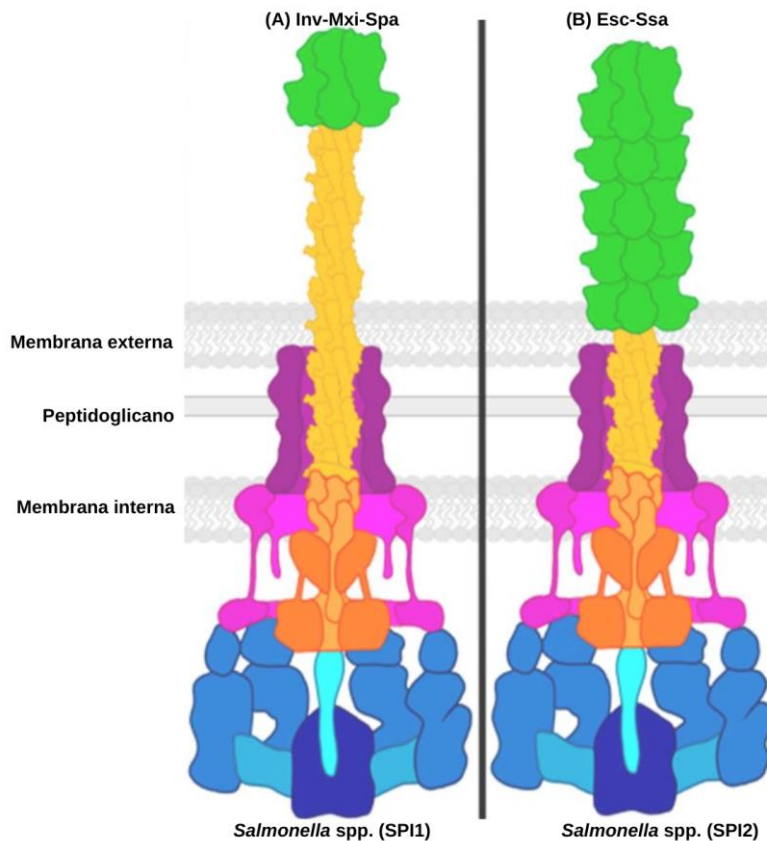
Fatores de virulência	Genes relacionados	Função	Referência
Agf/Csg	<i>csgA</i>	Auxilia na adesão às vilosidades dos enterócitos, e na adesão entre células bacterianas	Collinson <i>et al.</i> , 1996
	<i>csgB</i>		
	<i>csgC</i>		
	<i>csgD</i>		
	<i>csgE</i>		
	<i>csgF</i>		
	<i>csgG</i>		
Lpf	<i>lpfA</i>	Facilita a adesão bacteriana às placas de Peyer	Bäumler; Tsolis; Heffron, 1996.
	<i>lpfB</i>		
	<i>lpfC</i>		
	<i>lpfD</i>		
	<i>lpfE</i>		
MisL	<i>misL</i>	Envolvido nos mecanismos de colonização intestinal	Dorsey <i>et al.</i> , 2005

Fatores de virulência	Genes relacionados	Função	Referência
RatB	<i>ratB</i>	Envolvido nos mecanismos de colonização e infecção intestinal crônica	Kingsley <i>et al.</i> , 2003
ShdA	<i>shdA</i>	Contribui para excreção fecal prolongada	Kingsley <i>et al.</i> , 2000
SinH	<i>sinH</i>	Envolvido na colonização e infecção intestinal	Kingsley <i>et al.</i> , 2003
Pili/Fímbria tipo I	<i>fimA</i>	Medeiam a adesão a uma variedade de receptores de células hospedeiras	Muscas <i>et al.</i> , 1994
	<i>fimC</i>		
	<i>fimD</i>		
	<i>fimF</i>		
	<i>fimH</i>		
	<i>fimI</i>		
	<i>fimW</i>		
	<i>fimZ</i>		
MgtC	<i>mgtC</i>	Importante para a sobrevivência no macrófago, e em meio empobrecido de magnésio	Alix; Blanc-Potard, 2007
Fur	<i>fur</i>	Envolvidos na aquisição de ferro	Tsolis <i>et al.</i> , 1995
PhoPQ	<i>phoP</i>	Regula genes de virulência responsáveis pela adaptação em meio a fatores antimicrobianos	Winfield; Groisman, 2004
	<i>phoQ</i>		
RpoS	<i>RpoS</i>	Função relacionada a resposta a estresse, como limitação de nutrientes	Fang <i>et al.</i> , 1992
Mig-14	<i>mig-14</i>	Contribui para a virulência, conferindo capacidade das bactérias patogênicas de resistir à morte por peptídeos antimicrobianos que fazem parte da defesa imune inata do hospedeiro.	Brodsky <i>et al.</i> , 2002
Sistema de Secreção do tipo III – T3SS (codificado na SPI-1)	<i>hilA</i>	Contribuem diretamente para a capacidade invasiva da bactéria, participando na interação inicial da bactéria com células epiteliais intestinais.	Galán, 2001
	<i>invA</i>		
	<i>invC</i>		
	<i>invG</i>		
	<i>orgA</i>		
	<i>orgB</i>		
	<i>prgH</i>		
	<i>prgI</i>		
	<i>prgJ</i>		
	<i>prgK</i>		
	<i>spaO</i>		
<i>spaP/Q/R</i>			
	<i>sseA</i>		Uchiya <i>et al.</i> , 1999

Fatores de virulência	Genes relacionados	Função	Referência
Sistema de Secreção do tipo III – T3SS (codificado naSPI-2)	<i>sseB</i>	Atuam na sobrevivência e multiplicação da bactéria no ambiente intracelular da célula hospedeira, contribuindo para infecção sistêmica.	
	<i>sseC</i>		
	<i>sseE</i>		
	<i>sseF</i>		
	<i>sseG</i>		
	<i>ssrA</i>		
	<i>ssrB</i>		
Rck	<i>rck</i>	Confere resistência ao sistema complemento	Heffernan <i>et al.</i> , 1992
SodCI	<i>sodCI</i>	Protege as bactérias do dano oxidativo exógeno	Fang <i>et al.</i> , 1992)
SpvB	<i>spvB</i>	Contribui na disfunção da integridade da barreira epitelial intestinal	Sun <i>et al.</i> , 2020

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

As SPIs são grandes cassetes de genes inseridos no genoma bacteriano, e que carregam genes de virulência, provavelmente adquiridos por transferência horizontal de genes. Atualmente, estão identificadas cerca de 24 SPIs neste gênero, embora nem todas foram validadas experimentalmente para contribuir com fenótipos de virulência. As mais estudadas são a SPI-1 e SPI-2, uma vez que os mecanismos de invasão de *Salmonella* spp. às células do hospedeiro estão associados a presença destas ilhas (Lerminiaux; Mackenzie; Cameron, 2020). Ambas codificam o sistema de secreção tipo III (T3SS), considerado o mais importante fator de virulência da *Salmonella*, capaz de injetar proteínas bacterianas efetoras, necessárias para a invasão intestinal e a produção de enterite, através da translocação das membranas bacterianas e do hospedeiro, no citoplasma das células hospedeiras, ou de secreção de moléculas no meio intracelular (Lou *et al.*, 2019). O SPI1 codifica um T3SS do grupo Inv-Mxi-Spa que promove a captação bacteriana e invasão celular, enquanto o SPI2 codifica um T3SS do grupo Esc-Ssa, essencial para a sobrevivência intracelular, com uma ponta de agulha mais longa chamada de filamento que facilita a adesão, persistência e passagem de proteínas através do muco intestinal. Além disso, o T3SS SPI2 de *S. enterica* previne o tráfego endocítico e a maturação do fagossomo, permitindo a sobrevivência dentro dos macrófagos. (Hotinger; Pendergrass; May, 2021)



Fonte: Traduzido e adaptado de Hotinger; Pendergrass; May (2021).

Os plasmídeos por sua vez têm papel importante na dispersão e aquisição de genes de virulência e resistência a antimicrobianos. Estudos relatam que grande parte das cepas de *Salmonella* possuem plasmídeos carregando genes de virulência específicos, como o lócus denominado spv (do inglês *Salmonella plasmid virulence*), que auxilia na multiplicação desse patógeno dentro do sistema reticuloendotelial (Jajere, 2019). Bacteriófagos também tem sua contribuição na virulência bacteriana, mediando a transferência horizontal de genes através de um mecanismo conhecido como transdução, onde o DNA bacteriano é transferido de uma célula doadora a uma célula receptora a partir da infecção fágica (Torres-Barceló, 2018).

1.2.2 Resistência aos antimicrobianos e sanitizantes

O desenvolvimento de resistência bacteriana é um processo complexo, entre as células bacterianas e as moléculas dos antimicrobianos. (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020). Quando as bactérias são expostas as moléculas de antimicrobianos, essas moléculas precisam atingir uma concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor quantidade de um fármaco que impede o crescimento visível de

bactérias, visando alcançar uma concentração não tóxica para maximizar a cura e prevenir resistência. No entanto, concentrações sub-CIM de antimicrobianos podem promover o desenvolvimento de resistência por meio de processos genéticos como transferência horizontal de genes (HGT), recombinação e mutagênese. Diversas classes de antimicrobianos em sub-CIM, como fluoroquinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos, podem induzir respostas genéticas como SOS e RpoS, que levam a alterações genéticas associadas ao movimento de elementos móveis (prófagos, ICEs e transposons, que carregam determinantes de resistência e virulência), ativação de recombinases (integrases e transposases) e aumento na taxa de mutagênese durante a replicação cromossômica devido à indução de DNA polimerases propensas a erros e supressão da reparação de incompatibilidades (Andersson; Hughes, 2014)..

Em *Salmonella* as fluoroquinolonas que foram incluídas a partir de 1980 na Europa para o tratamento da salmonelose em medicina veterinária, desenvolveu resistência por mutação cromossômica e disseminação epidêmica da cepa mutante pela disseminação clonal. Devido ao surgimento de cepas resistentes à fluoroquinolona, nos últimos anos, a ceftriaxona e a azitromicina tornaram-se a droga secundária de escolha para o tratamento da febre tifoide.

Já em *Salmonella* Heidelberg está frequentemente ligado a resistentes a cefalosporinas de terceira geração, tetraciclinas e sulfonamidas. Esses fenótipos de resistência são comumente associados ao transporte da *bla*CMY-2, *tet*(A) e *sul*2 respectivamente (Alenazy, 2022; Alikhan *et al.*, 2022).

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características fisiológicas e/ou estruturais naturais do microrganismo. Já a resistência adquirida ocorre quando uma população bacteriana inicialmente suscetível a antimicrobianos, adquire genes de resistência através de mecanismos de Transferência Horizontal de Genes (HGT) e mutações. Os genes de resistência a antimicrobianos são principalmente transmitidos de uma célula doadora para uma célula receptora através dos mecanismos de transformação, transdução ou conjugação. A conjugação é mediada por plasmídeos ou elementos conjugativos integrativos (transposon conjugativo) e pelo pilus conjugativo; a transdução é mediada por bacteriófagos; e a transformação está associada a captação de fragmentos de DNA extracelular (Chaudhari; Singh; Kodgire, 2023). Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos podem ser classificados em quatro tipos principais:

I. Inativação dos antimicrobianos: a inativação ocorre por degradação enzimática da droga. Afeta comumente antimicrobianos que possuem o anel beta-lactâmico, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. O exemplo mais clássico são as enzimas beta-lactamases, que hidrolisam o anel beta-lactâmico seletivamente. (Chaudhari; Singh; Kodgire, 2023).

II. Bomba de efluxo: as bombas de efluxo medeiam a resistência através da exportação de compostos antimicrobianos pelas membranas celulares, do citoplasma para o meio externo, impedindo que alcancem uma concentração efetiva. Em Gram-negativos como, *Salmonella*, o envelope celular engloba duas membranas diferentes, a externa e a interna, divididas por um periplasma. Essas bombas de efluxo tripartite envolvem diversas proteínas transportadoras, onde os antimicrobianos são transportados da membrana interna para o espaço periplasmático e, em seguida, através da membrana externa são exportados para fora da célula.

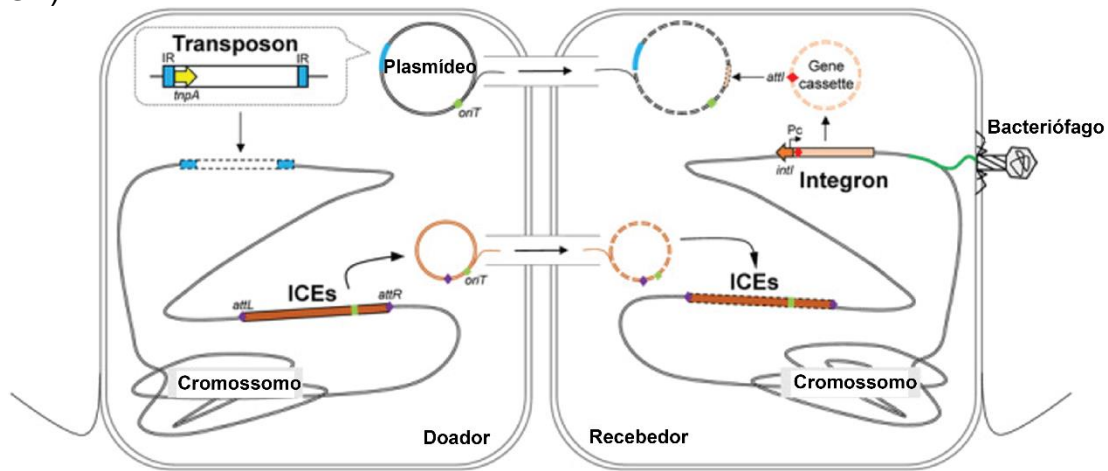
III. Alteração no sítio alvo do antimicrobiano: alguns antimicrobianos como os pertencentes aos grupos dos aminoglicosídeos, tetraciclinas e macrolídeos, interferem em alvos específicos das células bacterianas (ribossomos), que impedem suas funções. Quando as espécies bacterianas desenvolvem mecanismos para alterar ou modificar o sítio alvo do antimicrobiano, podem neutralizar os efeitos dos antimicrobianos, sem que ocorram alterações significativas nas funções celulares (Chaudhari; Singh; Kodgire, 2023; Tortora; Funke; Case, 2016). Por exemplo, a síntese de variantes das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que possuem afinidade fraca com antimicrobianos β -lactâmicos, já foram relatadas em *Salmonella*. Essas variantes alternativas de PBPs, denominadas PBP2_{SAL} ou PBP3_{SAL}, demonstraram estar associadas a resistência a cefalosporinas, como a ceftriaxona (Castanheira *et al.*, 2020).

IV. Alteração da permeabilidade da membrana celular: Mecanismo principalmente relacionado a modificação da expressão de porinas da membrana plasmática, que atuam na entrada de substâncias antimicrobianas. Essa resistência pode ser alcançada através da expressão reduzida e mutações nas proteínas porinas, diminuindo o influxo de antimicrobianos hidrofílicos como β -lactâmicos, tetraciclinas e fluoroquinolonas (Chaudhari; Singh; Kodgire, 2023).

A resistência aos antimicrobianos adquirida pelas bactérias através de mutações no genoma ou através de mecanismos de transferência horizontal de

genes, geralmente envolve elementos genéticos móveis (MGE; do inglês *Mobile genetic elements*) (Johansson *et al.*, 2021), que também estão relacionados em grande parte com a captura, acúmulo e disseminação de genes de virulência (Partridge *et al.*, 2018). Podemos observar na Figura 2 de Tokuda; Shintani, (2024), os MGE e seu papel na mediação da transferência horizontal de genes (HGT), promovendo a mobilidade intracelular e intercelular do DNA, desempenhando papel importante na evolução do genoma. Entre os MGEs estão os Elementos conjugativos (ICEs), podem ser transmitidos entre diferentes células, e podem carregar MGEs adicionais como, transposons (Tn) que são pequenos trechos do DNA, que podem mover-se para novos locais ou diferentes locais de DNA de uma única célula, e sequências de inserção (IS). Os integrons (In) usam recombinação sítio-específica para mover genes entre locais definidos. Já bacteriófagos podem infectar células microbianas, introduzindo seu DNA no cromossomo do hospedeiro, por transdução. Os plasmídeos por sua vez, são replicons extracromossômicos circulares ou lineares, que podem transmitir genes por conjugação (Partridge *et al.*, 2018; Tokuda; Shintani, 2024).

Figura 3 - Elementos genéticos móveis (MGEs) e transferência horizontal de genes (HGT)



Fonte: Traduzido de Tokuda; Shintani, 2024.

A figura ilustra Elementos genéticos móveis (MGEs) e seu papel na mediação da transferência horizontal de genes (HGT) dentro das células microbianas e entre as células.

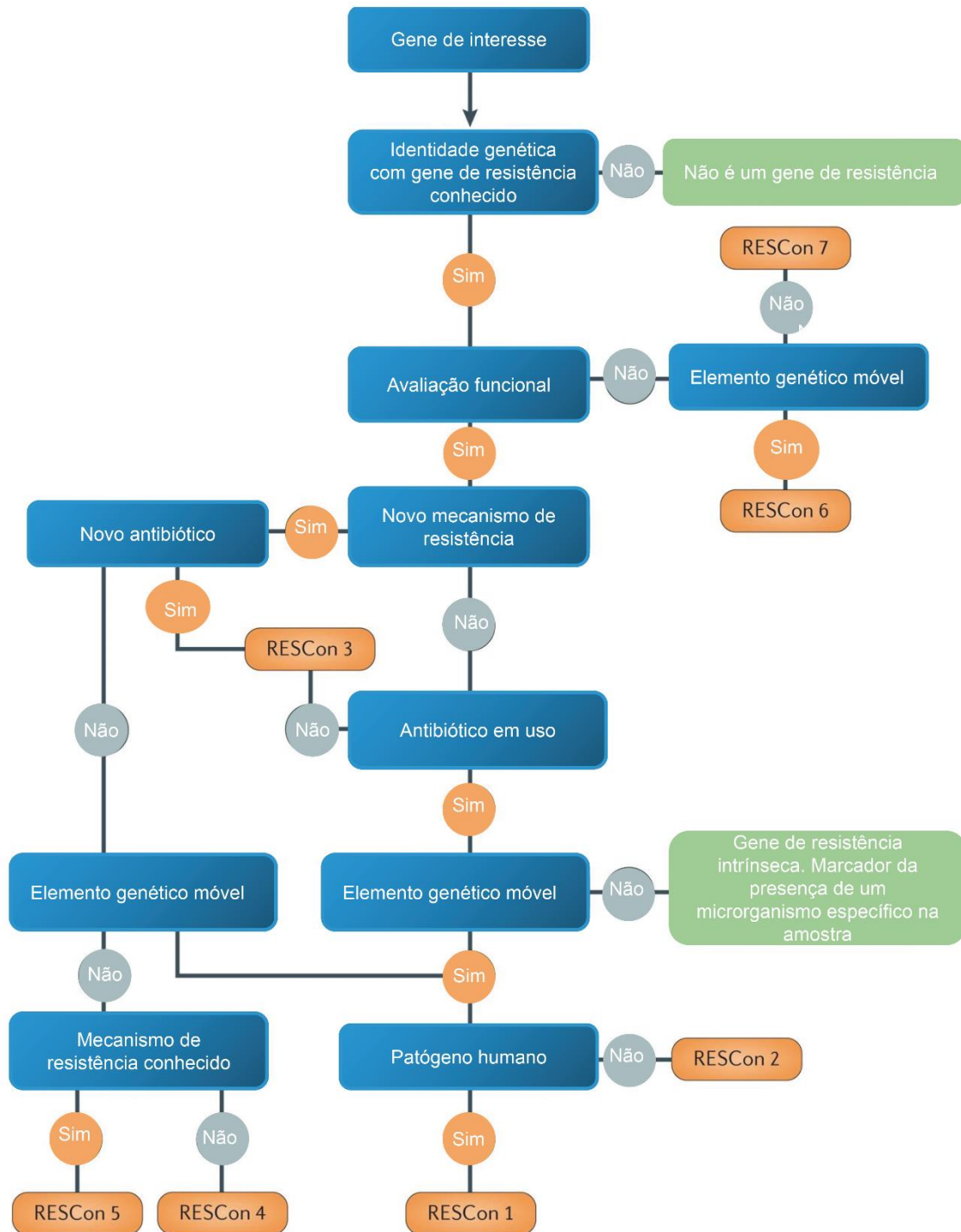
Com os diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos e o elevado risco de falhas de tratamento e infecções recidivas, que são importantes impulsionadores do aumento de morbidade e mortalidade, a ameaça imposta pela resistência aos antimicrobianos tem sido bem reconhecida. As medidas de

biossegurança têm papel crucial na proteção de animais e seres humanos contra substâncias biológicas ou bioquímicas nocivas. Em conjunto com os sanitizantes, formam a melhor proteção contra o crescimento bacteriano indesejado na indústria agrícola e de processamento de alimentos (Mc Carlie; Boucher; Bragg, 2020). Entretanto, mesmo desempenhando papel importante na contenção da proliferação e disseminação desses patógenos, é cada vez mais recorrente a pressão seletiva exercida por sanitizantes e desinfetantes, que contribui para a seleção e disseminação da resistência bacteriana a estes produtos na cadeia alimentar humana e animal (Deng *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2020).

Entre os principais sanitizantes utilizados na avicultura estão os compostos de amônia quaternária, compostos de cloro e iodo, cresol, fenol-formaldeído, glutaraldeído e peróxido de hidrogênio. O mais largamente utilizado são os compostos de amônia quaternária (QACs; do inglês: *quaternary ammonium compounds*) e o hipoclorito de sódio (Bassani *et al.*, 2021). Estima-se que o uso excessivo de sanitizantes no cuidado com os animais tenha potencial de promover também resistência aos antimicrobianos, através de um mecanismo de co-seleção, que pode ocorrer por co-resistência quando a seleção de um gene promove a manutenção de outro gene de resistência; ou por resistência cruzada, em que o gene de resistência pode oferecer proteção contra múltiplos produtos químicos (Mustafa *et al.*, 2021).

Com isso, é essencial o planejamento de estratégias de mitigação, avaliando os riscos associados a fontes ambientais e rotas de disseminação de resistência (Huemer *et al.*, 2020; Vikesland *et al.*, 2017). A classificação de risco em resistomas proposta por Martínez; Coque; Baquero, (2015), (Figura 3), analisa os genes de resistência a antimicrobianos encontrados em estudos metagenômicos em diferentes categorias, dependendo dos riscos associados à saúde pública, e seu risco de conferirem resistência a patógenos humanos.

Figura 4 - Classificação dos riscos de detecção de genes de resistência em resistomas



Fonte: Traduzido de Martínez; Coque; Baquero, 2015.

A figura mostra um fluxograma de decisão de riscos para a saúde pública de encontrar um determinado gene de resistência em um determinado ecossistema iniciando quando um gene de resistência é detectado por ter homologia substancial com genes de resistência conhecidos, com maior risco genes que conferem resistência aos antimicrobianos atualmente em uso e que estão em elementos genéticos móveis.

A classificação dos riscos para a saúde pública de genes de resistência em ecossistemas varia de RESCon 1 a RESCon 7, de acordo com o protocolo de Martínez; Coque; Baquero, (2015), com cada categoria representando diferentes níveis de ameaça à eficácia dos tratamentos antimicrobianos. No topo da escala, RESCon 1 abrange genes conhecidos por contribuir para falhas terapêuticas em patógenos bacterianos humanos, enquanto RESCon 7 inclui genes previstos para conferir resistência, sem associação conhecida com elementos genéticos móveis. Entre esses extremos, RESCon 2 engloba novos genes de resistência em bactérias não patogênicas, enquanto RESCon 3 abrange genes que conferem resistência a antimicrobianos ainda não amplamente utilizados na terapia clínica. RESCon 4 trata de genes que conferem resistência a agentes antimicrobianos em uso clínico, mas cujo mecanismo de resistência ainda não foi totalmente elucidado. Classificar genes de resistência com relação ao seu risco é importante para mostrar que a presença do gene em um determinado ambiente tem o potencial de trazer, de fato, impactos negativos para a saúde animal e humana. Com esta informação, há necessidade de se desenvolver estratégias mais eficientes de prevenção e controle, visando preservar a eficácia dos antimicrobianos e proteger a saúde pública contra a disseminação da resistência aos antimicrobianos.

1.3 SALMONELLA NO CONTEXTO DE SAÚDE ÚNICA.

A saúde única é uma abordagem holística e integradora que busca otimizar sustentavelmente a saúde de seres humanos, animais, plantas e ecossistemas, reconhecendo sua estreita interconexão (Centers for Disease Control and Prevention, 2023a). Um dos fundamentos da saúde única são as zoonoses, as quais ao longo do tempo têm desencadeado diversos surtos e pandemias, resultando em inúmeras mortes e consequências significativas para a saúde pública, sociedade e economia (Horefti, 2023).

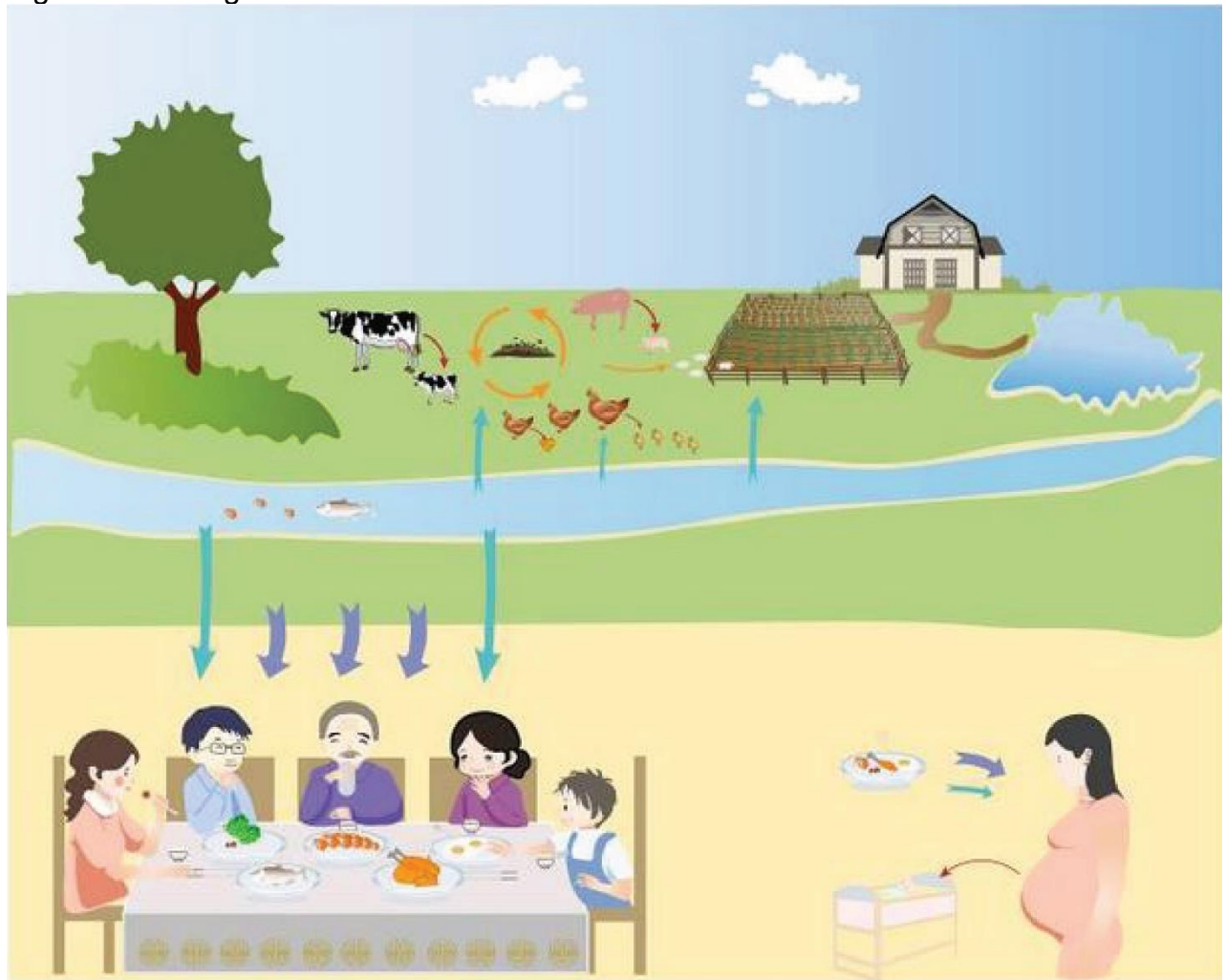
Dentre as zoonoses, a salmonela não tifoide (NTS) destaca-se como uma das principais causadoras de doenças transmitidas por alimentos globalmente. A fonte predominante de casos de salmonelose em humanos está associada a produtos de origem animal contaminados, especialmente carne insuficientemente cozida e ovos crus (Centers for Disease Control and Prevention, 2014). Tais infecções alimentares podem ocorrer de forma esporádica ou como surtos, caracterizados quando dois ou

mais casos estão epidemiologicamente relacionados por indivíduos, tempo e espaço, além de serem genotipicamente semelhantes, conforme métodos de genotipagem (Ferreira *et al.*, 2021).

Acredita-se que a alta virulência do NTS derive da expressão de genes associados à virulência localizados em ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPIs). A patogenicidade do NTS é mediada por dois Sistemas de Secreção Tipo III (TTSSs) distintos, codificados por SPI-1 e SPI-2. Enquanto os genes SPI-1 estão envolvidos na invasão da célula hospedeira e na regulação da resposta imune, os genes SPI-2 estão associados à sobrevivência e replicação intracelular. Além disso, o surgimento de cepas multirresistentes de *Salmonella* (MDR) pode complicar o tratamento de infecções humanas, representando um desafio significativo no controle da doença (Tang *et al.*, 2023).

No contexto da saúde única, compreender a ecologia da transmissão de *Salmonella* (Figura 4) é crucial para sua vigilância e controle, dada a complexidade das rotas de transmissão entre animais e humanos, aumentando o risco de infecção e transmissão vertical (Liu *et al.*, 2023). A transmissão vertical pode estar relacionada a vetores como roedores e insetos, bem como à transmissão entre espécies, incluindo aves, bovinos e suínos através de alimentos contaminados ou do ambiente, resultante de práticas inadequadas de manejo de resíduos agrícolas e esterco, culminando em poluição ambiental em ambientes aquáticos (Liu *et al.*, 2023).

Figura 5 - Ecologia da transmissão de *Salmonella*



- Transmissão por via aquática
- Transmissão alimentar
- Transmissão entre espécies
- Transmissão vertical

Fonte: Traduzido de Liu *et al.* (2023).

A figura ilustra ecológico da transmissão de *Salmonella*. As setas em verde indicam transmissão por via aquática, setas roxas transmissão alimentar, setas laranja transmissão entre espécies e setas vermelhas transmissão vertical.

Estudos e intervenções baseados na abordagem de saúde única têm o potencial de prevenir surtos de zoonoses, melhorar a segurança alimentar, reduzir infecções associadas à resistência aos antimicrobianos e promover a saúde humana e animal (Centers for Disease Control and Prevention, 2023b). O monitoramento da disseminação de cepas bacterianas contribui para determinar a relação genética entre elas e identificar linhagens com alto potencial patogênico, diferenciando e rastreando espécies bacterianas associadas a surtos de doenças infecciosas, especialmente na

vigilância de patógenos de origem alimentar (Paramithiotis; Hadjilouka; Drosinos, 2018).

A técnica de sequenciamento do genoma completo (WGS: *Whole genome sequencing*) permite a investigação simultânea de sorotipos, perfil de resistência aos antimicrobianos e sanitizantes, perfil de virulência e tipagem molecular em um único fluxo de trabalho, oferecendo resolução suficiente para rastrear surtos causados por *Salmonella*. Essa abordagem tem sido utilizada para monitorar e rastrear a prevalência de *Salmonella*, que frequentemente exibe alto grau de similaridade genética (Di Marcantonio *et al.*, 2020; Koutsoumanis *et al.*, 2019).

A partir disso, este trabalho teve como objetivo a análise genômica de cepas de *Salmonella* Heidelberg isoladas da cadeia de produção de frango, a fim de identificar potenciais riscos para saúde animal e humana. A hipótese foi de que os genomas apresentam uma distribuição similar de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos e sanitizantes, sugerindo a disseminação de isolados geneticamente relacionadas em diferentes granjas, podendo haver surtos relacionados. Além disso, uma parcela destes genes encontra-se em elementos genéticos móveis, aumentando o risco de disseminação destes para novas cepas e espécies bacterianas.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os fatores e genes de resistência em cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Heidelberg, isoladas da cadeia de produção de frango, visando avaliar a relação com surtos

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detecção *in silico* de possíveis surtos nas granjas a partir do MLST e de análise filogenética com base em polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs).
- Identificação *in silico* de genes codificantes de resistência aos antimicrobianos e sanitizantes
- Identificação *in silico* de genes codificantes de fatores de virulência

- Identificação *in silico* de sequências relacionadas a elementos genéticos móveis (MGE)
- Mapeamento *in silico* de sequências associadas a bacteriófagos
- Verificar a presença de genes codificantes de resistência e virulência nos MGE encontrados e avaliar possíveis riscos de disseminação.

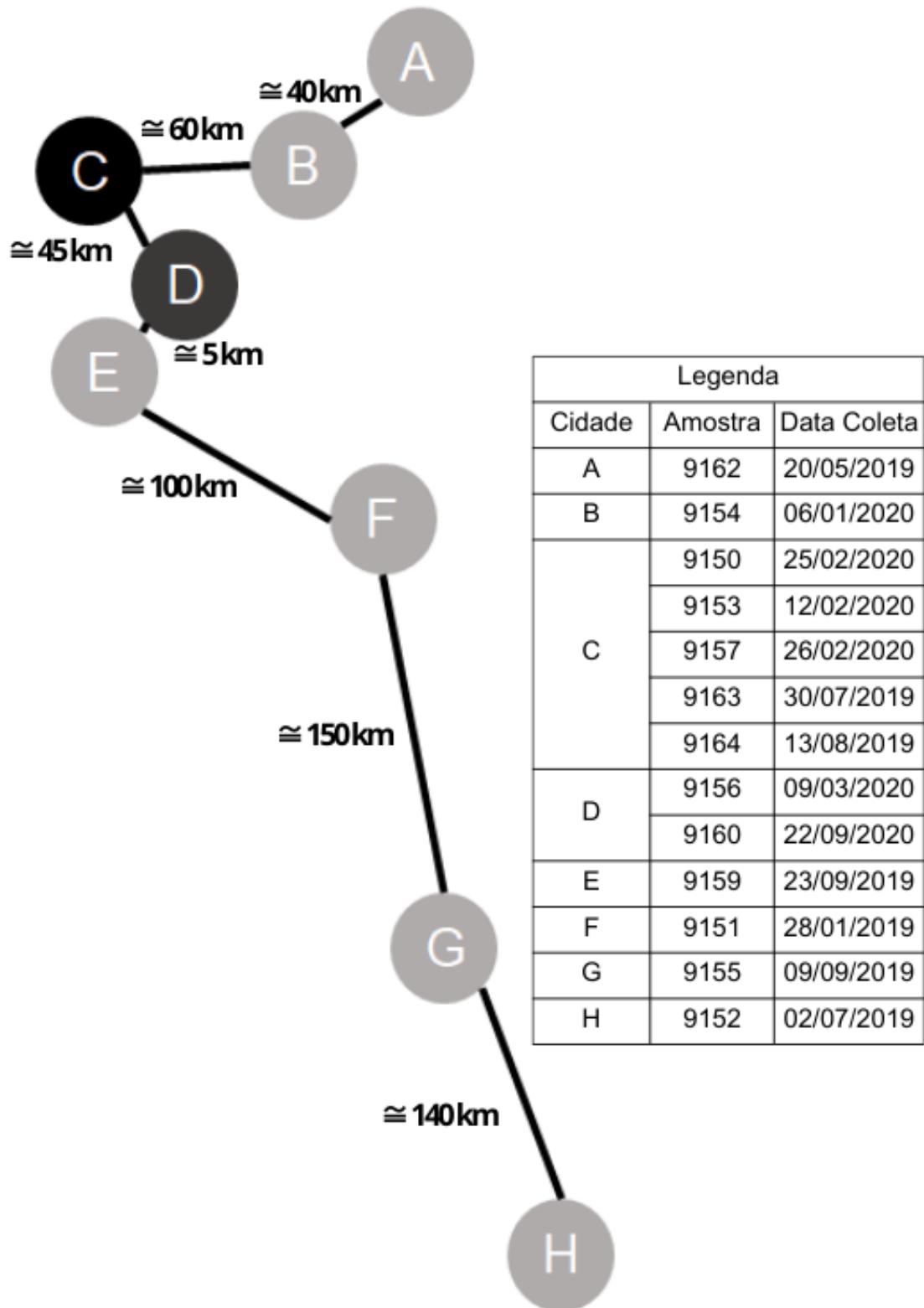
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GENOMAS BACTERIANOS

Este estudo analisou 13 isolados de *S. Heidelberg* coletados em 2019 e 2020, de coberturas de sapatos descartáveis utilizados na cama de frango de fazendas de criação de frangos de corte no Brasil. Devido a restrições de privacidade impostas pela empresa colaboradora, as localizações específicas das fazendas não foram fornecidas. No entanto, a Figura 5 ilustra a separação espacial (em quilômetros; km) entre as localizações das fazendas.

As coletas, processamento das amostras e o sequenciamento foram feitos em um trabalho anterior (Soares *et al.*, 2023). Resumidamente, os isolados foram inicialmente inoculados pelo método de esgotamento em ágar, em placas Petri contendo ágar Infusão Cérebro-Coração (BHI) (Kasvi®, Brasil). Após incubação a 37°C/20h, algumas colônias isoladas foram coletadas para extração de DNA. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de purificação de DNA genômico Wizard® (Promega®, EUA). A concentração e pureza do DNA foram avaliadas utilizando um espectrofotômetro Jasco V-530 (Jasco Inc., Tóquio, Japão).

Figura 6 – Informações gerais sobre a localização e data de coleta dos isolados bacterianos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A figura ilustra a distância aproximada (em Km) entre oito cidades representadas por letras (A-H). A legenda à direita indica a data de coleta e o número do isolado coletado em cada cidade.

As bibliotecas de DNA foram construídas utilizando o kit de preparação de bibliotecas de DNA Nextera® XT (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA) e quantificadas utilizando o kit de quantificação de bibliotecas KAPA (Roche Sequencing Solutions Inc., CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento do genoma foi realizado no sistema Illumina MiSeq® (Illumina Inc.), para gerar leituras brutas usando sequenciamento em pareamento de 300 ciclos (2 × 150 pb) e sequenciamento em pareamento de 500 ciclos (2 × 250 pb). O OneShotWGS (Coil; Jospin; Darling, 2015) foi usado para a montagem. As montagens foram então processadas pelo GMCloser (Tritt *et al.*, 2012). O QUAST foi empregado para avaliar a qualidade de todas as sequências e leituras com pontuações PHRED abaixo de 20 foram descartadas (Huang; Madan, 1999). O sequenciamento e a montagem de DNA foram realizados pela Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, SC, Brasil), características dos genomas no Quadro 6. Os dados foram depositados no GenBank sob o número de acesso ao BioProjeto PRJNA891289. Genes funcionais foram anotados e classificados usando o servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008). A representação visual da estrutura do genoma foi gerada usando o DNAPlotter versão 18.2.0 (Carver *et al.*, 2009).

3.2 INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEL SURTO

Em todas as análises genômicas, foram utilizados os *drafts* genomas dos isolados. A investigação de possíveis surtos seguiu a definição e metodologia delineadas por Ferreira *et al.*, 2021, com algumas modificações. Da mesma forma que Ferreira e colaboradores, um surto é definido por dois ou mais casos epidemiologicamente ligados através de indivíduo, tempo e espaço, e genotipicamente ligados através de métodos de genotipagem. Um caso esporádico é definido como um caso sem ligação epidemiológica e/ou genotípica. Diferentemente do estudo anterior, a identificação da sequência tipo (ST) dos isolados foi realizada utilizando a plataforma MLST 2.0 (Larsen *et al.*, 2012), e o número de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foi analisado usando MEGA v.11.0.13 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021).

A árvore filogenética foi gerada no REALPHY v.1.13 (Bertels *et al.*, 2014), de acordo com Ferreira *et al.* 2021. Nesta ferramenta, a construção da árvore é baseada

no método de busca de topologia de árvores NNIs (do inglês: *Nearest Neighbor Interchange*), para investigar a relação evolutiva entre as sequências nucleotídicas analisadas. Inicialmente, as sequências foram submetidas a uma análise de substituição de nucleotídeos utilizando o modelo GTR (do inglês: *General Time Reversible*), que permite capturar a complexidade das taxas de substituição e heterogeneidade entre pares de nucleotídeos. Durante a execução do algoritmo/software da ferramenta, foi aplicado um número específico de seed aleatório (674478) para garantir a replicabilidade dos resultados, e minimizar os efeitos da aleatoriedade nos processos de busca e otimização. O método NNIs foi então empregado para iterativamente buscar diferentes configurações topológicas da árvore filogenética.

Para análises comparativas adicionais, os genomas também foram submetidos à CSIPhylogeny v.1.4 (Kaas *et al.*, 2014) com configurações padrão, permitindo uma comparação direta de filogenias baseadas em SNP. Com base nos critérios estabelecidos por Ferreira *et al.*, 2021, isolados com ≤ 22 SNPs são considerados geneticamente indistinguíveis, sugerindo um cenário de surto. Um isolado esporádico terá mais de 61 SNPs (Quadro 2). A árvore filogenética e as análises genômicas subsequentes foram conduzidas utilizando o genoma de referência de *S. Heidelberg* isolado de aves (número de acesso ao GenBank GCA_016454385.1 e ASM397152v1) como o modelo genético primário.

Quadro 2 - Classificação distância SNP

SNPs	Classificação
≤ 22	Indistinguíveis
23-30	Estreitamente relacionados
31-60	Possivelmente intimamente relacionados
> 61	Isolados esporádicos

3.3 IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Genes de resistência a antimicrobianos foram detectados utilizando os drafts genomas montados como entrada através do ARG-ANNOT v.6 (Gupta *et al.*, 2014), empregando configurações padrão. Apenas resultados que atenderam aos critérios de $\geq 98\%$ de identidade e $\geq 100\%$ de cobertura, validados cruzadamente pelo ResFinder v4.1 (Bortolaia *et al.*, 2020; Johansson *et al.*, 2021) ou pelo Resistance Gene Identifier (RGI) v5.2.0 do CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (Alcock *et al.*, 2020), foram considerados.

3.4 IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE GENES DE RESISTÊNCIA À SANITIZANTES

Os genes de resistência aos sanitizantes foram preditos *in silico* com base em níveis de similaridade dos genes listados no quadro 3, selecionados de acordo com a literatura científica, a partir do algoritmo BLASTn (Altschul, 1990), utilizando valores de corte de $\geq 98\%$ de identidade e $\geq 100\%$ de cobertura, para determinar níveis de similaridade e cobertura, validados cruzadamente pelo ResFinder v4.1 (Bortolaia *et al.*, 2020).

Quadro 3 - Genes de resistência a sanitizantes

Gene	Acesso GenBank	Referência
<i>qacA</i>	MK040370	ADDETIA <i>et al.</i> 2018.
<i>qacE</i>	X68232	PAULSEN <i>et al.</i> 1993.
<i>qacEΔ1</i>	JN566044	GARZA-RAMOS <i>et al.</i> 2012.
<i>qacF</i>	KC285363	ZOU <i>et al.</i> 2014.
<i>qacG</i>	FJ950725	LI <i>et al.</i> 2010.
<i>qacH</i>	FJ160769	VINUE <i>et al.</i> 2008.
<i>qacL</i>	OM517177.1	EL-BAZ <i>et al.</i> 2022.
<i>sugE(C)</i>	X69949	GREENER <i>et al.</i> 1993.
<i>sugE(P)</i>	KC285365	ZOU <i>et al.</i> 2014.
<i>mdfA</i>	Y08743	EDGAR <i>et al.</i> 1997.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

3.5 IDENTIFICAÇÃO IN SILICO GENES DE VIRULÊNCIA

Os genes de virulência foram identificados no banco de dados para *Salmonella enterica* subsp *enterica* da plataforma online e gratuita do Virulence Factor Database (VFDB-2022) (Liu *et al.*, 2022), utilizando a configuração padrão (*default*).

3.6 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS (MGE)

Para identificação de MGE, os genomas foram analisados contra o banco de dados da ferramenta MobileElementFinder 1.0.3 (Johansson *et al.*, 2021), que conta com 4452 elementos conhecidos, somada a anotação de genes de resistência do ResFinder v4.1 (Bortolaia *et al.*, 2020) e detecção de plasmídeos pelo PlasmidFinder 2.1 (Carattoli Alessandra and Hasman, 2020). Adicionalmente, essa análise também baseou-se nos dados de anotação genômica, para aumentar a confiabilidade da identificação dos MGE (Aziz *et al.*, 2008). Além disso, cada um dos 13 genomas foi submetido à análise PHASTER (Banco de dados mais recente; 22 de Dezembro, 2020) (Arndt *et al.*, 2016). identificar sequências relacionadas a fagos, com consideração exclusiva dada a fagos classificados como "completos" ou "intactos" para investigação adicional

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INVESTIGAÇÃO DE SURTO

De acordo com a análise de possível surto proposta, inicialmente foi realizada a sequência tipo (ST) dos genomas. Todas as amostras, à exceção da 9163, foram classificadas como ST 15 (Quadro 4). O genoma 9163 tem 93.7% de chance de ser um ST15 segundo a ferramenta utilizada, provavelmente por alguma limitação no sequenciamento ou montagem do genoma.

Quadro 4 - Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Locus (MLST) para investigação de surtos

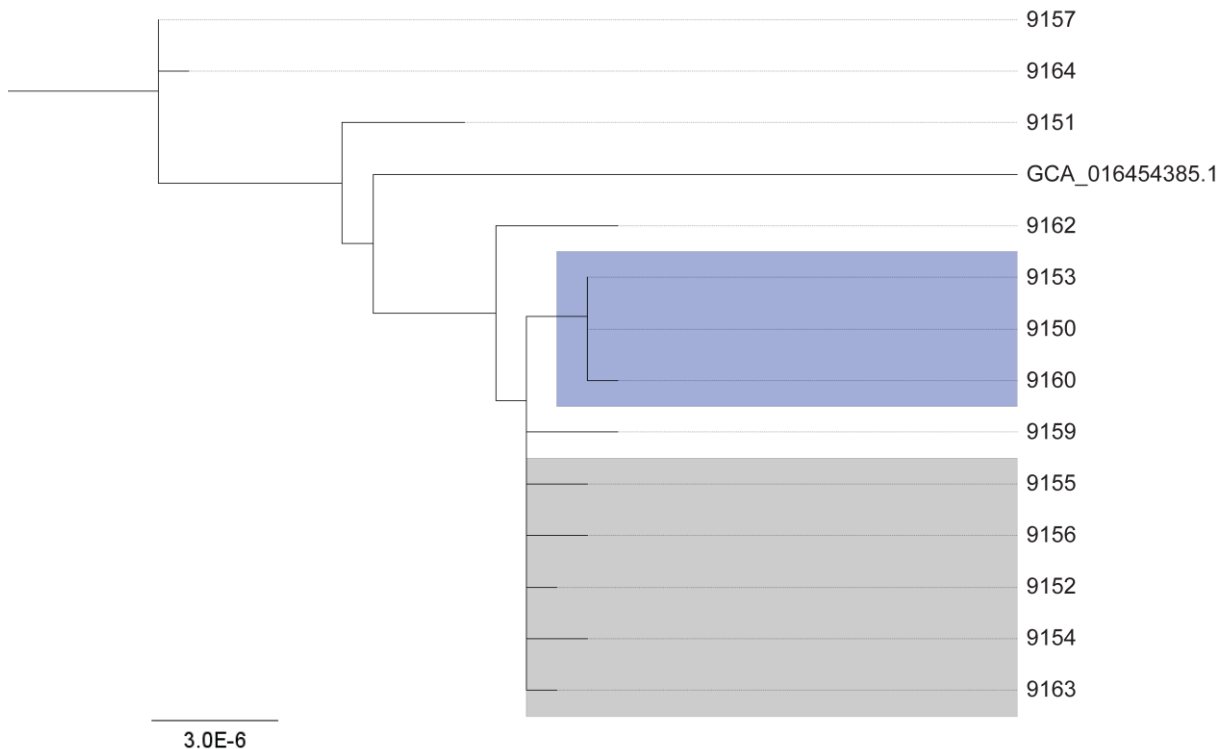
Isolados	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	ST
9150	2	7	9	9	5	9	12	15
9151	2	7	9	9	5	9	12	15
9152	2	7	9	9	5	9	12	15
9153	2	7	9	9	5	9	12	15
9154	2	7	9	9	5	9	12	15
9155	2	7	9	9	5	9	12	15
9156	2	7	9	9	5	9	12	15
9157	2	7	9	9	5	9	12	15
9159	2	7	9	9	5	9	12	15
9160	2	7	9	9	5	9	12	15
9162	2	7	9	9	5	9	12	15
9163	2		9	9	5	9	12	15*
9164	2	7	9	9	5	9	12	15

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Locus (MLST). Análise MLST pelo *Center for Genomic Epidemiology* (CGE), retornou à predição da sequência tipo (ST) dos genomas. Colunas indicam respectivamente ID de *Salmonella*, alelos e o ST. *ST mais próximo da amostra 9163 é 15 não foi encontrado o alelo dnaN.

A árvore filogenética, reconstruída por meio de análise comparativa de SNPs do genoma central usando REALPHY e confirmada no CSIphylogeny, revela genéticos intimamente relacionados, sendo identificados 3 grupos de isolados (Figura 7).

Figura 7 - Árvore filogenética com base na análise comparativa de SNPs -

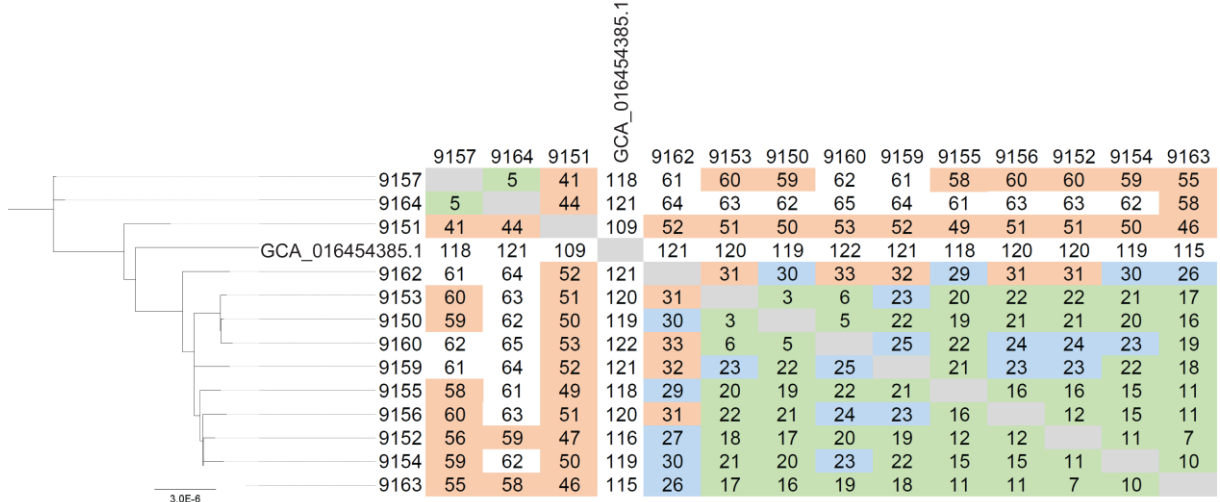


Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Árvore filogenética do Realphy, visualizada no FigTree, amostras de ID *Salmonella*.

De acordo com a análise de SNPs (Figura 8), os genomas dos isolados 9157 e 9164 são indistinguíveis, exibindo uma distância de SNP de apenas 5. Além disso, os isolados 9153, 9150, 9160, 9159, 9155, 9156, 9152, 9154 e 9163 apresentam também perfis genéticos indistinguíveis (destacados em verde) ou intimamente relacionados (destacados em azul).

Figura 8 - Número de SNPs para investigação de surtos



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Distâncias pareadas (número de SNPs) entre os isolados é mostrada à direita. Números destacados em verde exibem ≤ 22 SNPs, representando isolados genotipicamente indistinguíveis. Números destacados em azul exibem 23–30 SNPs, representando amostras definidas como genotipicamente intimamente relacionadas. Números destacados em laranja (31–60 SNPs) representam isolados definidos como possivelmente intimamente relacionados. Finalmente, nomes e números não destacados representam isolados esporádicos. A definição de um surto, juntamente com os critérios de interpretação, foi previamente descrita (Ferreira *et al.*, 2021).

Notavelmente, os isolados 9153, 9150 e 9160 demonstram uma faixa de SNP menor entre eles, variando de 3 a 6. Embora os dados epidemiológicos abrangentes (por exemplo, se são da mesma fazenda) para esses isolados não estejam disponíveis para confirmar um surto, os isolados 9157 e 9164 coletados na mesma cidade (Figura 5) sugerem um surto em potencial. Um cenário de surto plausível também surge em relação aos isolados 9153, 9150 e 9160. Interessantemente, os isolados 9153 e 9150 são originários da mesma cidade (cidade C), enquanto o 9160 foi coletado de outra cidade (cidade D), aproximadamente 45 km distante da cidade C (Figura 5). Além disso, propomos a identificação de um potencial terceiro surto envolvendo os isolados 9159, 9155, 9156, 9152, 9154 e 9163, que foram obtidos de seis cidades diferentes, indicando distâncias consideráveis entre algumas dessas localizações.

Um estudo de 2014 explorou a diversidade genômica de *S. Heidelberg* analisando SNPs de *drafts* genomas de 44 isolados de fontes animais, de varejo de carne e de clínicas humanas nos Estados Unidos da América (EUA). Entre os isolados, nove foram associados a um surto bem documentado no país, ocorrido em 2011. Os autores reportaram que os isolados associados ao surto eram praticamente

indistinguíveis na árvore filogenética, mostrando uma variação média de apenas 17 SNPs (Hoffmann *et al.*, 2014). Outro estudo analisou 32 genomas de *S. Heidelberg* isoladas de um surto ocorrido em 2015 nos EUA, que causou infecções em pessoas a partir do contato com bezerros. A análise baseada em SNPs revelou que tanto isolados bacterianos de humanos quanto isolados dos animais formaram um agrupamento filogenético separado de outros isolados não associados ao surto, e que a característica comum entre eles foi a presença de genes fimbriais *saf*, que estão geralmente ausentes em *S. Heidelberg*. Assim, os autores sugeriram que distribuição de SNPs específicos e o ganho de *saf* podem ter contribuído para o potencial de transmissão e infecção destes isolados (Antony *et al.*, 2018). Estes dados evidenciam como a análise de SNPs contribui para a investigação de surtos, rotas de transmissão e potencial de infecção de isolados de *S. Heidelberg*.

Importante ressaltar que, uma biossegurança adequada e a higiene geral é essencial para reduzir efetivamente a presença e disseminação de *Salmonella*. Seguindo, princípios básicos: limpeza a seco seguida de limpeza úmida para remover sujeira e matéria orgânica que possam prejudicar o uso de desinfetantes; uso apropriado de desinfetantes para matar microrganismos; enxágue para limpar resíduos e fumigação. Nos diversos processos de produção avícola que podem ser fontes potenciais de introdução de *Salmonella*, incluindo pintos reprodutores, incubatório, manejo de insetos e roedores, descontaminação da água, ração e cama (Obe *et al.*, 2023).

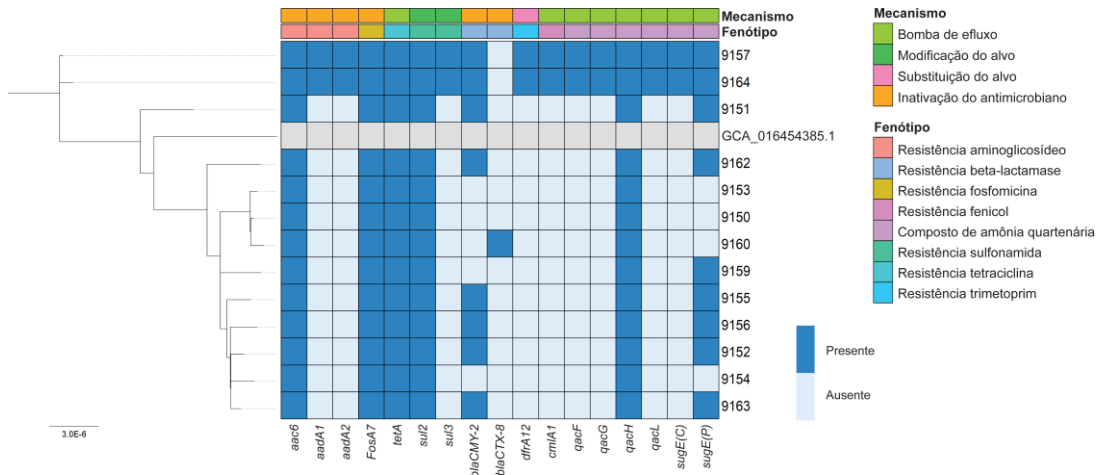
4.2 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES

A análise genômica revelou a presença de vários genes de resistência a antimicrobianos em todos os 13 genomas (Figura 8). Notavelmente, todos os genomas continham genes que conferem resistência a aminoglicosídeos (*aac6*), fosfomicina (*fosA7*), sulfonamidas (*sul2*) e tetraciclina [*tet(A)*]. O gene *blaCMY-2*, que codifica resistência à beta-lactamase, foi detectado em 61,5% (8/13) dos genomas, enquanto o *blaCTX-8*, que também codifica beta-lactamase, estava exclusivamente presente no genoma 9160.

Os genomas geneticamente mais próximos (Figura 5) exibem uma distribuição muito semelhante dos genes de resistência a antimicrobianos. Por exemplo, os isolados geneticamente indistinguíveis 9157 e 9164 compartilham um conjunto

comum de genes *aadA1* e *aadA2* (aminoglicosídeos), *sul3* (sulfonamida), *dfrA12* (trimetoprim) e *cmlA1* (cloranfenicol), reforçando a hipótese do surto (Figura 9).

Figura 9 - Distribuição de genes de resistência a antimicrobianos e sanitizantes



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

O lado esquerdo exibe a árvore filogenética. O lado direito representa um mapa de presença e ausência que mostra os resultados da análise *in silico*, revelando genes de resistência dentro dos genomas usando ARG-ANNOT. Apenas genes consistentes com CARD ou ResFinder foram considerados. As colunas representam o ID do gene, e as linhas representam os isolados de *Salmonella*, indicando a presença (azul escuro) ou ausência (azul claro) do gene de resistência. As informações sobre mecanismo de resistência e fenótipo são obtidas do CARD. "Ref." indica o genoma de referência descrito na metodologia.

Em 2021, uma análise de perfil genômico de 68 *S. Heidelberg* isoladas no Brasil, na região Sul e Sudeste, também encontrou altas frequências de *fosA7* (100%), *tet(A)* (100%), *sul2* (64; 94,1%), e o *blaCMY-2* (56; 82,3%), e *mdf(A)* que não foi localizado no presente trabalho (Kipper *et al.*, 2021). Resultados semelhantes foram reportados por Monte *et al.*, 2022, que investigaram o resistoma de *S. Heidelberg*, tendo encontrado resistência à fosfomicina (*fosA7*; 100%), sulfonamida (*sul2*; 100%), tetraciclina (*tet(A)*; 100%) e aminoglicosídeo (*aac(6')-Iaa*; 100%).

Também corrobora com essa pesquisa um recente trabalho realizado na região sul do Brasil, que analisou cepas de *S. Heidelberg* resistentes a antimicrobianos isoladas de carne de frango e bovina, entre 2013 e 2017, e identificou que todas as 11 cepas analisadas apresentaram genes de resistência a antimicrobianos, como *fosA7* (fosfomicina), *aac(6')-Iaa* (aminoglicosídeos), *sul2* (sulfonamidas), *tet(A)* (tetraciclina) e *blaCMY-2* (beta-lactâmicos) (Vilela *et al.*, 2023).

O gene *fosA7*, que está presente em todos os isolados deste trabalho, e nos trabalhos citados anteriormente, foi relatado pela primeira vez em 2017 em isolados de *S. Heidelberg* recuperados de frangos de corte na Colúmbia Britânica, Canadá. A presença deste gene causa grande preocupação, devido ao aumento do uso de fosfomicina em ambientes clínicos e veterinários (Rehman *et al.*, 2017).

Entretanto, é importante ressaltar que os isolados estudados neste trabalho foram testados fenotipicamente através do teste de disco-difusão em um estudo anterior (Sielski Galvão Soares *et al.*, 2023). Os resultados mostraram perfis genotípicos e fenotípicos de resistência à sulfonamida e à tetraciclina concordantes, mas discordante de fosfomicina, que apresentou genótipo resistente, mas não apresentou resistência fenotípica (Anexo A). A ausência de expressão de resistência em bactérias com o gene *fos7* pode ser explicada pela heterorresistência, onde subpopulações dentro da mesma população bacteriana apresentam diferentes níveis de resistência, e pela epistasia, que são interações entre genes que podem alterar a expressão fenotípica da resistência de maneira complexa e não aditiva. Além disso, fatores ambientais, como condições de crescimento e presença de outros compostos químicos, podem modificar drasticamente a expressão dos genes de resistência (Hughes; Andersson, 2017).

Em relação ao uso de antimicrobianos na pecuária, embora proibido para promoção do crescimento em vários países, mais de 70% dos antimicrobianos produzidos globalmente são utilizados na pecuária, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, para promover o bem-estar e o crescimento dos animais. No mundo devido ao aumento da agricultura intensiva em grande escala em países como Rússia, Índia, China e África do Sul, projeta-se um aumento da aplicação desses compostos. Esses antimicrobianos podem ser usados para diferentes finalidades: tratamento de doenças, metafilaxia (administração a um grupo de animais contendo indivíduos doentes e saudáveis, supostamente infectados), profilaxia (uso em animais saudáveis, mas em risco de infecção) e melhoria de desempenho (para acelerar o ganho de peso). Entre os compostos antimicrobianos utilizados estão, peptídeos cíclicos (ex.: bacitracina), ionóforos (ex.: monensina, narasina), estreptograminas (ex.: virginamicina), ortossomicinas (ex.: avilamicina) e macrolídeos (ex.: tilosina, espiamicina), auxiliando a aumentar o ganho de peso e a eficiência alimentar em animais de produção (Plata *et al.*, 2022; Van Boeckel *et al.*, 2019). De acordo com a Instrução Normativa nº 1/2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento, os anfenicóis, tetraciclina, beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas são de uso exclusivo em produtos antimicrobianos veterinários, sendo vedada sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou conservantes de alimentos para animais. Esta prática é de grande preocupação, pois a exposição repetida de animais a pequenas doses de antimicrobianos pode contribuir para a resistência (Ministério da Agricultura, 2020).

Quanto aos genes relacionados à resistência a sanitizantes, o gene *qacH* foi identificado em todos os genomas analisados, enquanto o gene *sugE(p)* foi detectado em 69,2% (9/13) dos genomas examinados. Os genes *qacF*, *qacG* e *qacL* foram encontrados exclusivamente nos genomas geneticamente indistinguíveis 9157 e 9164 (Figura 9).

Quando utilizados de forma adequada, os sanitizantes tem papel essencial na diminuição da propagação de infecções e doenças, por sua ampla atividade antimicrobiana. No entanto, quando a limpeza e desinfecção não ocorrem de forma eficiente no ambiente de produção das aves, os patógenos que sobrevivem têm maior potencial de exibir resistência a estes produtos (Bezek *et al.*, 2023). Os sanitizantes a base de cloreto de benzalcônio (composto de amônia quaternária-QACs) são amplamente utilizados na avicultura brasileira, e os relatos relacionados a resistência tem sido mais frequentes, estando ligados a mutação de genes ou transferência horizontal de elementos genéticos móveis (Barbosa, 2020).

Investigações genotípicas de resistência a sanitizantes em *Salmonella* isoladas de cadeias produtivas de frangos na China, detectaram os genes *qacED1* (26,7%, n=52), *qacF* (7,7%, n=15) e somente uma amostra com *sugE(p)* (Long *et al.* 2016). Adicionalmente, Deng *et al.* (2017) relataram os genes *qacED1* (8,6%, n = 13), *qacF* (18,4%, n = 28) e *qacED1* (8,6%, n = 13) e nenhum *sugE(p)*. Em ambos os estudos não foram detectados *qacE* e *qacG*. Um estudo realizado em São Paulo em 2019 identificou genes codificantes de resistência a QACs em 17 cepas de *Salmonella* spp. pertencentes as diferentes origens (humano, animal e alimento). Foi observada a presença do gene *mdfA* em todas as cepas, *qacE* e *qacED1* em 7 (41,1%) e *sugE(p)* em 5 (29,41%). Não foram detectados *sugE(c)*, *emrE*, *qacA*, *qacH* e *qacL* (Muñoz, 2019).

O gene *qacH*, membro da pequena família de resistência a múltiplas drogas (SMR), foi originalmente identificado em espécies de *Staphylococcus*, e é conhecido

por seu papel em conferir resistência a antissépticos por meio da codificação de bombas de efluxo de múltiplas drogas carregadas por plasmídeos. Apesar de sua identificação principalmente em cepas Gram-positivas, relatórios também indicaram sua presença em cepas Gram-negativas (Antony *et al.*, 2018). Contudo, até o momento, nenhum estudo documentou a presença do gene *qacH* em *Salmonella* isolada do Brasil. É importante notar que durante a validação cruzada no Resfinder, a predição desses genes de resistência a sanitizantes não foi observada. No entanto, em três isolados específicos (9155, 9157 e 9764), o gene *sug(E)* foi identificado por meio de anotação RAST.

4.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

No presente estudo, as SPIs identificadas englobam C63PI (excluindo o genoma 9151), SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-13 e SPI-14 em todos os genomas.

As ilhas de patogenicidade da salmonela (SPIs) são aglomerados de genes localizados em certas áreas dos cromossomos, responsáveis por codificar os vários fatores de virulência, entre eles, fatores relacionados à adesão, invasão e produção de toxinas. Atualmente, reconhece-se que *Salmonella* possui cerca de 23 ilhas de patogenicidade (SPI) documentadas, com SPI-1 a SPI-5 amplamente distribuídas (Kipper *et al.*, 2021; Monte *et al.*, 2022). Entre elas, a C63PI está envolvida no transporte de ferro na ilha de patogenicidade 1 (SPI-1) (Bugarel *et al.*, 2019). SPI-1 carrega um conjunto de genes de virulência, codificando um mínimo de dez proteínas distintas, cruciais para invasão bacteriana em células do hospedeiro. SPI-2 carrega genes associados à infecções sistêmicas e replicação dentro de macrófagos. Já SPI-3 contribui para a sobrevivência de macrófagos e proliferação de *Salmonella* em ambientes com baixos níveis de magnésio (Jajere, 2019). Além disso, SPI-13 é conservada em várias sorovares de *S. enterica.*, e é crucial para a colonização sistêmica de camundongos e frangos por várias sorovares (Lerminiaux; Mackenzie; Cameron, 2020). Por fim, SPI-14 parece desempenhar um papel crucial na virulência de *Salmonella*, mediando a invasão bacteriana em modelos experimentais (Jiang *et al.*, 2017).

As ilhas de patogenicidade mais extensivamente estudadas são SPI-1 e SPI-2, dada sua associação com os mecanismos subjacentes à invasão de células hospedeiras por *Salmonella* spp. (Tang *et al.*, 2023). Ambas as ilhas codificam o

sistema de secreção do tipo III (T3SS), reconhecido como o principal fator de virulência de *Salmonella*. Esse sistema pode injetar proteínas efetoras bacterianas necessárias para a invasão intestinal e a produção de enterite. Esse processo envolve a secreção de moléculas do interior da célula bacteriana para o ambiente intracelular da célula do hospedeiro (Lou *et al.*, 2019).

Em termos de genes relacionados à virulência, mais de 100 genes associados a vários fatores de virulência foram identificados em todos os 13 isolados, de acordo com a quadro 5.

Quadro 5 - Fatores de virulência *in silico* presente em todas as amostras de *S. Heidelberg*

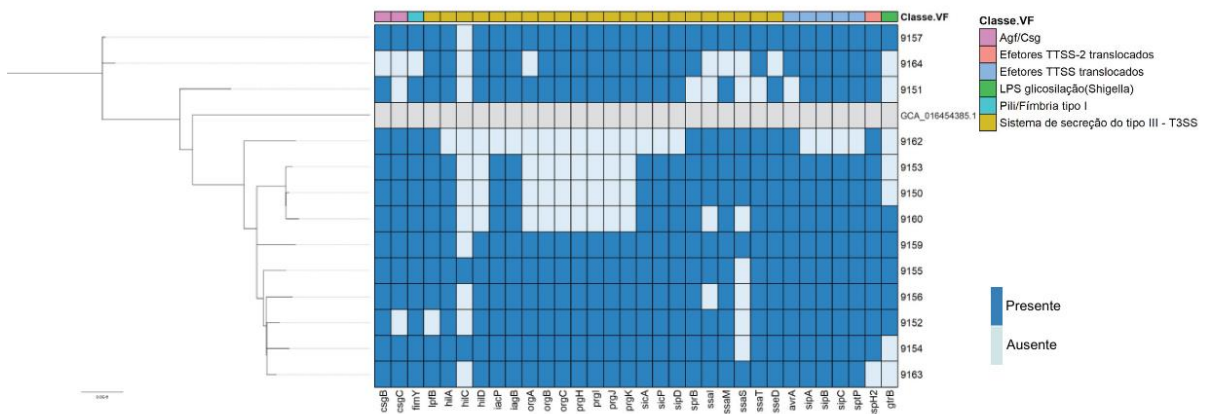
Fatores de Virulência	Genes relacionados	Fatores de Virulência	Genes relacionados
Agf/Csg	<i>csgA</i>	Sistema de Secreção do tipo III – T3SS (codificado na SPI-2)	<i>ssaC</i>
	<i>csgD</i>		<i>ssaD</i>
	<i>csgE</i>		<i>ssaE</i>
	<i>csgF</i>		<i>ssaG</i>
	<i>csgG</i>		<i>ssaH</i>
Lpf	<i>lpfA</i>		<i>ssaJ</i>
	<i>lpfC</i>		<i>ssaK</i>
	<i>lpfD</i>		<i>ssaL</i>
	<i>lpfE</i>		<i>ssaN</i>
MisL	<i>misL</i>		<i>ssaO</i>
RatB	<i>ratB</i>		<i>ssaP</i>
ShdA	<i>shdA</i>		<i>ssaQ</i>
SinH	<i>sinH</i>		<i>ssaR</i>
Pili/Fímbria tipo I	<i>fimA</i>		<i>ssaU</i>
	<i>fimC</i>		<i>ssaV</i>
	<i>fimD</i>		<i>sscA</i>
	<i>fimF</i>		<i>sscB</i>
	<i>fimH</i>		<i>sseB</i>
	<i>fimI</i>		<i>sseC</i>
	<i>fimW</i>		<i>sseE</i>
	<i>fimZ</i>	<i>ssrA</i>	
Mg2+ transporte	<i>mgtB</i>	<i>ssrB</i>	
	<i>mgtC</i>	Efetores TTSS translocados	<i>slrP</i>
Mig-14	<i>mig-14</i>	Efetores translocados TTSS-1	<i>sopA</i>
PhoPQ	<i>phoP</i>		<i>sopB/sigD</i>
	<i>phoQ</i>		<i>sopD</i>

Fatores de Virulência	Genes relacionados	Fatores de Virulência	Genes relacionados
Sistema de Secreção do tipo III – T3SS (codificado na SPI-1)	<i>invA</i>	Efetores translocados TTSS-2	<i>sopE2</i>
	<i>invB</i>		<i>pipB2</i>
	<i>invC</i>		<i>sifA</i>
	<i>invE</i>		<i>sifB</i>
	<i>invF</i>		<i>sopD2</i>
	<i>invG</i>		<i>sseF</i>
	<i>invH</i>		<i>sseG</i>
	<i>invI</i>		<i>sseJ</i>
	<i>invJ</i>		<i>sseK2</i>
	<i>spaO</i>		<i>sseL</i>
	<i>spaP</i>		<i>sspH2</i>

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Fatores de virulência e genes relacionados identificados pelo Virulence Factor Database (VFDB)

Figura 10 - Genes de virulência encontrados nos genomas de *S. Heidelberg* e que diferiram entre os isolados.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Árvore filogenética do Realphy, visualizada no FigTree. Genes de virulência identificados no Virulence Factor Database (VFDB). Colunas e linhas representam amostras de ID do gene e *Salmonella*, respectivamente, e indicam a presença ou ausência de genes de resistência nas amostras. Acima os fatores de virulência que os genes estão relacionados.

Os resultados dos genes relacionados à virulência neste estudo estão em consonância com os achados de Kipper *et al.*, 2021, que identificaram 139 genes de virulência em isolados de *S. Heidelberg* de aves produzidas no sul e sudeste do Brasil, incluindo os genes *lpfA*, *invA* e *avrA*. Em um estudo realizado em aves produzidas no sul do Brasil em 2020, todos os 20 isolados de *S. Heidelberg* testados apresentaram os genes *ompC*, *invA*, *sodC*, *avrA*, *lpfA* e *agfA* por meio de PCR (Tavares, 2020). No ano seguinte, 20 cepas de *S. Heidelberg* isoladas de frangos de corte apresentaram

esses mesmos genes em todas as cepas, além do gene *luxS* em 70% delas (n=14) (Melo *et al.*, 2021).

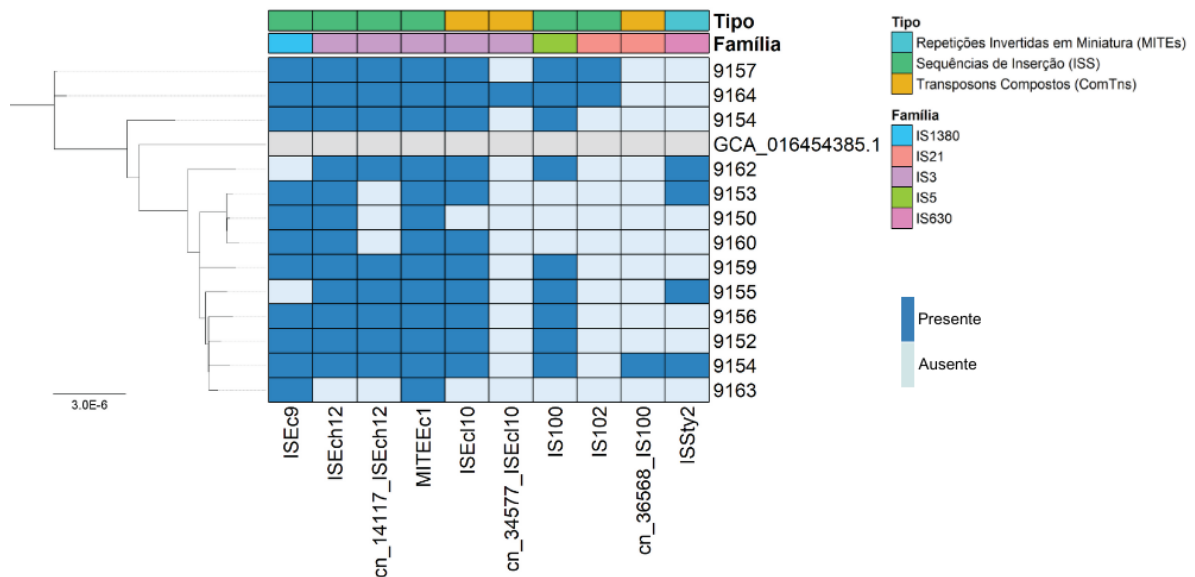
Os fatores de virulência identificados sugerem capacidade de invasão, adesão, sobrevivência e multiplicação bacteriana. O fator de virulência mais prevalente entre os genes analisados foi o T3SS, evidenciando o potencial de invasão bacteriana durante uma infecção (Lou *et al.*, 2019).

4.4 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS

O método de sequenciamento utilizado neste estudo, o qual obteve sequências de leituras curtas (*short reads*), possui limitações e desafios técnicos na análise das chamadas regiões genômicas repetidas, muito comumente presentes nos MGE, uma vez que estas regiões são mais difíceis de serem montadas corretamente e, portanto, apresentam desafios interpretativos.

O presente estudo detectou elementos transponíveis IS, Tn composto e Elementos Transponíveis Miniature Inverted Repeat (MITEs) entre os genomas (Figura 11). A maioria dos MGEs identificados estava associada aos elementos IS. Notavelmente, o IS630 estava presente em todos os genomas, seguido pelo IS1380 (exceto genomas 9155 e 9162). Esses elementos IS podem influenciar a expressão gênica e facilitar a mobilidade de genes através da formação de Tn Composto e Unidades Translocáveis (TUs), incluindo genes associados a resistência e a virulência (Partridge *et al.*, 2018).

Figura 11- Distribuição de Elementos Genéticos Móveis (MGE) entre os genomas de *S. Heidelberg*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

As colunas e linhas representam os MGE previstos e os isolados de *Salmonella*, respectivamente, indicando a presença (azul escuro) ou ausência (azul claro) de MGE. As cores indicam a família e o tipo de MGE identificado.

Nos genomas 9150, 9153, 9157, 9160, 9162 e 9164, os genes de resistência *sul2* e *tet(A)* foram observados como potencialmente associados aos MGEs, devido ao fato de estarem próximos no genoma (em média 1Kbp de distância), especialmente em sequências IS. Além disso, sequências IS também foram encontradas próximas aos genes *blaCMY-2* nos genomas 9152, 9155, 9157 e 9164. Em adição à identificação de MGEs e genes de resistência, nas amostras 9150, 9153, 9157, 9160, 9162 e 9164 estava presente fosfoglicerato mutase e superfamília transportador de drogas/metabólitos (DMT). Nas amostras 9155, 9157 e 9164, lipocalina bacteriana (Blc) (Figura 12)

Figura 12 - Posição genômica de elementos genéticos móveis (MGE), genes de resistência a antimicrobianos e sanitizantes

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Essa representação linear ilustra o contexto genômico em fragmentos de oito genomas (9150, 9152, 9153, 9155, 9157, 9160, 9162 e 9164). As setas azuis indicam MGE, enquanto os genes de resistência a antimicrobianos e saneantes são destacados com setas vermelhas. Fragmentos adicionais de DNA são representados em preto. As barras pretas indicam a posição genômica e a distância em pares de bases entre os elementos.

Quando comparado este resultado com um genoma de referência de *S. Heidelberg* isolado de aves dos EUA (GenBank GCA_016454385.1) repetindo o mesmo método, foi identificado genes *aph(3')-Ia*, *sul1*, *aadA1* associado à MGEs. Um estudo publicado em 2023 teve como objetivo correlacionar genes de resistência a MGE em plasmídeos entre isolados de *Salmonella*. Os autores reportaram dois clusters dentro do plasmídeo IncFIB, cada um contendo um transposon da família Tn2 contendo genes *tetR*, que conferem resistência às tetraciclinas. Além disso, foi identificado um integron de classe 1, acompanhado por um operon *mer*, que codifica resistência ao mercúrio. O integron carregava genes de resistência a antimicrobianos e sanitizantes, nomeadamente *ant(3')-Ia*, *qacEΔ1* e *sul1*, codificando resistência a aminoglicosídeos, amônio quaternário e sulfonamidas, respectivamente. Notavelmente, esses clusters eram predominantemente compostos por sequências de inserção IS26. Esses elementos móveis carregavam genes de resistência a aminoglicosídeos, como *aph(3')-Ia*, *acc(3)-IVa*, *aph(4)-Ia*, bem como genes de resistência à fosfomicina, *fosA3* (Krüger *et al.*, 2023).

A fosfoglicerato mutase identificada neste trabalho, pode facilitar a conversão do plasminogênio em plasmina, uma protease ativa. Essa plasmina, por sua vez, pode desempenhar um papel importante na virulência bacteriana, ativando outras proteínas do hospedeiro que auxiliam na infecção e na degradação dos tecidos do hospedeiro (Constance, 2019). Corroborando com os resultados obtidos nos genomas deste trabalho, um estudo de Maguire *et al.* (2019) identificou *sugE* associada à resistência a compostos quaternários de amônio, no mesmo plasmídeo com predição de *blaCMY-2*. E identificaram a presença do gene de lipocalina (*blc*) diretamente adjacente. A presença deste *blc* adjacente pode ser um potencializador da resistência, uma vez que estas têm sido relatadas em outras bactérias para aumentar CIMs de antimicrobianos β-lactâmicos por ligação do antimicrobiano no meio. Também esteve presente em alguns genomas a superfamília transportador de drogas/metabólitos (DMT), esses transportadores de efluxo bacterianos multidrogas são importantes facilitadores de mecanismos de resistência a drogas, principalmente porque

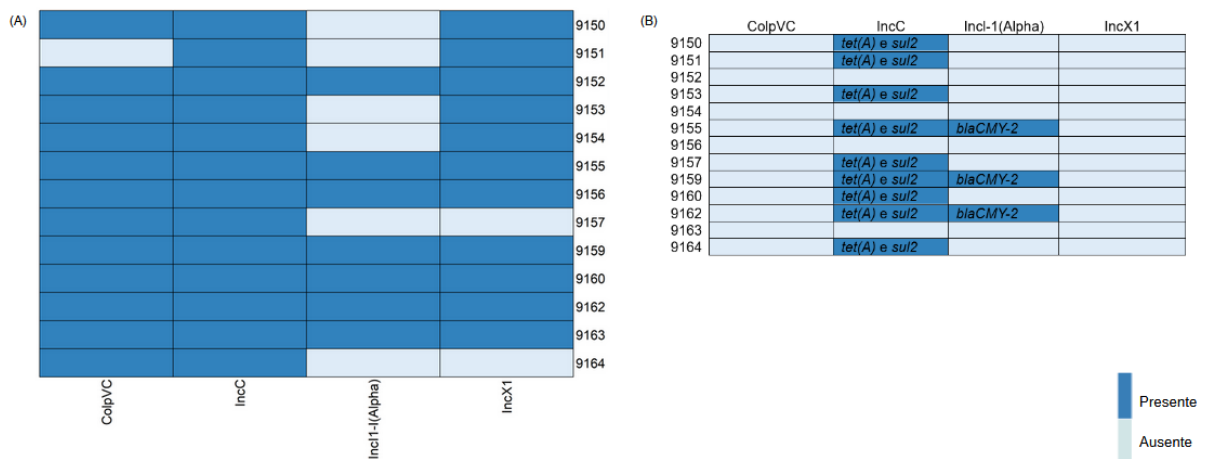
patógenos multirresistentes podem se tornar refratários a agentes antimicrobianos, resultando em infecções bacterianas potencialmente intratáveis (Kumar *et al.*, 2020).

4.4.1 Plasmídeos

Alguns plasmídeos carregam genes de virulência e resistência a antimicrobianos de importância clínica e epidemiológica, e sua identificação e caracterização podem ajudar nas investigações de surto e rastreamento de fontes de transmissão (Li *et al.*, 2020;).

Quatro plasmídeos foram identificados entre os genomas: IncA/C2(IncC), IncX1, IncI-1(Alpha) e ColpVC. O plasmídeo IncC foi detectado em todos os genomas pesquisados, enquanto ColpVC estava presente em todos, exceto no genoma 9151. IncX1 foi observado em todos os genomas, exceto 9157 e 9164. Por último, o plasmídeo IncI1(Alpha) foi identificado em 7 dos 13 genomas, representando 53,8% das amostras analisadas (Figura 13).

Figura 13 - Distribuição de plasmídeos e seus genes de resistência a antimicrobianos associados entre os genomas de *S. Heidelberg*



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

(a) Colunas e linhas representam os plasmídeos identificados e os genomas de *Salmonella*, respectivamente, indicando a presença (azul escuro) ou ausência (azul claro) do plasmídeo. (b) Colunas e linhas representam os plasmídeos identificados e os genomas de *Salmonella*, respectivamente, indicando a presença (azul escuro) ou ausência (azul claro) dos genes de resistência.

A predição dos genes de resistência a antimicrobianos nos plasmídeos revelou a prevalência de *sul2* e *tet(A)* em 69,2% (9/13), com ambos os genes notavelmente

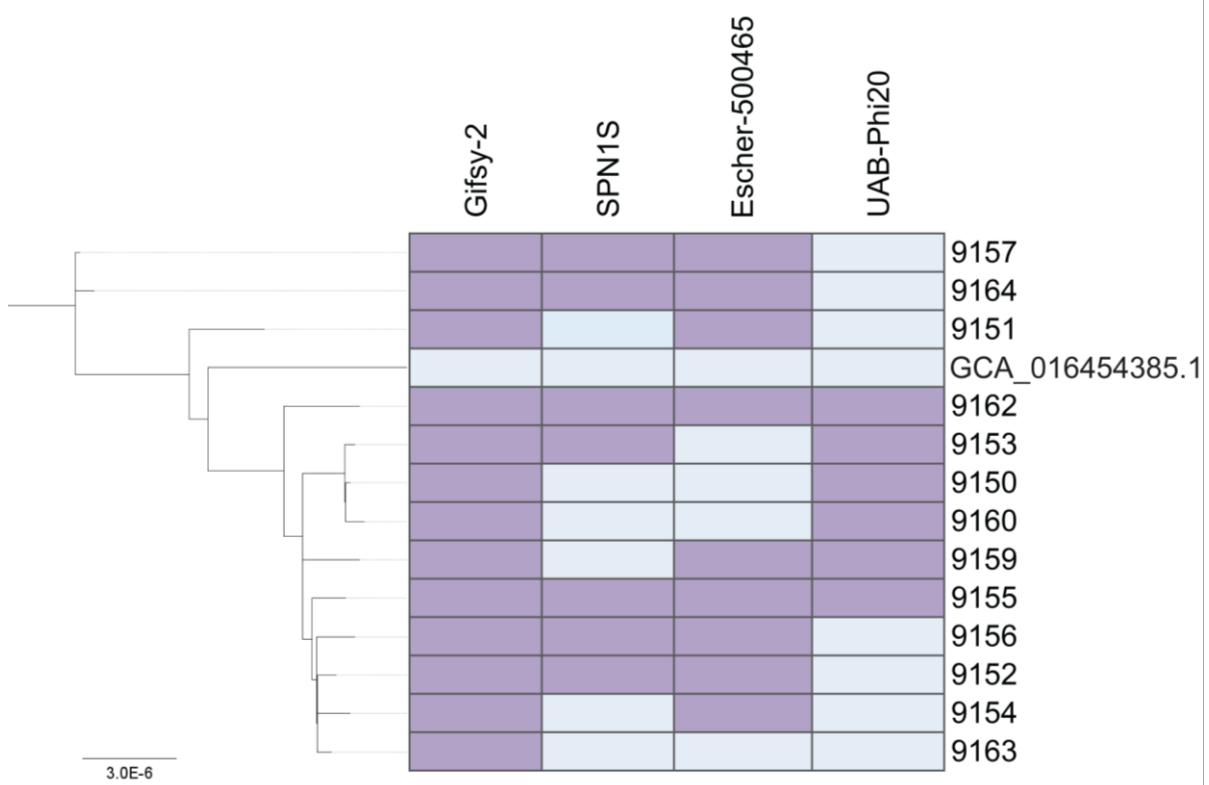
associados ao IncC. Além disso, o gene *bla*CMY-2 foi identificado nos genomas 9155, 9159 e 9162, ligado ao IncI1 (Alpha) (Figura 12).

Corroboram com os resultados obtidos um estudo realizado na região sul do Brasil, onde ColpVC (100%), IncX1 (97%) e IncA/C2 (95,5%) foram prevalentes entre os 68 genomas de *S. Heidelberg* (Vilela *et al.*, 2023). O plasmídeo IncC já foi associado com a disseminação de genes de resistência a betalactâmicos de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases (AMBROSE *et al.* 2018). Segundo dados da literatura, IncX1 carrega principalmente genes de resistência a quinolonas (ZHANG *et al.* 2018). No Brasil, foi relatado a presença de IncI1-I em *S. Heidelberg* isoladas de fontes ambientais em 2014 a 2016. Este plasmídeo foicarreava o gene de resistência *bla*CMY-2 (Tiba-Casas *et al.*, 2018).

4.5 IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE BACTERIÓFAGOS

Os principais fagos identificados foram o Gifsy-2, presente em todos os genomas, seguido pelo Escher-500465 em nove (69,2%) genomas. Além disso, o SPN1S foi detectado em sete genomas (53,8%) e o UAB_Phi20 em seis genomas (46,1%) (Figura 14).

Figura 14 - Distribuição de bacteriófagos entre os genomas de *S. Heidelberg*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

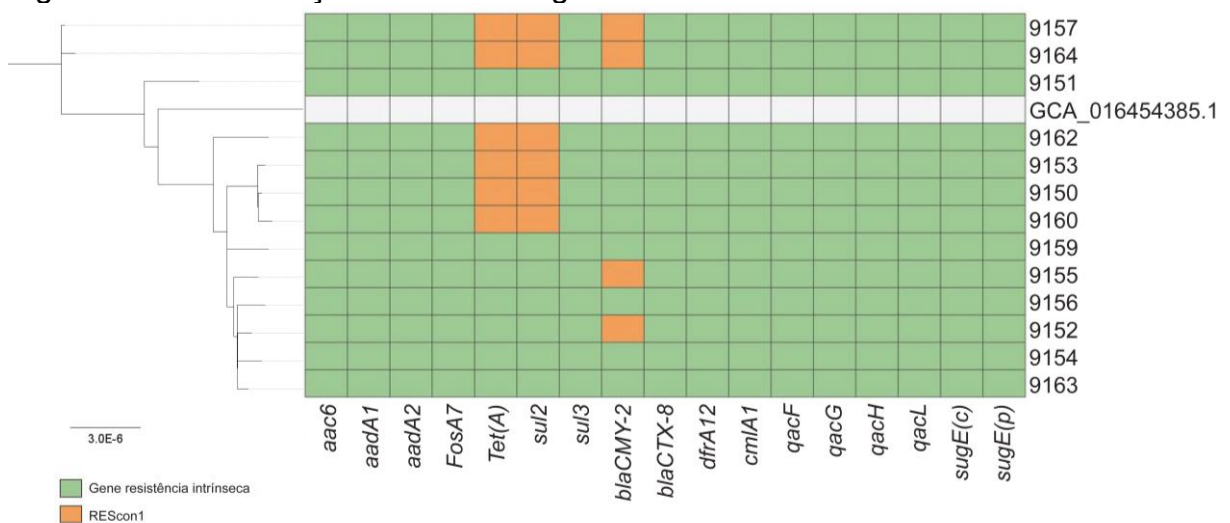
As colunas e linhas representam os bacteriófagos previstos e os isolados de *Salmonella*, respectivamente, indicando a presença (roxo escuro) ou ausência (roxo claro) de MGE.

Diversos estudos têm levantado preocupações quanto a presença de sequências de fago nos genomas bacterianos, devido à possibilidade de transferência de genes, incluindo os de resistência a antimicrobianos, entre bactérias. Estes vírus podem carrear e disseminar tais genes por meio do mecanismo de transdução. (Pilati *et al.*, 2023). Através do mecanismo de transdução, vários fagos podem desempenhar um papel na patogenicidade da *Salmonella*, abrigando genes de virulência e facilitando a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos. Por exemplo, o fago Gifsy-2, presente em todos os genomas examinados, carrega o gene que codifica para uma superóxido dismutase (*sodC1*), o que poderia aumentar a sobrevivência de *Salmonella* spp intracelularmente destruindo os radicais tóxicos dos macrófagos hospedeiros (Seribelli *et al.*, 2021).

4.6 CLASSIFICAÇÃO DE RISCO NO RESISTOMA

De acordo com o protocolo de risco utilizado, em 61,54% (n=8) dos genomas, os genes de resistência previstos, *tet(A)*, *sul2* e *blaCMY-2*, são classificados como RESCON 1 (Figura 15) (Martínez; Coque; Baquero, 2015).

Figura 15 - Classificação de risco dos genes de resistência



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

O lado esquerdo exibe a árvore filogenética. O lado direito representa um mapa de presença e ausência que mostra os resultados da classificação de risco dos genes de resistência no resistoma, conforme protocolo de Martínez; Coque; Baquero (2015). As colunas representam o ID do gene, e as linhas representam os isolados de *Salmonella*, indicando a classificação RESCon1 (laranja) ou gene de resistência intrínseca (verde).

O RESCON 1 compreende genes de resistência que já são conhecidos por contribuir para desafios no tratamento com antimicrobianos, e que foram previamente relatados em MGE hospedados por patógenos bacterianos humanos. Este resultado indica um risco substancial para a disseminação de mecanismos de resistência e potenciais desafios no tratamento de infecções humanas e animais. Os outros cinco genomas foram considerados como portadores de genes de resistência pertencentes ao resistoma intrínseco, cuja detecção deve ser considerada apenas como um marcador da abundância local da bactéria a que pertence, apesar da sua contribuição para a resistência intrínseca do organismo.

5 CONCLUSÃO

Este estudo fornece uma contribuição substancial para a compreensão dos isolados de *S. Heidelberg*, especialmente dentro do contexto da saúde única, uma vez que aborda a presença e a abrangência da resistência aos antimicrobianos e a sanitizantes, e seus fatores de virulência associados a esse patógeno no ambiente de produção, destacando a importância de uma abordagem integrada para lidar com questões de saúde pública.

A investigação de genes de resistência e os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), além de nos ajudar a compreender melhor as relações filogenéticas entre os isolados, indicou possíveis surtos, fornecendo insights da necessidade de um melhoramento na vigilância epidemiológica e o controle de doenças.

A análise dos fatores de risco para a transmissão da *S. Heidelberg* é crucial para orientar políticas de saúde pública e práticas na indústria avícola, promovendo a segurança alimentar e a saúde tanto humana quanto animal. Entre essas práticas podemos destacar aspectos de limpeza e cuidado dentro do ambiente de produção, com uma implementação rigorosa de protocolos de limpeza e desinfecção. Treinamentos contínuos para os trabalhadores sobre práticas de higiene pessoal e procedimentos corretos de manuseio de aves, manutenção regular de instalações e equipamentos, somado a um monitoramento ambiental para assegurar a identificação de possíveis fontes de contaminação. Ao entender esses riscos e implementar medidas proativas de controle, monitoramento e tratamento, podemos mitigar os impactos na saúde pública e garantir a integridade dos sistemas de produção de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ADEOLU, Mobolaji *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.
- ALCOCK, Brian P. *et al.* CARD 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 48, n. D1, p. D517–D525, 2020.
- ALENAZY, Rawaf. Antibiotic resistance in Salmonella: Targeting multidrug resistance by understanding efflux pumps, regulators and the inhibitors. **Journal of King Saud University - Science**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 102275, 2022.
- ALIKHAN, Nabil-Fareed *et al.* Dynamics of Salmonella enterica and antimicrobial resistance in the Brazilian poultry industry and global impacts on public health. **PLOS Genetics**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. e1010174, 2022.
- ALIX, Eric; BLANC-POTARD, Anne-Béatrice. MgtC: a key player in intramacrophage survival. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 252–256, 2007.
- AL-KHAF AJI, Noor S K; AL-BAYATI, Ali M K; AL-DAHMO SHI, Hussein O M. **Virulence Factors of Salmonella Typhi**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: www.intechopen.com.
- ALTSCHUL, S. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ANDERSSON, Dan I.; HUGHES, Diarmaid. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 465–478, 2014.
- ANTONY, Linto *et al.* Genome divergence and increased virulence of outbreak associated Salmonella enterica subspecies enterica serovar Heidelberg. **Gut Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 53, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0279-0>.
- ARNDT, David *et al.* PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. W1, p. W16–W21, 2016.
- AZIZ, Ramy K *et al.* The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 75, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
- BARBOSA, Fernanda Borges. **Pesquisa de genes de resistência aos compostos de amônia quaternária (QAC) em estirpes de Escherichia coli isoladas de aves comerciais**. 2020. Dissertação - Universidade de São Paulo, [s. l.], 2020.
- BASSANI, Juliana *et al.* Antimicrobial and disinfectant resistance of Salmonella Heidelberg from Brazilian flocks did not increase for ten years (2006-2016). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 41, 2021.

- BÄUMLER, A J; TSOLIS, R M; HEFFRON, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 279–283, 1996.
- BERTELS, Frederic *et al.* Automated Reconstruction of Whole-Genome Phylogenies from Short-Sequence Reads. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 1077–1088, 2014.
- BEZEK, Katja *et al.* Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Commonly Used Disinfectants on *Salmonella Infantis* Isolates. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 301, 2023.
- BIONDO, Carmelo. New Insights into Bacterial Pathogenesis. **Pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 38, 2022.
- BORTOLAIA, Valeria *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 75, n. 12, p. 3491–3500, 2020.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, [s. l.], 2021.
- BROCKHURST, Michael A. *et al.* The Ecology and Evolution of Pangenomes. **Current Biology**, [s. l.], v. 29, n. 20, p. R1094–R1103, 2019.
- BRODSKY, Igor E. *et al.* *mig-14* is a *Salmonella* gene that plays a role in bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 184, n. 12, p. 3203–3213, 2002.
- BUGAREL, Marie *et al.* Complete Genome Sequences of Four *Salmonella enterica* Strains (Including Those of Serotypes Montevideo, Mbandaka, and Lubbock) Isolated from Peripheral Lymph Nodes of Healthy Cattle. **Microbiology Resource Announcements**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2019.
- CARATTOLI ALESSANDRA AND HASMAN, Henrik. PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). *In*: DE LA CRUZ, Fernando (org.). **Horizontal Gene Transfer: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 285–294. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20.
- CARVER, Tim *et al.* DNAPlotter: Circular and linear interactive genome visualization. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 119–120, 2009.
- CASTANHEIRA, Sónia *et al.* An alternative penicillin-binding protein involved in *Salmonella* relapses following ceftriaxone therapy. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 55, p. 102771, 2020.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Ground Turkey**. [S. l.], 2011.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **One Health Basics**. [S. l.], 2023a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonella and Food**. [S. l.], 2023b.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonella Heidelberg Infections Linked to Foster Farms Brand Chicken**. [S. l.], 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). **Salmonella Symptoms**. [S. l.], 2019.

CHAND, Yamini; ALAM, Md. Afroz; SINGH, Sachidanand. Pan-genomic analysis of the species *Salmonella enterica*: Identification of core essential and putative essential genes. **Gene Reports**, [s. l.], v. 20, p. 100669, 2020.

CHAUDHARI, Rahul; SINGH, Kanika; KODGIRE, Prashant. Biochemical and molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Salmonella* spp. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 174, n. 1–2, p. 103985, 2023.

CHLEBICZ, Agnieszka; ŚLIŻEWSKA, Katarzyna. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 863, 2018.

CHRISTAKI, Eirini; MARCOU, Markella; TOFARIDES, Andreas. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 26–40, 2020.

COIL, David; JOSPIN, Guillaume; DARLING, Aaron E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 587–589, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu661>.

COLLINSON, S K *et al.* *Salmonella enteritidis* agfBAC operon encoding thin, aggregative fimbriae. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 178, n. 3, p. 662–667, 1996.

DENG, Wenwen *et al.* Antibiotic Resistance in *Salmonella* from Retail Foods of Animal Origin and Its Association with Disinfectant and Heavy Metal Resistance. **Microbial Drug Resistance**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 782–791, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0127>.

DI MARCANTONIO, Lisa *et al.* Genomic Comparison of *Salmonella Enteritidis* Strains Isolated from Laying Hens and Humans in the Abruzzi Region during 2018. **Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 349, 2020.

DORSEY, Caleb W *et al.* *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 196–211, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04666.x>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção, consumo, exportação e importação.** [S. l.], 2024.

FANG, F C *et al.* The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates Salmonella virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 89, n. 24, p. 11978–11982, 1992.

FERREIRA, Fabienne Antunes *et al.* Rapid nanopore-based DNA sequencing protocol of antibiotic-resistant bacteria for use in surveillance and outbreak investigation. **Microbial Genomics**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2021.

GALÁN, Jorge E. *Salmonella* Interactions with Host Cells: Type III Secretion at Work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 53–86, 2001.

GUPTA, Sushim Kumar *et al.* ARG-annot, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 212–220, 2014.

HABBS, V. H. About a new type of bacteria from the paratyphoid enteritic group. **J. Bacterial**, [s. l.], v. 130, p. 374–396, 1933.

HEFFERNAN, E J *et al.* The Salmonella typhimurium virulence plasmid complement resistance gene rck is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including pagC and ail. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 174, n. 1, p. 84–91, 1992.

HOFER, Ernesto; SILVA FILHO, Sebastião Januário da; REIS, Eliane Moura Falavina dos. Prevalência de sorovares de Salmonella isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 55–62, 1997.

HOFFMANN, Maria *et al.* Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related salmonella enterica serotype heidelberg isolates from humans, retailmeats, and animals. **Genome Biology and Evolution**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 1046–1068, 2014.

HOREFTI, Elina. The Importance of the One Health Concept in Combating Zoonoses. **Pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 977, 2023.

HUANG, Xiaoqi; MADAN, Anup. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 868–877, 1999.

HUEMER, Markus *et al.* Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, [s. l.], v. 21, n. 12, 2020.
HUGHES, Diarmaid; ANDERSSON, Dan I. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 374–391, 2017.

JACOBSEN, Annika *et al.* The Salmonella enterica Pan-genome. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 487–504, 2011.

JAJERE, Saleh Mohammed. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 504–521, 2019.

JIANG, Lingyan *et al.* Signal transduction pathway mediated by the novel regulator LoiA for low oxygen tension induced *Salmonella* Typhimurium invasion. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. e1006429, 2017.

JOHANSSON, Markus H.K. *et al.* Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 101–109, 2021.

JULIA NUNES BATISTA DA COSTA. **Estudo retrospectivo da ocorrência de Salmonelose no Brasil no período de 2000 a 2018**. Brasil: [s. n.], 2020.

KAAS, Rolf S *et al.* Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. e104984-, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>.

KINGSLEY, Robert A. *et al.* Molecular and Phenotypic Analysis of the CS54 Island of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium: Identification of Intestinal Colonization and Persistence Determinants. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 629–640, 2003.

KINGSLEY, Robert A. *et al.* The *shdA* Gene Is Restricted to Serotypes of *Salmonella enterica* Subspecies I and Contributes to Efficient and Prolonged Fecal Shedding. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 68, n. 5, p. 2720–2727, 2000.

KIPPER, Diéssy *et al.* Recent Evolution and Genomic Profile of *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from Poultry Flocks in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 87, n. 21, 2021.

KOUTSOUMANIS, Kostas *et al.* *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. **EFSA Journal**, [s. l.], v. 17, n. 2, 2019.

KRÜGER, Gabriel I. *et al.* Mobile genetic elements drive the multidrug resistance and spread of *Salmonella* serotypes along a poultry meat production line. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, 2023.

KUMAR, Sanath *et al.* Functional and Structural Roles of the Major Facilitator Superfamily Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 266, 2020.

LARSEN, Mette V. *et al.* Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 1355–1361, 2012.

LERMINIAUX, Nicole A.; MACKENZIE, Keith D.; CAMERON, Andrew D.S. Salmonella pathogenicity island 1 (SPI-1): The evolution and stabilization of a core genomic type three secretion system. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2020.

LI, Jihong *et al.* Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: A meta-analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 21, p. 306–313, 2020.

LI, Wanwu *et al.* Strategies adopted by *Salmonella* to survive in host: a review. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 205, n. 12, p. 362, 2023.

LIU, Baobao *et al.* The vertical transmission of *Salmonella* Enteritidis in a One-Health context. **One Health**, [s. l.], v. 16, p. 100469, 2023.

LIU, Bo *et al.* VFDB 2022: A general classification scheme for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 50, n. D1, p. D912–D917, 2022.

LOU, Lixin *et al.* Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2019.

MADIGAN, Michael T *et al.* **Microbiologia de Brock**. [S. l.: s. n.], 2016.

MAGUIRE, Finlay *et al.* Identification of Primary Antimicrobial Resistance Drivers in Agricultural Nontyphoidal *Salmonella enterica* Serovars by Using Machine Learning. **mSystems**, [s. l.], v. 4, n. 4, 2019.

MARTÍNEZ, José L.; COQUE, Teresa M.; BAQUERO, Fernando. **What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2015.

MC CARLIE, Samantha; BOUCHER, Charlotte E.; BRAGG, Robert R. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. **Drug Resistance Updates**, [s. l.], v. 48, p. 100672, 2020.

MEDINA-SANTANA, José L. *et al.* Investigating the dynamics of *Salmonella* contamination in integrated poultry companies using a whole genome sequencing approach. **Poultry Science**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 101611, 2022.

MELO, Roberta T. *et al.* Molecular Characterization and Survive Abilities of *Salmonella* Heidelberg Strains of Poultry Origin in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, de 13 de janeiro de 2020. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/legislacao/INSTRUONORMATIVAN1DE13DEJANEIRODE2020.pdf>: 2020.

MONTE, Daniel F.M. *et al.* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Genotyping of Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Strains Isolated

From the Poultry Production Chain Across Brazil. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, 2022.

MUÑOZ, Maria Elena Espinoza. **Resistência aos compostos de amônio quaternário (QACs) de uso doméstico e hospitalar em patógenos prioritários multirresistentes**. 2019. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

MUSCAS, Patrizia *et al.* Purification and Characterization of Type 1 Fimbriae of *Salmonella typhi*. **Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 353–358, 1994.

MUSTAFA, Ghulam Raza *et al.* Heavy Metal Resistance in *Salmonella Typhimurium* and Its Association With Disinfectant and Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

NHUNG, Nguyen Thi; CHANSIRIPORNCHAI, Niwat; CARRIQUE-MAS, Juan J. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 4, 2017.

OBE, Tomi *et al.* Controlling *Salmonella*: strategies for feed, the farm, and the processing plant. **Poultry Science**, [s. l.], v. 102, n. 12, p. 103086, 2023.

OLADEINDE, Adelumola *et al.* Hotspot mutations and ColE1 plasmids contribute to the fitness of *Salmonella Heidelberg* in poultry litter. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. e0202286, 2018.

PARAMITHIOTIS, Spiros; HADJILOUKA, Agni; DROSINOS, Eleftherios H. Chapter 13 - Molecular Typing of Major Foodborne Pathogens. *In*: HOLBAN, Alina Maria; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai (org.). **Foodborne Diseases**. [S. l.]: Academic Press, 2018. (Handbook of Food Bioengineering). p. 421–472. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128114445000130>.

PARTRIDGE, Sally R *et al.* **Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.>

PILATI, Giulia Von Tönnemann *et al.* Bacteriophage-Associated Antimicrobial Resistance Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Brazilian Poultry. **Viruses**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1485, 2023.

PLATA, Germán *et al.* Growth promotion and antibiotic induced metabolic shifts in the chicken gut microbiome. **Communications Biology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 293, 2022.

REHMAN, Muhammad A. *et al.* First Detection of a Fosfomicin Resistance Gene, *fosA7*, in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolated from Broiler Chickens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 61, n. 8, 2017.

SERIBELLI, Amanda Ap *et al.* Insights about the epidemiology of *Salmonella Typhimurium* isolates from different sources in Brazil using comparative genomics. **Gut Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2021.

- SIELSKI GALVÃO SOARES, Luana *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance of Salmonella Heidelberg in the south of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 391–393, p. 110151, 2023.
- SUN, Lanqing *et al.* Salmonella Effector SpvB Disrupts Intestinal Epithelial Barrier Integrity for Bacterial Translocation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2020.
- TAMURA, Koichiro; STECHER, Glen; KUMAR, Sudhir. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.
- TANG, Biao *et al.* Genome-based risk assessment for foodborne Salmonella enterica from food animals in China: A One Health perspective. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 390, p. 110120, 2023.
- TAVARES, Adriel Azevedo Da Silva. **Perfil de virulência e resistência antimicrobiana de Salmonella Heidelberg isoladas de carcaças e cama de frangos**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Uberlândia, [s. l.], 2020.
- TIBA-CASAS, Monique Ribeiro *et al.* Emergence of CMY-2-Producing Salmonella Heidelberg Associated with IncI1 Plasmids Isolated from Poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 271–276, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0044>.
- TOKUDA, Maho; SHINTANI, Masaki. Microbial evolution through horizontal gene transfer by mobile genetic elements. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2024.
- TORRES-BARCELÓ, Clara. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. **Emerging Microbes & Infections**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–12, 2018.
- TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **TORTORA FUNKE CASE MICRO BIOLOGIA**. [S. l.: s. n.], 2016.
- TRITT, Andrew *et al.* An Integrated Pipeline for de Novo Assembly of Microbial Genomes. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. e42304, 2012.
- TSOLIS, R M *et al.* Fur regulon of Salmonella typhimurium: identification of new iron-regulated genes. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 177, n. 16, p. 4628–4637, 1995.
- UCHIYA, Kei-ichi *et al.* A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 18, n. 14, p. 3924–3933, 1999.
- VAN BOECKEL, Thomas P. *et al.* Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. **Science**, [s. l.], v. 365, n. 6459, 2019.
- VIKESLAND, Peter J. *et al.* Toward a Comprehensive Strategy to Mitigate Dissemination of Environmental Sources of Antibiotic Resistance. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 51, n. 22, p. 13061–13069, 2017.

VILELA, Felipe Pinheiro *et al.* Genomic analyses of drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg strains isolated from meat and related sources between 2013 and 2017 in the south region of Brazil. **Current Genetics**, [s. l.], v. 69, n. 2–3, p. 141–152, 2023.

WINFIELD, Mollie D.; GROISMAN, Eduardo A. Evolution and Ecology of *Salmonella*. **EcoSal Plus**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2004.

YAN, Shigan *et al.* Genomic virulence genes profile analysis of *Salmonella enterica* isolates from animal and human in China from 2004 to 2019. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 173, p. 105808, 2022.

YU, Deshui *et al.* Development of a Gateway-compatible pCAMBIA binary vector for RNAi-mediated gene knockdown in plants. **Plasmid**, [s. l.], v. 98, p. 52–55, 2018.

ZENG, H. *et al.* *Salmonella* prevalence and persistence in industrialized poultry slaughterhouses. **Poultry Science**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 100991, 2021.

ANEXO A – SEQUENCE READ ARCHIVE (SRA) DO GENBANK

Quadro 6 - Dados do genoma da sequence read archive(SRA)

Amostra	Data coleta	Acesso Genbak(SRA)	Cobertura alinhamento (%)	Tamanho genoma montado (pb)	Gene	%GC
9150	25/02/2020	SAMN3131788 8	95,27	4.928.815	4.735	52,06
9151	28/01/2019	SAMN3136697 5	92,09	4.945.093	4.757	52,09
9152	02/07/2019	SAMN3136738 6	85,33	5.079.999	4.909	52,01
9153	12/02/2020	SAMN3136779 3	86,99	4.969.963	4.783	52,05
9154	06/01/2020	SAMN3136797 2	88,36	4.898.004	4.687	52,09
9155	09/09/2019	SAMN3136832 7	85,45	5.073.343	4.893	52,00
9156	09/03/2020	SAMN3136934 2	85,31	5.076.465	4.910	52,00
9157	26/02/2020	SAMN3137013 4	87,78	4.931.462	4.733	52,17
9159	23/09/2019	SAMN3137031 2	86,15	5.028.381	4.845	50,02
9160	22/09/2020	SAMN3137034 5	85,47	5.063.524	4.888	50,02
9162	20/05/2019	SAMN3137047 7	85,37	5.055.072	4.877	52,04
9163	30/07/2019	SAMN3137097 0	86,68	5.000.398	4.799	52,05
9164	13/08/2019	SAMN3137227 0	87,8	4.901.221	4.707	52,17

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

ANEXO B – DETECTION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS FROM NARES OF ELDERLY LIVING IN A BRAZILIAN NURSING HOME

Iniciei o PPG no projeto de Caracterização *Staphylococcus aureus* em uma população idosa residente em instituição de longa permanência de Florianópolis-SC, no qual tive participação com experimentos complementares. Infelizmente por questões pessoais não foi possível dar continuidade ao projeto, mas os dados gerados contribuíram na complementação desse artigo, que foi publicado no *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.



Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Volume 108, Issue 1, January 2024, 116089



Original Article

Detection of *Staphylococcus aureus* from nares of elderly living in a Brazilian nursing home

[Damaris Miriã Martins](#)^a, [Emanuela Mendes Cardoso](#)^a, [Lilian Capellari](#)^a,
[Larissa Alvarenga Batista Botelho](#)^b, [Fabienne Antunes Ferreira](#)^a

Show more

Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.116089>

[Get rights and content](#)

Abstract

Asymptomatically nasal colonization by *Staphylococcus aureus* is a well-established risk factor for *S. aureus* infections. The aimed of the study was to identify the prevalence and factors associated with nasal carriage of *S. aureus* and Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) from individuals residing in one Brazilian nursing home (NH). Three time-separate nasal swab collections were obtained from the elderly enrolled. The *S. aureus* isolates identified were submitted to Antimicrobial Susceptibility test (AST). The study showed a high prevalence of *S. aureus* ($n=9$; 60%) and MRSA ($n=4$; 26.7%) among elderly. Resistance to erythromycin was the most detected. *S. aureus* or MRSA colonization could not be associated to the data collected on demographics, personal habits, and medical history of the participants. Despite the small number of individuals enrolled, our study can contribute to improve the control of *S. aureus* and MRSA dissemination within the community, especially among the most vulnerable like the elderly.

**ANEXO C – GENOMIC CHARACTERIZATION OF SALMONELLA
HEIDELBERG ISOLATED FROM THE BRAZILIAN POULTRY PRODUCTION
CHAIN**

Submissão deste trabalho no *Brazilian Journal of Microbiology*

----- Mensagem original -----

Assunto:Submission Confirmation

Data:08.03.2024 11:45

De:"BJMI - Editorial Office" <em@editorialmanager.com>

Para:"Fabienne Antunes Ferreira" <fabienne.ferreira@ufsc.br>

Responder para:"BJMI - Editorial Office" <narmadha.purusothaman@springer.com>

Dear Prof Dr Ferreira,

Thank you for submitting your manuscript,
"Genomic analysis of Salmonella Heidelberg isolated from the Brazilian poultry production chain", to Brazilian Journal of Microbiology

The submission id is: BJMI-D-24-00301
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's web site.

Your username is: fabienneaf

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/bjmi/>.

With kind regards,

Journals Editorial Office BJMI
Springer

ANEXO D – ANTIBIOGRAMA CEPAS DE *SALMONELLA* HEIDELBERG

Quadro 7 – Antibiograma realizado por Soares *et al.* 2023.

Amostra	AMX	KAN	EFT	ENR	FOS	CN	LSP	NEO	NOR	SUL	TET
9150	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
9151	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R
9152	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R
9153	S	S	S	I	S	S	S	S	R	R	R
9154	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R
9155	R	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R
9156	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
9157	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
9159	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R
9160	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R
9162	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R
9163	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
9164	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R

Fonte: Adaptado de Soares *et al.* 2023.

AMX: Amoxicilina (10µg). KAN: Canamicina (30µg). EFT: Ceftiofur (30µg). ENR: Enrofloxacina (5µg). FOS: Fosfomicina (50µg). CN: gentamicina (10µg). LSP: Lincomicina + espectinomicina (109µg). NEO: Neomicina (30µg). NOR: Norfloxacina (10µg). SUL: Sulfonamidas (300µg). TET: Tetraciclina (30µg). R: Resistente. I: Intermediário. S: sensível.