

VINICIUS DE CARVALHO MOURA

Identificação e caracterização molecular de perfis de virulência de *Salmonella* sp. obtidas a partir de águas superficiais de regiões agrícolas do Rio de Janeiro



**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Microbiologia
Paulo de Góes, da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como pré-requisito para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2023**

Trabalho a ser realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob orientação da Professora Dra. Raquel Regina Bonelli e coorientação da Dra. Gabriela Bergiante Kraychete.

Ficha catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

d278i de Carvalho Moura, Vinicius
Identificação e caracterização molecular de perfis de virulência de Salmonella sp. obtidas a partir de águas superficiais de regiões agrícolas do Rio de Janeiro / Vinicius de Carvalho Moura. -- Rio de Janeiro, 2023.
72 f.

Orientadora: Raquel Regina Bonelli.
Coorientadora: Gabriela Bergiante Kraychete.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Salmonella sp. 2. sorovares. 3. genes de virulência. 4. águas superficiais. I. Bonelli, Raquel Regina, orient. II. Bergiante Kraychete, Gabriela, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Vinicius de Carvalho Moura**
 DRE: 119031378

BANCA EXAMINADORA: Profa. Eliane de Oliveira Ferreira (Presidente)
 Profa. Alice Gonçalves Martins
 M.Sc. Matheus de Assis Côrtes Esteves
 Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: **“Identificação e caracterização molecular de perfis de virulência de *Salmonella* sp. obtidas a partir de águas superficiais de regiões agrícolas do Rio de Janeiro”**

Local: **Sala D-27/ IMPPG / CCS / UFRJ**
 Data e hora de início: **12 de janeiro de 2023 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 12 de janeiro de 2023.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora:

Eliane de Oliveira Ferreira

Profa. Eliane de Oliveira Ferreira

Alice Gonçalves Martins

Profa. Alice Gonçalves Martins

Matheus Côrtes Esteves

M.Sc. Matheus de Assis Côrtes Esteves

Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius

Aluno:

Vinicius de Carvalho Moura

Vinicius de Carvalho Moura

Orientador:

Raquel Regina Bonelli

Prof. Raquel Regina Bonelli
 Coorientador: Dra. Gabriela Bergiante Kraychete

Coordenador
 de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a minha mãe, Rejane, que me apoiou durante toda a minha vida, me ensinou a ser independente e trabalhar pelo que eu quero. Você sempre deixou claro que sente muito orgulho de mim e que deseja uma carreira próspera no caminho que eu escolher. Foram 4 anos e virão muito mais, Rejane. Sou imensamente grato por você estar ao meu lado nesse caminho. Eu te amo muito, mãe.

Agradeço à minha avó, Regina, que, embora não saiba dizer ao certo o nome do meu curso, me apoiou na escolha. Você demonstrou carinho por mim ao longo dos meus 21 anos o que foi essencial. Sem você em minha vida, eu definitivamente não conseguiria metade do que eu conquistei. Você fez tudo possível para que eu pudesse ter o conforto de simplesmente estudar e focar na minha vida pessoal. Você se assegurou que, durante todo o tempo que estive morando na sua casa, eu me sentiria bem, confortável, amado e despreocupado. Chegou a época em que eu irei zelar pelo seu bem-estar, vó. Eu te amo muito, voinha.

A minha madrinha, Vanessa, que me dá suporte sempre que surgem necessidades. São anos de muita orientação e incentivo a construir uma carreira profissional. Você foi, é e sempre vai ser uma das pessoas que irei me inspirar para construir a minha vida.

As minhas amigas, Carolina, Isabella e Thaís, que conheci em 2016 quando entrei no Pensi. Desde os meus primeiros dias naquele novo colégio, vocês se mostraram pessoas incríveis, amáveis e carinhosas. Cada uma com uma característica muito pessoal que fez eu me apaixonar por completo pelas três. Foi uma conexão única que tive com vocês. Em 2023 faremos 7 anos de amizade, que eu tenho plena certeza de que irá durar para toda a vida. Eu não vejo a minha vida sem nenhuma das três. Eu amo muito vocês.

Ao sense, meu grupo de amigos dentro da micro. São nomes que sem sombra de dúvidas conquistaram um espaço no meu coração. São vocês: Eduardo, Isabela, Matheus, Pedro, Ralice, Renan e Stefanie, que fizeram a minha jornada pelos 4 anos de graduação mais alegres. Vai ser um imenso prazer seguir a carreira acadêmica com alguns de vocês. Eu amo muito vocês.

Às minhas amigas de laboratório Adriane, Vick, Sarah, Jessica, e meu amigo Roberto, que fizeram do meu tempo em bancada no LImm mais agradável e feliz de se trabalhar.

À minha querida amiga Ana Clarisse, que me inspira a batalhar por tudo o que eu quero e mereço. Você me fez perceber que eu tenho o meu valor e que não devo me rebaixar por nada. Somos nós dois nesse caminho, onde, mesmo com todas as dificuldades, nós seguimos em frente e nos esforçando para minimizar os nossos atrasos. Eu te admiro muito.

Aos integrantes do projeto JIFSAN, Arthur, Bia, Luca e Martin, que não são apenas colegas de trabalho, mas também amigos. O meu trabalho nesse projeto foi mais suave com a presença de vocês.

Aos meus coorientadores Dennys e Gabi, que me ensinaram tanto de tantas coisas. Todo o conhecimento que eu tenho de bancada e bioinformática veio de vocês. Sonho em um dia ter 1/3 do conhecimento que vocês possuem. São pessoas que marcaram a minha graduação. Aproveito, também, para agradecer a Esther, que entrou no projeto em 2021 e se tornou uma presença emblemática e crucial para que o projeto caminhasse nesse período de pandemia.

A minha orientadora, Raquel, que é uma das pessoas que eu mais admiro. A Raquel foi o combustível que eu precisava para que eu decidisse iniciar a minha carreira acadêmica, sendo a minha maior inspiração. Você me mostrou as melhores formas de estudar e me organizar para que eu conseguisse o que eu precisava. Além de me orientar em questões pessoais, apoiou as boas escolhas e apontou as más escolhas que eu tomei durante esses 3 anos de orientação. Se não fosse pela sua orientação, Raquel, eu não teria a segurança que tenho hoje no meu trabalho. Agradeço imensamente pela confiança que depositou em mim e por todas as responsabilidades que você me atribuiu, pois me fizeram amadurecer e enxergar a importância do que nós fazemos. Você de fato me orientou. Eu serei eternamente grato por esses 3 anos e pelos próximos que virão.

Ao JIFSAN por ter financiado o projeto e ter criado oportunidades.

Ao CNPq por ter financiado a minha bolsa de iniciação científica por 2 anos.

À Fundação COPPETEC por estar gerenciando o projeto e a minha bolsa de iniciação científica.

Ao Instituto de Microbiologia e à UFRJ por fornecerem a infraestrutura física e o alicerce acadêmico para a realização deste trabalho. Mesmo com todas as dificuldades enfrentadas pelo sistema público de ensino nos últimos anos, estar em instituições de excelência é um divisor de águas no que diz respeito às potenciais oportunidades para alunos de graduação.

RESUMO

Vinicius de Carvalho Moura

Identificação e caracterização molecular de perfis de virulência de *Salmonella sp.* obtidas a partir de águas superficiais de regiões agrícolas do Rio de Janeiro

Orientadora: Raquel Regina Bonelli

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O gênero *Salmonella* tem duas espécies *S. enterica* e *S. bongori*. A primeira conta com seis subespécies (*S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* e *S. indica*) e mais de 2.600 sorovares; enquanto a segunda apresenta 23 sorovares. O gênero representa microrganismos enteropatogênicos, disseminados por fontes aquáticas, água de consumo e alimentos, em geral, de origem animal, sendo o gênero um importante causador de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA). O gênero bacteriano é um risco, também, à economia associada a sistemas de saúde e ao setor agropecuário. O objetivo do presente estudo foi identificar e avaliar a diversidade de isolados de *Salmonella sp.* obtidas em águas impactadas por atividade agrícola em duas grandes regiões do estado do Rio de Janeiro, Vassouras e São José do Vale do Rio Preto (SJVRP) e pesquisar a ocorrência de genes de virulência nestas mesmas amostras. Um total de 184 isolados, provenientes de 58 amostras de água, obtidas em 57 diferentes pontos de coleta, foram analisados. Para o processamento foram utilizados água peptonada, caldos de enriquecimento seletivo, como Rappaport-Vassiliadis e Tetrationato, meios diferenciais seletivos, como Ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e Ágar Xilose-Lisina-Tergitol-4 (XLT4). Foi realizada uma identificação presuntiva pela morfologia das colônias isoladas nos meios e a confirmação de gênero pelo espectrômetro de massas Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time off Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Todos os isolados confirmados como pertencentes ao gênero bacteriano, identificados presuntivamente como não clonais pela técnica de random amplification polymorphic DNA (RAPD), foram enviados para sequenciamento e os genomas analisados *in silico*. Segundo as análises pelo programa SeqSero2, foram identificados 31 sorovares na coleção de amostras, sendo Typhimurium o mais representado na coleção, com 31 isolados, seguido de Panama com 26 isolados, Newport com 25 e Sandiego e IV 43:z4z24z:-, ambos com 12 isolados. Os demais sorovares foram encontrados variando em número de 1 a 10 isolados. Foram identificados 142 genes de virulência, pelo programa Abricate. Entre eles, 45 foram encontrados em todos os 184 isolados. Análises de filogenia, como multi locus sequence typing (MLST) e single nucleotide polymorphisms (SNPs) de core genoma foram realizadas. O sequence type (ST) de cada isolado foi acessado pela plataforma Enterobase, onde foram identificados 35 STs na coleção de amostras. Dados de filogenia com base em MLST e SNPs de core genoma demonstraram a diversidade da coleção de amostras. Os resultados obtidos nesse estudo são únicos e podem auxiliar a compreensão da filogenia de bactérias do gênero *Salmonella* e virulência desses microrganismos disseminados em corpos d'água de regiões agrícolas do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: *Salmonella*, sorovares, genes de virulência, águas superficiais em regiões agrícolas

ABSTRACT

Vinicius de Carvalho Moura

Identificação e caracterização molecular de perfis de virulência de *Salmonella sp.* obtidas a partir de águas superficiais de regiões agrícolas do Rio de Janeiro

Orientadora: Raquel Regina Bonelli

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The genus *Salmonella* has two species *S. enterica* and *S. bongori*. The first has six subspecies (*S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* and *S. indica*) and more than 2,600 serovars; while the second has 23 serovars. The genus represents enteropathogenic microorganisms, disseminated by aquatic sources, drinking water and food, in general, of animal origin, and the genus is an important cause of food and waterborne illnesses. The bacterial genus is also a risk to the economy associated with health systems and the agricultural sector. The aim of the present study was to identify and evaluate the diversity of *Salmonella sp.* obtained in waters impacted by agricultural activity in two large regions of the state of Rio de Janeiro, Vassouras and São José do Vale do Rio Preto (SJVRP), and to investigate the occurrence of virulence genes in these same samples. A total of 184 isolates from 58 water samples obtained from 57 different collection points were analyzed. Peptone water, selective enrichment broths such as Rappaport-Vassiliadis and Tetrathionate, selective differential media such as *Salmonella-Shigella* Agar (SS) and Xylose-Lysine-Tergitol-4 Agar (XLT4) were used for processing. A presumptive identification was carried out by the morphology of the colonies isolated in the media and gender confirmation by the mass spectrometer Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time off Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). All isolates confirmed as belonging to the bacterial genus presumptively identified as non-clonal by the random amplification polymorphic DNA (RAPD) technique, were sent for sequencing. Genomes were analyzed *in silico*. According to the analyzes by the SeqSero2 program, 31 serovars were identified in the collection of isolates, with Typhimurium being the most frequently reported the collection, with 31 isolates, followed by Panama with 26 isolates, Newport with 25 and Sandiego and IV 43:z4z24z:-, both with 12 isolated. The remaining serovars were found ranging from 1 to 10 isolates. 142 virulence genes were identified by the Abricate program. Among them, 45 were found in all 184 isolates. Phylogeny analyses, such as Multi Locus Sequence Typing (MLST) and Core Genome Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were performed. The sequence type (ST) of each isolate was accessed through the Enterobase platform, where 35 STs were identified in the sample collection. The phylogeny analysis based on MLST and core genome SNPs demonstrated the diversity of the isolates in this collection. The results obtained in this study are unique and may help understanding the phylogeny of bacteria of the genus *Salmonella* and the virulence of these microorganisms disseminated in water bodies of agricultural areas of the Rio de Janeiro State.

Palavras-chave: *Salmonella*, serovars, virulence genes, surface water of agricultural areas

RESUMO PARA LEIGOS

Muitos tipos de *Salmonella* podem ser encontradas nas águas de regiões que produzem alimentos no Rio de Janeiro: um dado original!

Você provavelmente já ouviu falar em *Salmonella* ou Salmonelose quando o assunto é alimento. Mas você sabe o que é a *Salmonella*, a causadora da Salmonelose e outras doenças? Venha descobrir! *Salmonella* representa um gênero bacteriano responsável por causar infecções no trato gastrointestinal e provocar diversas doenças. em diversos hospedeiros animais, como bois, galinhas e porcos, por exemplo. Essa lista de animais inclui até répteis e anfíbios, o que demonstra a versatilidade de adaptação desse patógeno para com os seus hospedeiros. A criação e abate de animais em regiões com atividade agropecuária, portanto, pode levar à disseminação desse patógeno no ambiente, contaminando corpos d'água adjacentes às propriedades que os circundam, e conseqüentemente o alimento ali produzido.

Tendo isso em vista, este projeto desenvolvido na UFRJ em parceria com órgãos internacionais teve como objetivo caracterizar *Salmonella* isoladas em corpos d'água de regiões agrícolas do estado do Rio de Janeiro. As bactérias isoladas foram estudadas quanto à sua identidade de sorovar (uma classificação que historicamente é feita com base em marcadores de superfície e diferencia as Salmonellas, mas que hoje já dá para inferir por dados genômicos), perfil de virulência e diversidade filogenética. A ideia foi investigar a recorrência e prevalência dos tipos bacterianos encontrados.

Ao final das análises, foi identificada uma alta diversidade de identidade bacteriana nas Salmonellas estudadas (muitos sorovares diferentes), e o perfil de virulência destes sorovares também variaram um pouco. Foram encontrados sorovares reconhecidos como patogênicos a humanos, e outros nem tanto. Tal achado evidencia a circulação no ambiente deste patógeno, e nos lembra da necessidade de saneamento para que água de qualidade chegue a todos, e da importância da higienização eficiente de vegetais e tratamento térmico de produtos de origem animal utilizados na alimentação.

No mais, o estudo foi superinteressante porque foi o primeiro realizado com esta proposta no Rio de Janeiro. A boa notícia ainda é que os dados genômicos permitirão várias análises adicionais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Esquema representativo da classificação do gênero <i>Salmonella</i> ..	5
Figura 2 – Comparação de estruturas celulares entre <i>S. Typhi</i> e <i>S. Enteritidis</i>	7
Figura 3 – Rotas dispostas no estado do Rio de Janeiro.....	21
Figura 4 – Rotas: Rotas I e II de São José do Vale do Rio Preto.	22
Figura 5 – Rotas: Rotas I e II de Vassouras..	22
Figura 6 – Equipamentos utilizados na coleta de espécimes de água para pesquisa de <i>Salmonella sp</i>	23
Figura 7 – Fluxograma da metodologia de bioinformática adotada neste estudo..	30
Figura 8 – Diversidade de sorovares isolados em águas superficiais de regiões agrícolas do Rio de Janeiro, no período de 2019 a 2021.	31
Figura 9 – STs identificados em 184 isolados de <i>Salmonella sp</i> , obtidos em águas superficiais de regiões agrárias do Rio de Janeiro.	35
Figura 10 – Filogenia de 184 isolados de <i>Salmonella sp</i> . das grandes regiões de Vassouras e São José do Vale do Rio Preto.	38
Figura 11 – Heatmap de prevalência de 11 grupos de genes de virulência com a filogenia e identidade de sorovares..	39

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Primers referentes à amplificação randômica de sequências genômicas para diferenciação de linhagens de <i>Salmonella</i> por (Madico <i>et al.</i> , 1995).....	266
Tabela 1 – Distribuição de STs entre os 33 sorovares de <i>Salmonella spp</i> . obtidos a partir de águas superficiais de regiões agrárias do estado do Rio de Janeiro.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus célsius
µL	microlitros
ATR	do inglês “acid tolerant response”
AvrA	proteína de membrana interna
BPW	do inglês “Buffered peptone water”
Cdc42	do inglês “cell-division-cycle42”
Células M	células microdobradas
COVID-19	do inglês “Coronavirus disease – 19”
CU	do inglês “chaperone users”
DNA	do inglês “desoxyribonucleic acid”
dNTPs	do inglês “desoxynucleotide triphosphates”
DTHAs	doenças de transmissão hídrica e alimentar
EEA1	do inglês “early endosomal antigen 1”
FDA	Food and Drugs Administration
FGCs	do inglês “fimbrial genes clusters”
H ₂ O	monóxido de di-hidrogênio
H ₂ S	sulfureto de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
HilA	principal regulador transcricional da SPI-1
<i>hilD</i>	gene para a proteína HilD
HilD	regulador transcricional
HIV	do inglês “human immunodeficiency vírus”
IL	interleucina
iNTS	do inglês “invasive non-Typhoidal <i>Salmonella</i> ”
<i>Inv</i>	classe de genes referentes a estrutura de sistemas de secreção do tipo 3
JIFSAN	Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition
LPS	lipopolissacarídeo
MALDI-TOF	do inglês “Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight”
Mg ²⁺	cátions divalentes de magnésio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgtCB	proteínas transportadoras de magnésio
mL	mililitro
MLST	do inglês “multi locus sequence typing”
mM	micromolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	do inglês “nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells”
NGS	do inglês “Next Generation sequencing”
NTS	do inglês “non-Typhoidal <i>Salmonella</i> ”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	do inglês “Polymerase chain reaction”
PESAGRO	Empresa de Pesquisa Agropecuária
PI	do inglês “Pathogenicity islands”
pmol	picomolar
RAPD	do inglês “Random amplified polymorphic DNA”
RNAi	do inglês “Ribonucleic acid interference”
rpm	rotações por minuto
rRNA	do inglês “ribosomal ribonucleic acid”
RV	rapaport-Vassiliadis

SCV	do inglês “ <i>Salmonella</i> containing vacuole”
SIFs	do inglês “ <i>Salmonella</i> induced filaments”
SiiE	adesina gigante de <i>Salmonella</i>
Sip	do inglês “ <i>Salmonella</i> invasion protein”
SJVRP	São José do Vale do Rio Preto
SNPs	do inglês “Single nucleotide polymorphisms”
Sop	do inglês “ <i>Salmonella</i> outer protein”
SPIs	do inglês “ <i>Salmonella</i> pathogenicity islands”
SS	<i>Salmonella Shigella</i>
Sse	proteína efetora que regula o killing de macrófagos
STs	do inglês “Sequencing typing”
T3SS	do inglês “type 3 secretion system”
T4SS	do inglês “type 4 secretion system”
TS	do inglês “Typhoidal <i>Salmonella</i>
TT	tetracionato
VFDB	do inglês “Virulence Factors Database”
WGS	do inglês “Whole genome sequencing”
XLT4	Xilose-Lisina-Tergitol-4

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	viii
Resumo para Leigos	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas e Quadros.....	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
Índice	xiii
1 Introdução.....	1
1.1 Características do microrganismo e sua relevância para a saúde e a economia	1
1.2 Taxonomia de <i>Salmonella sp.</i> e sua classificação em virtude da patogenicidade	3
1.2.1 Taxonomia e a classificação por sorovares	4
1.2.2 Classificação de <i>Salmonella</i> conforme hospedeiros e patogenicidade.....	7
1.3 Aspectos epidemiológicos e manifestações clínicas.....	9
1.4 Patogenia e genes de virulência em <i>Salmonella</i>	11
1.4.1 Adesão	12
1.4.2 Invasão.....	14
1.4.3 Disseminação e persistência	15
1.4.4 <i>Salmonella</i> Pathogenicity Islands (SPIs).....	16
2 Justificativa e Contextualização	18
3 Objetivos	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 Metodologia	21
4.1 Coleta de amostras de água: pontos de amostragem e técnica utilizada.....	21
4.2 Enriquecimento e isolamento de <i>Salmonella</i>	23
4.3 Identificação bacteriana por MALDI-TOF	24
4.4 Diferenciação de linhagens por RAPD	25
4.5 Análises <i>in silico</i>	26
4.5.1 Curadoria de Qualidade	26
4.5.2 Montagem dos genomas	27

4.6	Identificação de sorovares <i>in silico</i>	27
4.7	Identificação de genes de virulência.....	27
4.8	Análise filogenética	28
5	Resultados	31
5.1	Identidade dos isolados	31
5.2	Genes de virulência.....	32
5.3	Análise por Multi Locus Sequence Typing (MLST)	33
5.4	Análise de SNPs de core genoma	36
6	Discussão.....	40
7	Conclusão.....	46
8	Referências:.....	47
9	Anexo	54

1 Introdução

1.1 Características do microrganismo e sua relevância para a saúde e a economia

O gênero *Salmonella* foi primeiramente isolado por Gaffky a partir de amostras clínicas de pacientes com febre tifoide, em meados de 1884, sendo posteriormente descoberto por Theobald Smith e Daniel Elmer Salmon a partir de amostras do intestino de porcos com febre suína. Em 1900, Joseph Leon Lignières propôs que o nome do gênero fosse *Salmonella*, em homenagem ao pesquisador Daniel Elmer Salmon, que trabalhou juntamente a Smith (1885) (Eng *et al.*, 2015; Ibrahim e Morin, 2018; Jajere, 2019).

O gênero *Salmonella* representa microrganismos com morfologia de bastonetes curtos, imóveis ou móveis com flagelos peritríquios; são gram-negativos e anaeróbios facultativos, e pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Em grande maioria não apresentam cápsula bacteriana. Não produzem esporos. São mesófilos capazes de crescer em temperaturas entre 5°C e 45 °C, com crescimento ótimo em 37°C e pH 7,0, com ocorrência de crescimento em pH entre 4,0 e 9,0. São microrganismos capazes de utilizar o citrato como fonte única de carbono, não fermentadores de sacarose e lactose, catalase positivos, oxidase, indol e acetoina negativos. Entretanto, faz parte das provas bioquímicas a consideração de que as subespécies e sorovares de *Salmonella* podem apresentar diferentes perfis bioquímicos, como a subespécie *diarizonae* ser fermentadora de lactose e o sorovar *Choleraesuis* não ser produtor de H₂S (Grimont e Weill, 2007; Trabulsi, 2015).

Salmonelose é considerada umas das infecções mais comuns em humanos e algumas espécies de animais, usualmente associada ao consumo de produtos alimentícios contaminados, como aves, ovos, carne, leite e vegetais, além do consumo de água contaminada por fezes e contato com animais infectados. Tais infecções culminam em quadros clínicos que podem variar de uma diarreia até sepse, conferindo ao gênero bacteriano uma grande relevância aos olhos de sanitaristas quando o assunto são as doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHAs). Neste contexto, além de fatores externos, como o sorovar envolvido e o nível de exposição, a saúde do hospedeiro também desempenha um papel na ocorrência da doença e gravidade dos sintomas a ela associados. Como em outras DTHAs, crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos em geral podem apresentar quadros mais graves numa infecção por *Salmonella* (Matsuoka *et al.*, 2004; Mezal *et al.*, 2014).

Estima-se que ocorram cerca de 1,3 bilhões de casos de salmonelose no mundo por ano, dentre os quais, 70% a 80% ocorrem na China (Desai *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2016). O

microrganismo apresenta grande influência na economia e no mercado de produtos agropecuários em países em diferentes níveis de desenvolvimento, devido ao seu impacto médico (Eng *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2013; Vilela *et al.*, 2020). Em 2011, nos Estados Unidos da América (EUA), foi estimado que, de 1 milhão de casos de infecções de origem alimentar por ano, 20.000 resultaram em hospitalização e cerca de 380 progrediram para óbito (Scallan *et al.*, 2011). Mesmo com a implementação de programas de vigilância e contenção de patógenos associados a água e alimentos, estes valores aumentaram, em cerca de 10 anos depois, para 1,35 milhões de casos de infecções, 26,500 hospitalizações e 420 óbitos por ano nos EUA em 2020 (CDC, 2022). Dados da África subsaariana sugerem uma situação ainda mais crítica, onde em uma estimativa de 1990 a 2017, ocorreram cerca de 66.000 óbitos por *Salmonella* Não-Tifóide invasiva (iNTS, do inglês invasive Non-Typhoidal *Salmonella*), sendo uma das mais comuns infecções da corrente sanguínea nesses países (James *et al.*, 2018; Tack *et al.*, 2020). Anualmente, estima-se que no mundo ocorram 680.000 mortes decorrentes de infecções por *Salmonella* Não-Tifóide (NTS, do inglês Non-Typhoidal *Salmonella*), onde na África sub-sahariana são acometidas principalmente crianças menores do que cinco anos de idade e indivíduos HIV positivos (Ao *et al.*, 2015; de Jong *et al.*, 2012; Post *et al.*, 2019). Vale ressaltar que em países desenvolvidos, os casos de Salmonelose levam a quadros de doença autolimitada, mas em países em desenvolvimento frequentemente culminam em agravações da doença. Isso nos leva a uma discussão sobre o elitismo classista e racista evidenciado pela atenção direcionada da saúde pública internacional de órgãos como Organização Mundial de Saúde (OMS) para problemas que afetam países já desenvolvidos, muitas vezes negligenciando a vigilância de microrganismos patogênicos com relativa alta taxa de mortalidade em países em desenvolvimento.

Uma outra perspectiva de análise transpassa a questão médica ao interagir diretamente com questões econômicas, como a produção de leite e carne. Um estudo realizado por Nielsen e colaboradores analisou por 10 anos *Salmonella* Dublin em gado infectado, atribuindo parâmetro de qualidade do manejo desses animais no estudo, como muito bom, bom, pobre e muito pobre. Os resultados indicaram uma significativa influência dos níveis de cuidado com os animais na presença desse patógeno, onde em animais sujeitos a cuidados mais precários eram mais contaminados com o microrganismo; o que certamente impactou na produção de leite e novilhos, com resultados consideravelmente importantes para o âmbito econômico quando aplicada a análise em escala global (Nielsen, 2013).

No Brasil, observa-se uma grande preocupação quanto à ocorrência de *Salmonella* nas culturas de porcos e principalmente aves, importantes tanto para o mercado interno como sendo

produtos de exportação (Dos Santos Bersot *et al.*, 2019; Alikhan *et al.*, 2022). A este respeito, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento apresentou (MAPA), em 2003, uma instrução normativa SDA n° 78 de normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de bactérias do gênero *Salmonella*, com acentuada relevância para os sorovares *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* (MAPA, 2003). Estes sorovares são comumente associados a aves, ovos e produtos derivados. Portanto, evita-se, assim, a disseminação desses espécimes bacterianos pela rota alimentar. Vale ressaltar que em 2020 o Brasil ganhou destaque por se tornar o país com o maior número de exportação de carne de aves no mundo, com um total de 4,3 milhões de toneladas (20,9% de exportação global), apresentando o quarto maior rebanho de galináceos no mundo, com 1,5 bilhão de cabeças (5,6% do total) (Voss-Rech *et al.*, 2015; EMBRAPA, 2021).

Mesmo sendo alvo de controle pela indústria de produção de alimentos, *Salmonella* é muito importante no contexto das DTHAs no Brasil. Dados de 2018 relatam que o gênero *Salmonella* representava 35% das associações com DTHAs com agente etiológico identificado no Brasil, seguidos de *Escherichia coli* (28,2%) e *Staphylococcus aureus* (18,2%) (Food Safety Brasil, 2019). Na maioria das vezes, a DTHA causada por *Salmonella* apresenta-se como uma síndrome de gastroenterite autolimitada, com sintomas de diarreia, febre, vômito e dores abdominais (Campos *et al.*, 2019; CDC, 2022). A principal forma de se evitar contrair esta infecção é o correto tratamento térmico de alimentos e a prática de higiene. Estas medidas podem ser dificultadas em locais onde a população não tem acesso a saneamento básico, e o esgoto é levado a rios e mares, contaminando peixes e vegetais (irrigação), e por consequência, levando a infecções por *Salmonella* através de alimentos não antes relacionados ao microrganismo. Além disso, a contaminação de alimentos pode-se dar ao longo da cadeia de processamento, se o alimento entrar em contato com superfícies contaminadas (como esteiras, facas e mãos de manipuladores), num fenômeno conhecido como “contaminação cruzada” (Carrasco *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2018; Seribelli *et al.*, 2020)

1.2 Taxonomia de *Salmonella* sp. e sua classificação em virtude da patogenicidade

Assim como outros membros da família *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* é um gênero bacteriano que representa bactérias enteropatogênicas (Fookes *et al.*, 2011; Suay-García e Pérez-Gracia, 2021).

Diversos esquemas taxonômicos já foram propostos para a classificação de cepas desse gênero bacteriano. O esquema mais usual é o proposto por Kauffmann-White. Entretanto, a

esquemática de *Salmonella* não é clara, apresentando alguns contrapontos que dificultam a classificação desses microrganismos (Brenner *et al.*, 2000).

1.2.1 Taxonomia e a classificação por sorovares

No início do século XX, a identificação das cepas de *Salmonella* era feita em virtude das condições clínicas ou do hospedeiro de onde o microrganismo era isolado. No entanto, a partir de 1920, dois grupos de microbiologistas, liderados por Fritz Kauffmann e Philip Bruce White, propuseram uma taxonomia unificada para o gênero *Salmonella*, já considerando gênero, espécies e sorovares. Cerca de 40 anos depois, Kauffmann propôs que cada sorovar identificado deveria ser considerado uma nova espécie, o que teria resultado, atualmente, em mais de 2.500 espécies de *Salmonella*. Entretanto, tal proposta foi refutada por Crosa e colaboradores, que por técnicas de hibridização de DNA-DNA, constatou a similaridade genômica em nível de espécies dos sorovares, onde a única exceção era a subespécie V, *S. enterica* subsp. *bongori*, sendo, então, reclassificada como uma espécie, *S. bongori* (Brenner *et al.*, 2000; Crosa *et al.*, 1973; Ryan *et al.*, 2017).

Desde então, o esquema mais comumente utilizado, Kauffmann-White, vem sofrendo atualizações em virtude do desenvolvimento de novas tecnologias e da facilidade de acesso a elas, o que tem afetado principalmente a diferenciação e identificação de sorovares. Com dados genômicos tornou-se possível identificação de sorovares de forma mais simplificada, a consolidação da classificação do gênero em duas espécies, e inclusive, por análises de sequências nucleotídicas correspondentes a enzimas comuns em diferentes bactérias, a constatação de que *Salmonella* divergiu do mesmo ancestral de *Escherichia coli* há cerca de 100 milhões de anos (Ochman e Wilson, 1987; Doolittle *et al.*, 1996; BRASIL, 2011; Trabulsi, 2015). Entre *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, a primeira é costumeiramente associada a infecções em animais de sangue quente, ou endotérmicos, como humanos, porcos, bois e aves; enquanto a segunda está associada a animais de sangue frio, ectotérmicos, como insetos e alguns vertebrados (répteis e peixes). É importante dizer que tal associação pode ser imprecisa; é possível a infecção em humanos por *S. bongori* (BRASIL, 2011; Fookes *et al.*, 2011).

A espécie *S. enterica* apresenta em sua constituição seis subespécies, também associadas a números em romanos, que são: I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II, *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae*; e VI, *S. enterica* subsp. *indica* (Chattaway *et al.*, 2021; Lan *et al.*, 2009). As subespécies de *Salmonella* também seguem um padrão comportamental em relação à

preferência por hospedeiros. As possibilidades variam entre hospedeiros endotérmicos e ectotérmicos, onde *S. enterica* subespécie *enterica* é comumente encontrada em animais de sangue quente, enquanto as demais subespécies são encontradas em animais de sangue frio. Entretanto, vale salientar que os sorovares da subespécie *enterica*, assim como os das demais subespécies de *S. enterica*, podem ocasionar infecções em hospedeiros de sangue quente e sangue frio, mesmo que haja uma predileção de tais sorovares por seus respectivos hospedeiros (Lamas *et al.*, 2018). A **Figura 1** apresenta um esquema que ilustra a taxonomia de *Salmonella* com os números de sorovares já identificados em cada espécie e subespécie.

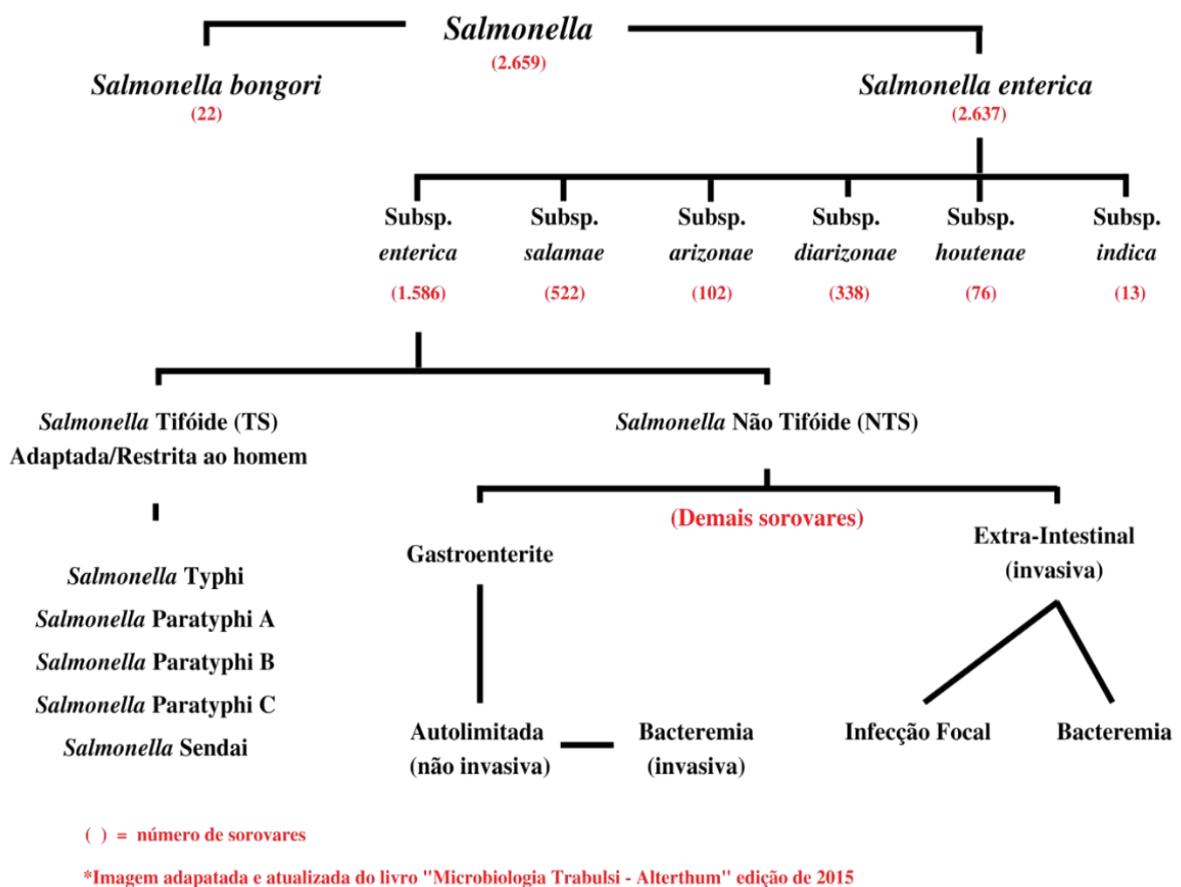


Figura 1 –Esquema representativo da classificação do gênero *Salmonella*: Imagem esquematizada da distribuição dos sorovares e das subespécies em suas respectivas espécies, com alusão a características clínicas. Imagem adaptada e atualizada do livro (Trabulsi, 2015) com dados disponibilizados por (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014).

A partir da identificação das subespécies e do conhecimento de diferentes quadros clínicos, geolocalização e hospedeiros, a classificação de *Salmonella* avança para a identificação de sorovares. Originalmente, esta era feita com base em anticorpos reativos para antígenos presentes na superfície da bactéria, caracterizando uma identificação por técnicas

clássicas de sorologia. Ainda, métodos de biologia molecular, como Whole Genome Sequencing (WGS), têm se mostrado eficazes quanto à caracterização do sorovar, apresentando acurácia maior do que 99% ao combinar análises *in silico* em plataformas como SeqSero com a técnica de MLST. Tal estratégia pode ser uma importante vantagem diante da tipificação custosa e onerosa que é a sorologia de *Salmonella* (Banerji *et al.*, 2020; Chattaway *et al.*, 2021)

No esquema de Kauffmann-White atualmente vigente são considerados os seguintes antígenos: antígeno somático (O), antígeno flagelar (H1 e/ou H2) e antígeno Capsular (Vi). Entre estes, os antígenos somáticos (O) associados à composição do LPS (lipopolissacarídeos presente na membrana externa de bactérias gram-negativas) são codificado por clusters de genes *rfb*. O antígeno flagelar (H), codificado pelos genes *fliC* e *fljB*, é referente à expressão de duas fases de flagelina (H1e/ou H2, podendo não apresentar qualquer fase, sendo uma célula imóvel pela ausência de flagelos). Tal variabilidade deve-se ao fato de que os genes *fliC* e *fljB* têm sua expressão regulada por uma invertase *hin* e pelo gene *fljA*, repressor de *fliC*. O antígeno capsular (Vi), por sua vez, não é usual em todas os sorovares de *Salmonella*, sendo as estirpes dos sorovares Typhi, Paratyphi C e Dublin, as únicas capazes de produzi-lo. A cápsula bacteriana desempenha um papel na evasão do sistema imune, estabilização da bactéria no lúmen intestinal, formação de biofilme, entre outras características. Ao analisar o conjunto dos antígenos aqui citados, apenas o antígeno flagelar apresenta papel indispensável para o processo infeccioso entre todos os sorovares. A cápsula bacteriana, por outro lado, embora contribua para a infecção de *Salmonella*, não é necessária para que ocorra, vide que apenas três sorovares – dos mais de 2.600 - a expressam (Typhi, Paratyphi C e Dublin). O LPS não apresenta função que contribua para o processo infeccioso. (Banerji *et al.*, 2020; Wain *et al.*, 2005).

Assim, a fórmula antigênica de *Salmonella* consiste em três posições: a primeira relativa ao antígeno O (em números) e as outras duas a antígenos H (em letras e números respectivamente). Os dados referidos a cada antígeno são separados por dois pontos (O:H:H). Nos três casos, as possíveis identidades de antígenos identificados são separadas por vírgulas (Banerji *et al.*, 2020). A fórmula antigênica pode ser utilizada para todas as linhagens de *Salmonella*. No entanto, sorovares pertencentes à *Salmonella enterica* subsp. *enterica* são também comumente nomeados de acordo com a localização geográfica ou os hospedeiros de onde foram primeiramente isolados. Neste caso, o sorovar é indicado sem o uso de itálico e com a primeira letra do nome em maiúsculo (Popoff *et al.*, 2000). Atualmente já foram identificados mais de 2.600 sorovares de *Salmonella*, sendo que *Salmonella enterica* subsp. *enterica* apresenta mais de 1.500 destes, e é responsável por 99% das infecções em animais e humanos

(Grimont e Weill, 2007; Ferrari *et al.*, 2019). A **Figura 2** evidencia as principais estruturas de superfície em *Salmonella*, com destaque para os antígenos de identificação dos sorovares.

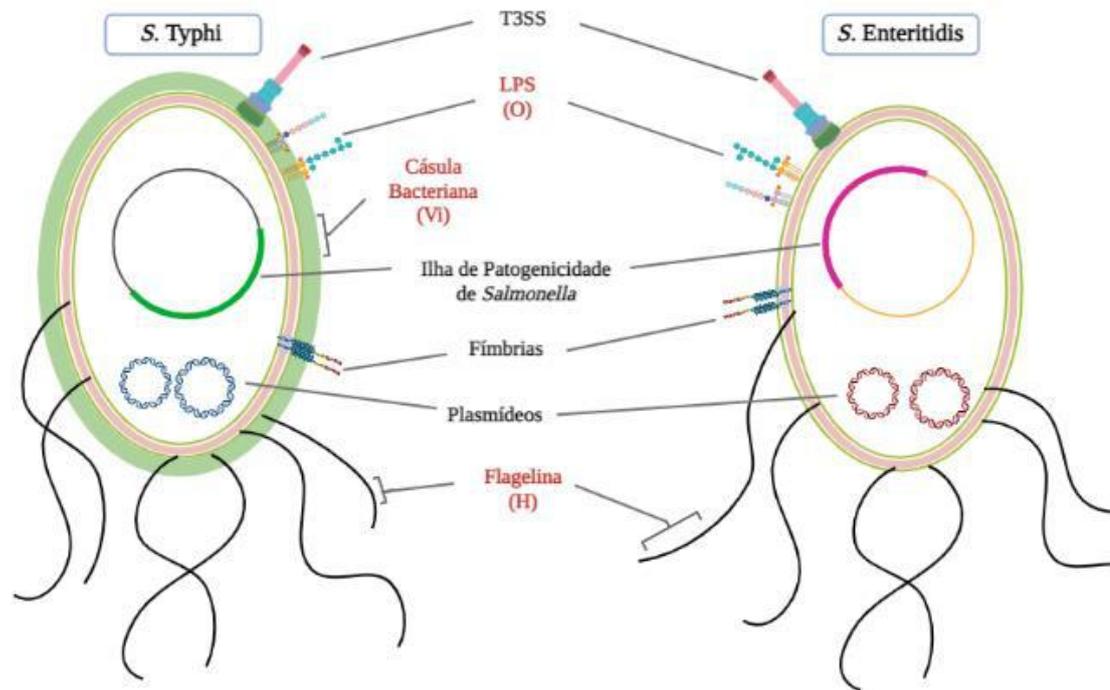


Figura 2 – Comparação de estruturas celulares entre *S. Typhi* e *S. Enteritidis*. A célula da esquerda, *S. Typhi*, apresenta todos os componentes celulares característicos do gênero *Salmonella*, em destaque o Lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa, representando o antígeno somático (O), os flagelos, representando o antígeno flagelar (H) e em especial, exclusivo apenas de alguns sorovares mais virulentos, o antígeno capsular (Vi). A célula à direita, *S. Enteritidis*, apresenta os mesmos componentes, com exceção da cápsula bacteriana (Vi) (Adaptação realizada a partir do paper de Jong *et al.*, 2012)

1.2.2 Classificação de *Salmonella* conforme hospedeiros e patogenicidade

Ao longo dos anos foi estabelecida uma classificação genérica do gênero *Salmonella* que se baseia nos possíveis quadros infecciosos, influenciados pela abrangência de hospedeiros a qual um determinado sorovar pode alcançar. Como mencionado anteriormente, os mais de 1.500 sorovares de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* representam 99% das infecções em animais e humanos, onde alguns sorovares têm preferências por hospedeiros. Assim *S. Typhimurium* e *S. Cholerasuis* são comumente associadas à porcos, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são comumente associadas à frangos, enquanto *S. Enteritidis* e *S. Typhi* são comumente disseminadas entre humanos. Entretanto, vale salientar que os sorovares *Typhimurium* e *Enteritidis* são generalistas, causando infecções em diferentes hospedeiros (de Jong *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2019; Hur *et al.*, 2011).

Com relação à prevalência de diferentes sorovares em casos de salmonelose no Brasil, um estudo envolvendo 3554 amostras isoladas de humanos no estado de São Paulo entre 1996 e 2003, encontrou como sorovar mais prevalente *S. Enteritidis* (67% dos casos), seguido, em menores porcentagens por sorovares Typhimurium (5,2%), 4,5,12:i:- (5,1%) Typhi (4,0%), Dublin (2,5%), Infantis (2,3%), Agona (1,4%), Panamá (1,0%), Oranienburg (0,8%), Saintpaul (0,8%), Newport (0,7%), Hadar (0,6%) e Javiana (0,5%), entre outros 55 sorovares que, individualmente, representavam menos de 0,5% da coleção (Fernandes *et al.*, 2006). Em contraste, outro estudo focado em 2123 amostras de *Salmonella* isoladas de frangos em todo o Brasil identificou que desde a década de 1960, os sorovares Pullorum e Gallinarum são frequentemente isolados desses animais, mas a partir da década de 1980 passaram também a ser recorrentemente isolados desses hospedeiros os sorovares Typhimurium, Heidelberg, Enteritidis, Infantis e Hadar (Hofer *et al.*, 1997). Mais recentemente, os sorotipos Typhimurium e Choleraesuis foram associados a infecções em porcos, em um estudo que envolveu nove estados brasileiros (Meneguzzi *et al.*, 2017).

Além dessa predileção por hospedeiros específicos, alguns sorovares são capazes de causar infecções invasivas e, conseqüentemente, mais graves. Salmonelas com capacidade invasiva podem causar doenças como sepse, meningite, osteomielite e bacteremia, a depender do hospedeiro (Mankhambo *et al.*, 2006; Crump *et al.*, 2015; Rohilla *et al.*, 2019). Essas características são apresentadas em conjunto ao espectro de hospedeiro do sorovar, o que dá origem a uma divisão em dois subgrupos clínicos de sorovares: os restritos ao hospedeiro humano (*Salmonella* Tifóide - TS) e os ubíquos/não específicos ou generalistas (*Salmonella* Não Tifóide - NTS) (Feasey *et al.*, 2012).

A este respeito, sorovares de *Salmonella* que apresentam um repertório genômico diverso são capazes de infectar um amplo espectro de hospedeiros, sendo, então, denominadas generalistas, como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. À medida que esse repertório diminui, com a degradação de genes “generalistas” e adoção de genes de virulência mais específicos para algum hospedeiro, os sorovares são designados restritos, tais quais *S. Typhi* em humanos e *S. Gallinarum* em frangos. Tais descrições representam os extremos da associação dos sorovares com seus hospedeiros, o que infere que pode ser atribuído aos sorovares com predileção, mas não restrição, de hospedeiros o nome de “adaptados”, como *S. Dublin* em gado e *S. Choleraesuis* em suínos. Sorovares adaptados são usualmente associados a hospedeiros específicos, mas podem ser encontrados em outros (Feasey *et al.*, 2012).

Em geral, as estirpes que apresentam hospedeiros restritos são capazes de promover infecções mais invasivas. É comum, entretanto, que os animais infectados por sorovares

adaptados, mas não restritos, sejam assintomáticos, tornando-se reservatórios desses microrganismos. Alguns exemplos seriam os sorovares Choleraesuis e Dublin, que são adaptados a suínos e gado, respectivamente, mas podem ocasionar infecções em humanos (Uzzau *et al.*, 2000). Em raras situações NTS causam infecções extraintestinais levando a quadros de bacteremia e infecção focal. Essas infecções são causadas por NTS denominadas invasivas, ou iNTS (CDC, 2019a; Uzzau *et al.*, 2000). Sorovares como *S. Dublin* e *S. Choleraesuis*, por exemplo, são comumente identificados em casos de bacteremia. Em um estudo publicado por Wilkins & Roberts, 1988, com 6564 amostras de NTS de um período de janeiro de 1969 a dezembro de 1983, 194 (~3,0%) das amostras foram isoladas de espécimes clínicos extraintestinais. Das 194 amostras, 38 eram Typhimurium, 9 Enteritidis, 4 Dublin e 1 Choleraesuis. Entretanto, quando observada a proporção de isolados extraintestinais/isolados totais foi identificada uma tendência *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* como sorovares mais invasivos. Os resultados foram: Choleraesuis 1:1 (100%); Dublin 4:6 (66,7%); Enteritidis 9:303 (3,0%); e Typhimurium 38:1737 (2,2%).

1.3 Aspectos epidemiológicos e manifestações clínicas

As manifestações clínicas de uma infecção por *Salmonella* variam de acordo com o sorovar causador da infecção. Sabe-se que os sorovares de TS possuem humanos como seus únicos hospedeiros, sendo disseminados pela ingestão de alimentos e água contaminados com fezes humanas. Portanto, a disseminação desse organismo é atrelada à ausência de um tratamento adequado de dejetos, acesso à água e comida contaminada e, possivelmente, ausência de noções básicas de higiene. Tais sorovares, então, são comumente encontrados em países não industrializados, que muitas vezes carecem de tais práticas. As NTS, por sua vez, são encontradas em todos os países, com maior prevalência em países não industrializados, dado que para o controle de NTS deve haver programas de vigilância e normas reguladoras de patógenos associados a DTHAs. As NTS agrupam os sorovares de *Salmonella* que não apresentam um hospedeiro exclusivo, e podem infectar diferentes organismos, o que lhes permite serem disseminadas pelo ambiente (águas contaminadas com dejetos e restos de abates) e produtos alimentícios de origem animal e vegetal, sendo também disseminada em países industrializados. Tal vigilância, portanto, deve ser focada em alimentos de diferentes origens, inclusive os prontos para consumo (MAPA, 2003; Olsen *et al.*, 2003; Gal-Mor *et al.*, 2014).

Normalmente as infecções causadas por NTS levam a quadros de gastroenterite autolimitada, cujo controle não depende do uso de antimicrobianos. O principal sintoma da gastroenterite, a diarreia, é decorrente da invasão da *Salmonella* no epitélio gastrointestinal, que

leva a um influxo massivo de neutrófilos, resultando em uma diarreia inflamatória. A gastroenterite aguda é caracterizada pela presença de sangue nas fezes e acompanhada de outros sintomas sistêmicos, como febre, cólica abdominal, náusea, vômito e diarreia. Em determinados casos (crianças menores do que 1 ano e imunossuprimidos), alguns indivíduos são mais sugestivos a infecções sistêmicas por bacteremia (Wen *et al.*, 2017). Cabe ressaltar a alta incidência de casos de gastroenterite, sendo causadora cerca de 94 milhões de casos e 155 mil fatalidades (Majowicz *et al.*, 2010).

As *Salmonellas* Tifoides, por sua vez, causam a febre entérica, que é conhecida como febre tifoide e paratifoide, a depender do sorovar causador da infecção (*S. Typhi* e *S. Paratyphi*, respectivamente) (Buckle, Walker, & Black, 2012). A manifestação clínica de um caso de febre entérica pode resultar em um quadro mais leve, com febre baixa, mal-estar e tosse seca, podendo variar para um quadro mais grave, com febre alta, desconforto abdominal e estado mental alterado. A febre alta pode durar cerca de 3 dias, acompanhada de quadros de anorexia, náusea, vômito, dores abdominais, fezes moles, mialgia, letargia, tosse seca, dores de cabeça e convulsões. Diferentes complicações podem ocorrer, como perfuração intestinal (mais grave, com alta taxa de mortalidade), miocardite, hepatite, choque séptico e meningite (Qamar, Hussain, & Qureshi, 2022).

Um estudo retrospectivo feito por Rahman e colaboradores com 954 crianças menores do que 15 anos diagnosticadas clinicamente com febre tifoide, pacientes do Hospital Universitário da Universidade de Ilorin, Nigéria, entre 1984 e 1999, detectou que 108 (11%) delas apresentaram perfuração ileal, uma complicação do quadro infeccioso de *Salmonella* tifoide. Estes indivíduos também apresentaram febre (108, 100%), dor abdominal (98, 90,6%), vômito (65, 60%) e diarreia (37, 34%), demonstrando uma variada manifestação dos sintomas (Rahman *et al.*, 2001). Estudos indicam que pacientes convalescentes de febre entérica não tratados podem continuar excretando *S. Typhi* através das fezes mesmo após 3 meses do término da infecção. Alguns casos referenciam portadores de longo prazo, podendo excretar o microrganismo por anos. Ou seja, tais portadores passam a se tornar uma fonte de disseminação de *Salmonella* (Parry *et al.*, 2002).

Infecções ocasionadas por iNTS são descritas como processos ocasionados por *Salmonella* Não Tifóide em indivíduos com imunodeficiência, o que lhe permite a evasão do sistema imune e invasão do organismo. Tal imunodeficiência pode ser associada à idade, má nutrição e casos de infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), quadros que podem facilitar a instalação de eventuais infecções oportunistas e/ou invasivas, como é o caso das iNTS. Um trabalho conduzido por Crump e colaboradores no Centro Médico Cristão

Kilimanjaro, Tanzania, avaliou 403 pacientes consecutivos ao longo de um ano que apresentassem mais de 13 anos de idade e deram entrada no hospital com febre igual ou maior a 38° C. Destes, considerando os 161 infectados com HIV, 1,2% (2) dos pacientes apresentavam infecção por NTS e 1,2% (2) infecção por TS, entre vários outros agentes identificados. No entanto, curiosamente, entre os indivíduos não infectados com HIV, foi detectada uma maior taxa de infecções por *S. Typhi* (24 pacientes; 9,8%) e zero infecções por NTS. Autores destacam que o uso preventivo de profilaxia com sulfametoxazol-trimetoprim pode estar associado ao aparente efeito “protetivo” para bacteremia por *Salmonella* em pacientes portadores do HIV. No entanto, é notável a questão de que entre os não portadores do vírus, apenas o sorovar classicamente invasivo foi identificado causando o quadro, e não NTS (Crump *et al.*, 2011). Outros estudos sugeriram que casos de infecções prévias por malária poderiam favorecer o acometimento de uma infecção por uma iNTS (Gal-Mor *et al.*, 2014; MacLennan, 2014). Um estudo que investigou, de 1999 a 2007, a incidência de casos de malária e outras doenças de origem bacteriana no Hospital do Distrito de Kilifi, Kenya, relatou uma relativa associação entre casos de infecções invasivas como a bacteremia (por NTS e outras bactérias) e malária (Scott *et al.*, 2011).

1.4 Patogenia e genes de virulência em *Salmonella*

A virulência atrelada ao gênero *Salmonella* é correspondente à capacidade de infecção, persistência da infecção e disseminação do microrganismo. Por se tratar de uma bactéria enteropatogênica, o seu sítio infeccioso é o lúmen do trato gastrointestinal, em específico, as células epiteliais do intestino, as células M, as células dendríticas e os macrófagos residentes. Em geral, a infecção de células M é mais rápida (Santos & Bäumler, 2004).

Dadas as rotas de aquisição de *Salmonella*, por se tratar de um organismo associado à DTHAs, é de praxe que ele seja contraído por via fecal-oral. É bem descrito na literatura que para que ocorra a infecção, o patógeno precisa resistir ao ambiente hostil que é o do estômago, para assim colonizar o intestino e promover a infecção. Com a sobrevivência das células bacterianas, inicia-se o processo de infecção, processo esse que é dividido em 3 etapas: (i) adesão; (ii) invasão; e (iii) disseminação. A adesão consiste na associação de proteínas adesinas expressas na superfície da célula bacteriana que, em associação às proteínas de superfície das células hospedeiras, promovem o estabelecimento da bactéria no lúmen intestinal. A invasão está relacionada ao engolfamento da *Salmonella*, por um processo chamado “ruffling de membrana”, que consiste na projeção da membrana eucariótica, induzida por proteínas efetoras, secretadas por sistemas de secreção tipo 3 (T3SS), até que ocorra o englobamento da bactéria

e, então, invasão da célula eucariótica. Por fim, ao final e ao longo de diversos processos de persistência da infecção da célula (formação de vacúolos incompatíveis com a formação de fagolisossomos, inibição de apoptose celular, proteção do seu vacúolo, entre outras), o patógeno, por intermédio de proteínas efetoras, promove a sua disseminação pelo hospedeiro pela infecção de células da imunidade inata, os macrófagos. Dada a infecção dos macrófagos, a *Salmonella* torna-se capaz de infectar outros sítios anatômicos (Haraga *et al.*, 2008; Hume *et al.*, 2017).

A partir da infecção do trato gastrointestinal, a depender do caso, o hospedeiro passa a se tornar um portador e reservatório desse microrganismo, o que, numa infecção crônica, o permite disseminar o patógeno por meio de suas excretas. Por fim, pode-se dizer que *Salmonella* possui diversos mecanismos de virulência, o que a torna um patógeno de fácil disseminação (via alimentar) e com imponentes agravamentos na saúde (Rehman *et al.*, 2019).

Para se entender melhor a patogênese de *Salmonella*, faz-se necessária a compreensão de agentes facilitadores e que persistem a infecção. Esses agentes são os fatores de virulência, codificados por genes presentes no cromossoma bacteriano e em plasmídeos. Todo o processo infeccioso conta com a expressão desses genes na adesão, invasão e persistência e disseminação do patógeno (Wang *et al.*, 2020). Para uma melhor descrição, as etapas serão divididas em subtópicos:

1.4.1 Adesão

Para que a colonização ocorra, a *Salmonella* precisa ser ingerida pelo hospedeiro. Geralmente, a aquisição do patógeno se dá pela ingestão de um alimento, água contaminada ou contato com outros animais contaminados (Rukambile *et al.*, 2019). A *Salmonella*, então, passa pelo estômago, um ambiente ácido e danoso à célula bacteriana. A sobrevivência da *Salmonella* e outros patógenos bacterianos se dá, em grande parte, pela proteção da célula por barreiras físicas exercidas pelo próprio alimento que as carregam, o que promove a proteção contra o HCl, e possivelmente ativando diferentes genes de virulência do patógeno, como a Resposta Ácido-Tolerante (ATR), induzida pela expressão do gene *fur*, um importante regulador da ATR. Dada a sobrevivência ao pH mínimo do estômago, a *Salmonella*, já no intestino, atravessa a mucosa presente na parede intestinal e interage com as células epiteliais (dos Santos *et al.*, 2019; Foster, 2008; Palmer e Slauch, 2017).

A adesão é promovida por fímbrias adesivas e proteínas adesinas presentes na membrana da bactéria, que se ligam ao epitélio celular da célula hospedeira, mais especificamente às células M (Microdobradas). As fímbrias de *Salmonella* estão contidas em

clusters de genes fimbriais de *Salmonella* (FGCs), que contém entre 4 e 15 genes relativos a elas, e codificam proteínas que desempenham diferentes papéis, sejam na montagem, estrutura e regulação necessárias para a montagem extracelular da fímbria. Existem diversos genes referentes às estruturas fimbriais, o que infere em mais de uma possibilidade de montagem dessas estruturas. Tais formas de montagem das fímbrias permitem uma forma de classificar as mesmas, que são divididas em 3 vias: (i) Chaperone-usher (CU); (ii) via extracelular de nucleação-precipitação (N/P); e (iii) um sistema de secreção do tipo 4 (T4SS). Vale ressaltar que a via mais comum nos genomas de *Salmonella* é a via Chaperone-Usher, seguida da N/P e T4SS. Além da estrutura robusta das fímbrias, há a presença de adesinas, outras sub-unidades componentes da extremidade da fímbria. É esta subunidade terminal a responsável pela adesão em si (Rehman *et al.*, 2019).

A adesão de *Salmonella* às células polares do tecido epitelial é resultado de um processo que envolve uma adesina e fímbrias que são codificadas em diferentes ilhas de patogenicidade. A SiiE é uma adesina gigante (595 kDa) descrita como um importante fator na invasão de células epiteliais. Ela é codificada pela Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 4 (SPI4), no mesmo locus que codifica *SiiCDF*. No entanto, a expressão de genes da SPI4 é corrigida com genes de um Sistema de Secreção Tipo 3 (T3SS) codificado em outra ilha de patogenicidade. Tal correção tem razões funcionais, uma vez que a adesão mediada por SiiE é rapidamente seguida pela invasão mediada por T3SS, tema que será tratado em mais detalhe no tópico a seguir (Wagner *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2019).

Para além do papel das fímbrias na associação membrana celular bacteriana-membrana celular do hospedeiro, existe o papel de proteínas translocases, como as SipB, SipC e SipD, que promovem uma associação mais íntima com a membrana do hospedeiro. Um estudo promovido por Lara-Tejero e Galán identificou que as proteínas SipB, SipC e SipD são relevantes para o processo adesivo de *S. Typhimurium* à célula hospedeira. Tal presença se faz tão relevante que, para que ocorra a associação íntima do T3SS com a célula hospedeira, é indispensável a presença das três translocases. O estudo promovido avaliou que cepas mutantes que não expressavam estas proteínas não eram capazes de realizar uma associação mais íntima com a célula eucariótica. Além disso, foi observado que a SipD, localizada na ponta do injectossoma, é detectável previamente ao contato com a célula, enquanto as SipB e SipC são apenas detectadas após a associação bactéria-célula hospedeira. Pode-se dizer que a SipD realiza o papel de sinalizar a associação entre as células e, então, o recrutamento das demais proteínas. Foi identificado, também, que na ausência apenas de SipD, a associação íntima de *S. Typhimurium* não foi possível, assim como na presença apenas de SipD, a associação íntima

se manteve inviável. Isso leva à conclusão de que a presença das três translocases se faz importante para o processo de associação íntima do injectossoma e início da etapa de invasão (Lara-Tejero e Galán, 2009).

1.4.2 Invasão

A invasão, entretanto, é um processo que depende de estruturas mais complexas, como o T3SS. O T3SS tem como função a inserção de diversas proteínas efetoras na célula alvo, no caso da *Salmonella*, as células epiteliais do intestino. Essas proteínas efetoras são responsáveis pela modulação do ambiente intracelular e da membrana eucariótica, o que faz com que seja viável a invasão pelo patógeno.

Em *Salmonella*, a invasão é majoritariamente mediada pelo T3SS-1, sendo os genes responsáveis pela montagem dessa estrutura codificados na Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 1 (SPI-1). Existem diversas SPIs, de maior ou menor complexidade, e uma abordagem mais completa a respeito delas será feita mais a frente neste documento. Por hora, é possível inferir que a SPI-1 é imprescindível para o processo infeccioso, visto que comporta os genes responsáveis pela invasão das células epiteliais, como por exemplo os genes codificadores para o T3SS-1, SipB, SipC e SipD. A SPI-1 é ubíqua em todos os sorovares de *Salmonella*, o que sugere uma imprescindível relevância para processos infecciosos. Assim como a SPI-1, as SPI-2, 3, 4 e 5, são igualmente ubíquas (Que *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020).

Dada a interação do T3SS-1 com a membrana da célula hospedeira, as proteínas efetoras SopE, SopE2 e SopB liberadas no citoplasma eucariótico irão promover a reorganização do citoesqueleto celular, através da ativação de Rho GTPases Cdc42, Rac1 e RhoG, o que aciona o Ruffling da membrana pela reorganização do citoesqueleto e, então, o engolfamento da bactéria. Embora a Cdc42 esteja envolvida no processo de remodelamento da actina e engolfamento da *Salmonella*, um estudo realizado por Patel e Galán, identificou; por meio da inibição de expressão por RNAi; que apenas a RhoG e Rac1 se mostraram essenciais para esse processo (Fattinger *et al.*, 2021; Haraga *et al.*, 2008; Patel e Galán, 2006) Após a macropinocitose, a célula bacteriana é mantida em um vacúolo, tecnicamente chamado de vacúolo contendo *Salmonella* (do inglês, Salmonella Containing Vacuole - SCV), onde está protegida de respostas celulares, o que a permite sobreviver e se multiplicar (Haraga *et al.*, 2008).

É importante avaliar que algumas proteínas efetoras podem levar a um estímulo pró inflamatório, como a ativação da Rho GTPase Cdc42 por SopE, SopE2 e SopB leva à ativação de MAP kinases, como Jnk, o que leva a indução da transcrição de fatores NF- κ B. Tais fatores

levam à resposta pró inflamatória, mediada por IL-8. Pode-se inferir que os efetores Sop levam a uma resposta pró inflamatória, o que seria danoso à infecção pela *Salmonella*. Para isso, a *Salmonella* expressa fatores como AvrA que inibem a ativação de Jnk e, por fim, a transcrição de NF- κ B (Chen *et al.*, 1996; Collier-Hyams *et al.*, 2002; Patel e Galán, 2006).

1.4.3 Disseminação e persistência

Com a invasão na célula hospedeira, há a formação do SCV, um vacúolo que permite a integridade e replicação do patógeno. Já dentro da célula hospedeira, a *Salmonella* irá produzir um outro injectossoma, o T3SS-2, codificado pela SPI-2 e associado ao transporte de efetores pelo vacúolo (Haraga *et al.*, 2008). No geral, os genes contidos na SPI-2 são responsáveis pelo processo de disseminação e persistência do patógeno no organismo. Um estudo promovido por Brown *et al.*, 2005 concluiu que a SPI-2 passa a ser expressa nas fases iniciais da infecção e que está envolvida não apenas na manutenção do SCV, como também no aumento da disseminação em sítios sistêmicos. Outra característica observada é a de que o T3SS-2 codificado pela SPI-2, permite a replicação em macrófagos e células fagocitárias do intestino. (Brown *et al.*, 2005)

A formação do SCV parte do engolfamento da *Salmonella* pela membrana do hospedeiro. Dada a formação, inicia-se o processo de maturação do SCV, chamado de endossoma precoce. Primeiramente ele é marcado com proteínas sinalizadoras, como a Rab5 que recruta EEA1 (Early Endosomal Antigen 1). Cerca de uma hora depois da formação do SCV, inicia-se a maturação do endossoma tardio, caracterizado pela troca das proteínas sinalizadoras por Rab7, Lgps (Lysosomal Glycoproteins), como LAMP-1 e LAMP-2 e v-ATPases (Desjardins, 1994; Steele-Mortimer *et al.*, 1999). Essas proteínas são responsáveis pela atribuição de características lisossomais ao SCV, como direcionamento do endossoma (Rab7 e LAMPs) para o lisossoma e acidificação do mesmo (v-ATPases) (Forgac, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2021; Marwaha *et al.*, 2017). Mas durante esses acontecimentos, a *Salmonella* passa a se replicar no SCV. Concomitante à replicação, há a formação dos SIFs (*Salmonella*-Induced Filaments), dada a ativação da SPI-2 via OmpR pela acidificação do vacúolo pela v-ATPase (Chakraborty *et al.*, 2015). Os SIFs são proeminências da membrana do SCV, que permitem a aquisição de nutrientes, como aminoácidos de diferentes fontes. Esses filamentos podem, inclusive, se prolongar para o lúmen do hospedeiro. Para que ocorra a formação dos SIFs, faz-se necessária a ação de três proteínas efectoras, SifA, SifB e PipB2. Além de promoverem a extensão do SIF, elas promovem a proteção e estabilidade do SCV (Bakowski *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2008; McGhie *et al.*, 2009).

Para além das proteínas efetoras citadas, o processo de maturação do SCV e persistência da infecção é mantido por proteínas como SopD2, SseJ e SseF, as quais inibem a degradação SCV por enzimas lisossomais, promovem a estabilidade do vacúolo e regulam a proximidade do SCV com o complexo de Golgi, permitindo assim a nutrição do vacúolo (Abrahams *et al.*, 2006; D'Costa *et al.*, 2015; Kolodziejek *et al.*, 2019). A proteína SopA também participa do processo por desempenhar uma função de escape do sistema imune; ao realizar um papel regulatório nas vias de ubiquitinação do hospedeiro. A SspH2, entretanto, apresenta papel pró-inflamatório pela super ativação de receptores NOD1 e NOD2 (Delyea *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2006). Outras proteínas, como SseL, regulam o killing e autofagia de macrófagos, enquanto SteD inibe a ativação de células T pela depleção do MHCII (Azimi *et al.*, 2020; Bayer-Santos *et al.*, 2016; Mesquita *et al.*, 2012)

1.4.4 *Salmonella* Pathogenicity Islands (SPIs)

Como abordado anteriormente, as ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPIs) são regiões do genoma que contém diversos genes de virulência. Esses genes de virulência, entretanto, não são, em parte, próprios do gênero *Salmonella*. As SPIs, em si, são estruturas genômicas adquiridas por transferência horizontal de genes, ou seja, são contidos genes compartilhados por outras espécies e gêneros bacterianos (Hensel, 2004). A aquisição dessas ilhas permite que os organismos que as adquiriram possam desempenhar novas funções ecológicas, infectar novos hospedeiros, apresentar saltos evolutivos e até sofrerem especiação (Groisman e Ochman, 1996).

Ao longo da evolução dos estudos do gênero *Salmonella*, foram identificadas diversas sequências de genes de virulência agrupados em partes dos genomas, regiões essas chamadas de Pathogenicity Islands (PIs). Por se tratar de genes de virulência que conferem patogenicidade à *Salmonella*, essas ilhas específicas foram dotadas dos nomes Ilhas de Patogenicidade de *Samonella* (Hensel, 2004; Jacobsen *et al.*, 2011). Em geral, SPIs contribuem para aspectos específicos na patogenia da *Salmonella*, ou seja, determinadas SPIs têm os seus genes ativados em diferentes etapas do processo infeccioso. Entretanto, vale salientar que embora os genes sejam expressos em dada SPI, eles podem estar mais relacionados a uma outra SPI, visto o seu respectivo papel no processo patogênico. Um exemplo disso é o gene *sopB* ser expresso na SPI-5, mas a sua proteína efetora (SopB) ser utilizada pelo T3SS-1 constituído pela SPI-1, no momento de invasão celular (Hur *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020; Wood *et al.*, 1998). Além disso, há também a correção da expressão dos genes entre as SPIs. O gene *hilD*, que expressa a proteína HilD, é responsável por regular a expressão de HilA na SPI-1 (um dos

reguladores da expressão de SPI-1, junto com HilD e InvF) e do operon *ssrAB* presente na SPI-2 (Azimi *et al.*, 2020; Hensel, 2004; Srikanth *et al.*, 2011)

Como mencionado, algumas SPIs apresentam uma determinada função na patogenicidade, e essa característica de função estabelecida implica na estabilidade que essas ilhas de patogenicidade possuem no gênero bacteriano. Dado que para que a infecção, replicação e disseminação da *Salmonella* faz-se necessária a presença de um determinado set gênico, esses genes precisam ser conservados ao longo das linhagens. Tal caracterização atribui o nome de “core genes” a esses genes, em específicos os presentes na SPI-1 (Lerminiaux *et al.*, 2020). Algumas SPIs são canonicamente encontradas nos genomas de todos os sorovares de *Salmonella*, mas não necessariamente entre todas as estirpes. São elas: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 e SPI-5. A SPI-1 é caracterizada como a ilha de patogenicidade responsável pela maioria dos genes de virulência expressos no processo de adesão e invasão da célula hospedeira. A SPI-2, por sua vez, é descrita como importante fator relacionado a sobrevivência da *Salmonella* no SCV e evasão das defesas da célula hospedeira. A SPI-3 é principalmente atrelada à produção de MgtCB, um sistema de captura de Mg^{2+} , que permite a nutrição no fagolisossomo. A SPI-4 não apresenta um perfil tão bem definido quanto as demais. Por fim, a SPI-5 apresenta um set de genes amplamente utilizado pelos T3SS codificados pela SPI-1 e SPI-2 (Hensel, 2004).

As Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella*, portanto, tangenciam a temática de identificação ao momento em que abordam a virulência do microrganismo. Ainda, numa perspectiva mais ampla, SPIs não apenas fornecem informações sobre o processo infectivo da *Salmonella*, mas também contribuem para a compreensão da história evolutiva desse microrganismo, que relaciona o seu nicho ecológico, transição e patogenicidade em diferentes hospedeiros, interações microbianas e diversidade de sorovares.

2 Justificativa e Contextualização

Historicamente, surtos de doença diarreica por *Salmonella* têm sido fortemente associados a ovos e carne de frango, e em menor escala a carne bovina e leite (Carrasco *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013; Antunes *et al.*, 2016). No entanto, nas últimas décadas, um crescente número de casos foi reportado como associado a vegetais. Por exemplo, surtos causados pelo consumo de suco de laranja, rúcula, melões, tomates e comidas à base de gergelim, entre outras frutas, verduras e alimentos de origem vegetal, foram relatados nos Estados Unidos, Austrália e em países da Europa (Nillian *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2013; CDC, 2019b). No Brasil, ainda que em muitos casos a fonte da infecção não seja identificada, há uma série de estudos reportando a similaridade entre linhagens isoladas de alimentos e portadores ou pacientes humanos (Cunha-Neto *et al.*, 2020; Seribelli *et al.*, 2020; Vilela *et al.*, 2022). Portanto, no contexto da segurança dos alimentos, *Salmonella* é um microrganismo que desperta atenção globalmente. Neste sentido, o conhecimento sobre amostras que circulam em diferentes regiões geográficas pode ser útil para viabilizar a identificação de origens de surtos, reduzindo o número de pessoas afetadas e viabilizando a implementação de medidas de contenção que evitem novos casos.

O presente projeto é parte de uma iniciativa internacional idealizada pelo JIFSAN (Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition), órgão que congrega a Universidade de Maryland e o Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos, que busca enriquecer um banco de genomas público com genomas de *Salmonella* isoladas de águas próximas a regiões produtoras de alimentos, a fim de fornecer dados para estudos epidemiológicos e elucidação de surtos. Quatro países fazem parte do projeto (Estados Unidos, México, Chile e Brasil), e no Brasil há duas regiões geográficas envolvidas (Rio de Janeiro e Paraíba). No polo Rio de Janeiro, nosso grupo de pesquisa coordena as ações, com apoio da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO/RJ). De maneira geral, em nossa perspectiva, o projeto conta com duas etapas: (i) montagem de uma coleção de amostras, seleção de colônias e envio para sequenciamento; e (ii) identificação e caracterização molecular dos perfis de virulência da coleção de amostras isoladas e sequenciadas. As amostras são coletadas em duas grandes regiões com atividades agropecuárias no estado do Rio de Janeiro, São José do Vale do Rio Preto (SJVRP) e Vassouras. A utilização de amostras dessas regiões agrárias viabiliza, entre outras pesquisas, estudos futuros locais de comparação com amostras clínicas, considerando que tais regiões fornecem alimentos frescos para o seu entorno e para a região metropolitana do Rio de Janeiro.

Toda a amostragem faz-se com base em águas impactadas pela produção agropecuária não apenas de animais, mas também de vegetais, permitindo uma maior cobertura de alimentos possivelmente contaminados por essa bactéria. Para isso, um grande esforço coletivo tem sido realizado ao longo dos últimos três anos com a finalidade de compor uma coleção robusta e representativa. Eu, aluno de graduação que apresento este trabalho de conclusão de curso (TCC), colaborei com todas as etapas do processo, mesmo durante o período de restrições impostas pela pandemia da COVID-19. A descrição da composição da coleção também se justifica pela relevância da compreensão dela para a discussão dos dados obtidos com as análises genômicas que serão realizadas.

Assim, o presente TCC é dedicado as análises genômicas dos primeiros 192 isolados sequenciados, representativos de todos os pontos de coleta incluídos no estudo.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Identificar os sorovares e marcadores de virulência isolados de *Salmonella* obtidos de águas superficiais de regiões agrícolas do estado do Rio de Janeiro. Utilizar os dados para descrever a diversidade e características dos sorovares que ocorrem no estado.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar *Salmonella* sp. de águas superficiais impactadas por atividades agrícolas e pecuárias no estado do Rio de Janeiro;
- Selecionar, para o sequenciamento, amostras que sejam representativas da diversidade de isolados obtidos;
- Montar os genomas sequenciados, deixando-os preparados para as análises genômicas subsequentes;
- Determinar, *in silico*, os sorovares das amostras sequenciadas;
- Buscar, *in silico*, genes de virulência nas amostras sequenciadas;

4 Metodologia

4.1 Coleta de amostras de água: pontos de amostragem e técnica utilizada

A coleta das amostras de águas das regiões de São José do Vale do Rio Preto e Vassouras foi estabelecida em 4 diferentes rotas, sendo duas rotas para a região de Vassouras e duas rotas para São José do Vale do Rio Preto (**Figura 3**)

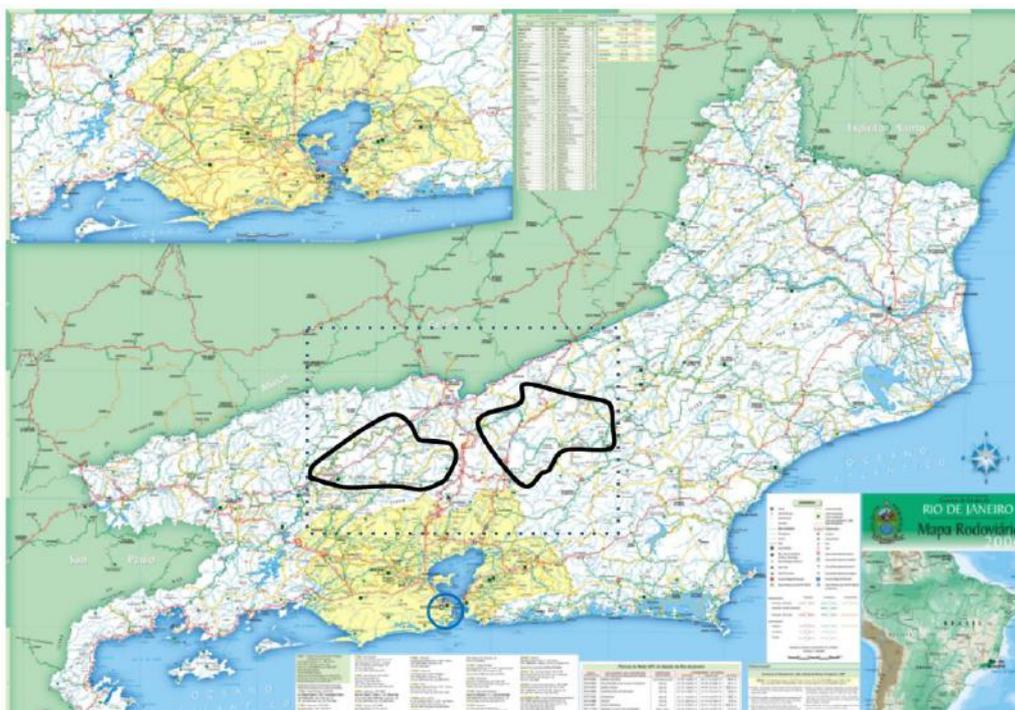


Figura 3 – Rotas dispostas no estado do Rio de Janeiro. Com o perímetro delimitado das duas regiões, é possível dimensionar o impacto e abrangência do estudo quando comparado ao tamanho do estado do Rio de Janeiro.

Hoje somam-se 121 pontos de coleta em ribeirões, córregos e rios pouco caudalosos que passam dentro ou próximos a propriedades com atividade agropecuária, estão distribuídos estrategicamente ao longo das quatro rotas (31 pontos na rota I de Vassouras; 30 na rota II de Vassouras ; 30 em SJVRP I; e 30 na rota II de SJVRP)(**Figura 3** e

Figura 4). Foram realizadas viagens com pernoite para coletas de uma rota por vez, intercaladas por quatro a seis semanas, de acordo com o fluxo de processamento das amostras no laboratório e disponibilidade de condições para que a viagem subsequente aconteça. Amostras analisadas no presente projeto foram coletadas entre novembro de 2019 e janeiro de 2021, e enviadas para sequenciamento em setembro de 2021. Os dados do sequenciamento foram disponibilizados para análise em julho de 2022.

Para a filtragem e coleta de material microbiano, faz-se o uso de aparato que utiliza filtragem da água (**Figura 6**). Nele, um Swab de Moore (cartucho de gaze enrolada – Figura 6A), que serve como um filtro de captação de material biológico. O Swab de Moore é inserido em um aparato de PVC (Figura 6B) que é imerso no corpo d'água de interesse. Esse conjunto é ligado à bomba hidráulica (Figura 6C) que irá filtrar 10 litros de água em cerca de 10 minutos (Sbodio *et al.*, 2013). Após a filtragem, o Swab de Moore embutido de material microbiológico e orgânico, é transposto em um frasco contendo 100 mL de água peptonada tamponada (Buffered Peptone Water – BPW; Figura 6D), onde o meio de cultura permite a recuperação das células que antes estavam dispersas no ambiente. O frasco com o material de interesse é transportado para o laboratório sob refrigeração.

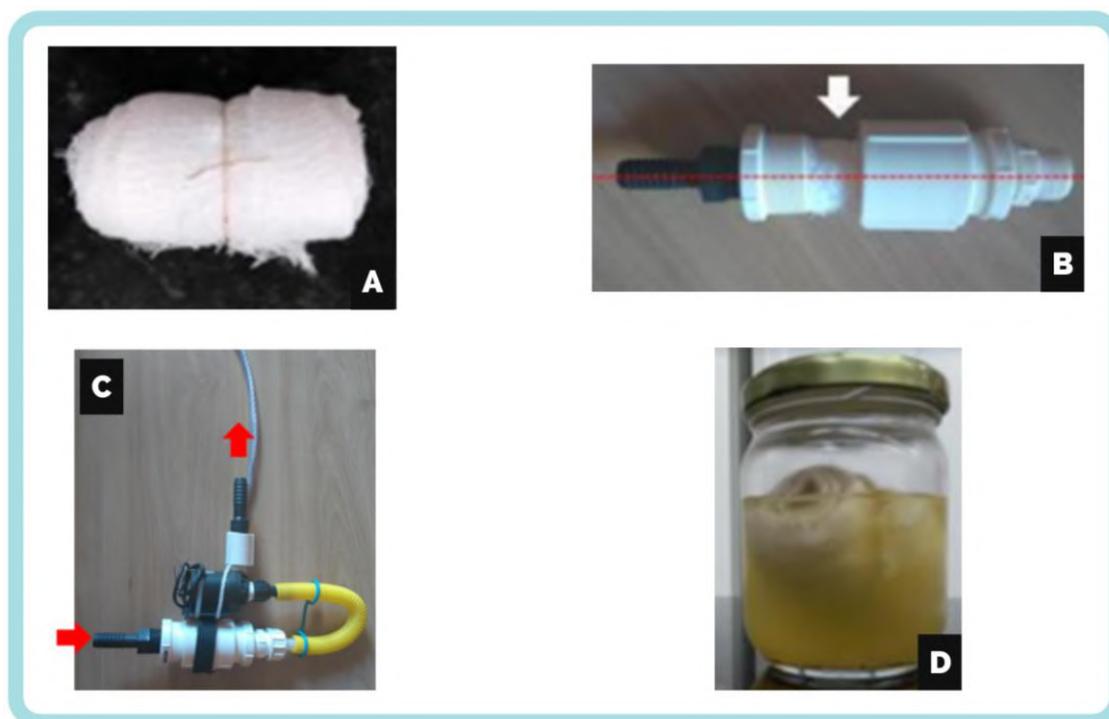


Figura 6 – Equipamentos utilizados na coleta de espécimes de água para pesquisa de *Salmonella* sp. .: (A) Swab de Moore, estrutura que comporta o material biológico presente nos corpos d'água que se objetiva amostras; (B) aparato de PVC, suporte para o Swab de Moore e estrutura imersiva em corpos d'água (a seta branca indica o ponto de abertura para a inserção do Swab no sistema); (C) sistema completo, aparato de PVC conectado à bomba e ligado à bateria (setas vermelhas indicam o fluxo de água); (D) Swab de Moore em água peptonada, pote contendo material biológico de interesse que será transportado ao laboratório sob refrigeração.

4.2 Enriquecimento e isolamento de *Salmonella*

Com a chegada do material ao laboratório, inicia-se o processamento com a incubação a 35°C - 37°C dos frascos por um período de 18 – 24 horas. Sendo assim, os frascos contendo água peptonada servirão como meio de recuperação dos filtrados de água. Após este período o conteúdo da coleta é semeado em tubos contendo dois diferentes meios de enriquecimento para

Salmonella, sendo 1mL no Caldo Tetracionato (TT) e 0,1mL no Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), e incubados a 42 °C respectivamente por 24-48 horas. Em seguida, cada um dos tubos contendo meio de enriquecimento (TT e RV) são repicados em placas de ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e ágar Xilose-Lisina Tergitol (XLT4), meios seletivos e indicadores utilizados para o isolamento do microrganismo (BRASIL, 2011). Estes meios são incubados à 37 °C por 18 – 24 horas. Colônias características de *Salmonella* (lactose negativas produtoras de H₂S) e algumas atípicas (lactose positivas ou não produtoras de H₂S) são selecionadas e repicadas para tubos contendo meio de estoque semissólido, e incubadas à 37°C por 18 – 24 horas (estoque provisório). Esta cultura estoque é utilizada nas análises posteriores de identificação e preparação de estocagem definitiva (congelamento -80°C) para os isolados identificados como *Salmonella*.

A nomenclatura estabelecida para as colônias isoladas é baseada no espécime de água em que foram isoladas e a contagem das colônias selecionadas para estocagem nas placas de meio diferencial-seletivo. As amostras são primeiramente identificadas com a letra “W” em maiúsculo, que denota “Water”, seguida da numeração da água coletada, estabelecida por cronologia. Depois, as colônias selecionadas em uma placa ganham uma numeração em ordem crescente de acordo com a seleção. Por final, um dígito é adicionado para a identificação da triagem completa, sendo o dígito “1” para as colônias isoladas na primeira análise do espécime de água e o dígito “2” para a segunda análise do espécime de água (uma segunda análise por vezes à feita a partir de material estocado, caso a primeira análise tenha gerado resultados insuficientes). Nenhum espécime foi analisado por mais de duas vezes. Assim, como exemplo ilustrativo, a décima segunda colônia do terceiro espécime de água analisado no projeto, analisado pela primeira vez, será identificada como W003-12-1.

4.3 Identificação bacteriana por MALDI-TOF

As bactérias estocadas foram identificadas por espectrometria de massas, através da técnica Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time off Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Para tanto, as amostras bacterianas são, primeiramente, reativadas em ágar McConkey em semeadura confluyente, e incubadas por cerca de 18 a 24 horas à 35 °C – 37 °C. Dado o crescimento da massa bacteriana na placa de McConkey, uma fração da colônia é coletada com a ponta de um palito de madeira e depositada em um dos targets da placa metálica fornecida pelo fabricante do equipamento Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha). Feita a deposição do crescimento na target, é aplicado 1 µL de ácido fórmico a 70% para a ruptura das células bacterianas e exposição das proteínas ribossomais. Logo após é

aplicado 1 µL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico diluída na concentração de 10 mg/mL em solvente orgânico composto por acetonitrila a 50% e TFA a 2,5%. Após a secagem da matriz, a placa contendo as amostras é inserida no equipamento para a obtenção dos espectros através do software FlexControl versão 3.4, utilizando os parâmetros pré-estabelecidos no modo MBT (frequência de laser 60Hz em modo linear positivo, voltagens da fonte ionizadora de 20 e 18 kV, intervalo de massa molecular de 2.000 a 20.000 Da).

Os resultados obtidos na leitura realizada pelo equipamento de espectrometria de massas MALDI-TOF são avaliados e julgados a partir do score que apresentarem. O espectrômetro de massas MALDI-TOF só identifica até o gênero *Salmonella*, não tendo uma acurácia boa para a predição de espécies (*S. enterica* e *S. bongori*), subespécies (I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II, *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae*; e VI, *S. enterica* subsp. *indica*) e sorovares (Typhi, Typhimurium, Enteritidis, Gallinarum, Infantis, + 2.500). As amostras que são estocadas e selecionadas para envio para sequenciamento passam pela triagem do espectrômetro de massas MALDI-TOF e devem apresentar score igual ou maior do que 2.0.

4.4 Diferenciação de linhagens por RAPD

A inclusão da técnica de Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) no projeto foi visada como uma oportunidade mais prática de diferenciação de possíveis clones que seriam enviadas para o sequenciamento pelo Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition (JIFSAN) (Williams *et al.*, 1990). É interessante para um estudo mais abrangente e diverso, que ele contenha amostras que não clonais. Portanto com a amplificação de regiões aleatórias do genoma das amostras, é possível comparar e inferir serem clonais ou não. Dessa forma, é economizado tempo com provas bioquímicas para diferenciação das amostras, o que permite inferir com maior segurança que as amostras de um mesmo espécime de água que são enviadas para o sequenciamento não são clonais.

Para a realização do RAPD, faz-se necessário o crescimento de colônias bacterianas frescas e bem isoladas. Dessa forma, deve-se selecionar uma colônia e suspendê-la em 200 µL de água estéril, levar à fervura por 10 minutos e em seguida colocar imediatamente em banho de gelo por 5 minutos para a lise microbiana.

A partir da lise das células bacterianas, a reação de amplificação é preparada a partir de 6 µL de Master Mix, 20 pmol de cada primer (1247 e 1283; conforme indicado no **Quadro 1**), 50 mM de MgCl₂ e 2,5 µL do DNA template.. As condições de ciclagem foram estabelecidas em: uma fase de desnaturação de 15 minutos a 95°C; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 36°C por

1 minutos e 72°C por 30 segundos, referentes à desnaturação da dupla fita de DNA da amostra, anelamento dos primers e síntese das fitas, respectivamente. Ao final, a reação é deixada por 10 minutos a 72°C para uma extensão final.

Quadro 1 – Primers referentes à amplificação randômica de sequências genômicas para diferenciação de linhagens de *Salmonella* por (Madico *et al.*, 1995)

Primer	Sequência
1247	AAG AGC CC GT
1283	GCG ATC CCC A

4.5 Análises *in silico*

Para a identificação das espécies, subespécies, seus respectivos sorovares, genes de virulência e SPIs, foi necessária a montagem do genoma completo já sequenciado para a identificação de cada ponto salientado.

Primeiramente foi necessária a validação da qualidade das sequências de leitura (*reads*) obtidas pelo sequenciamento. A técnica utilizada para o sequenciamento foi a de Illumina. Trata-se de uma tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS), que permite uma cobertura do genoma completo (Hu *et al.*, 2021). Verificada a qualidade das *reads*, foi feita a trimagem (exclusão de partes com baixa qualidade) dos dados (Del Fabbro *et al.*, 2013). Após a trimagem foi verificada a qualidade das *reads* após a trimagem e por fim realizada a montagem do genoma completo. Com o genoma montado, foram iniciadas as análises *in silico*. Um passo a passo deste processo está descrito a seguir

Todas as análises de bioinformática foram realizadas no servidor do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG), através de softwares gratuitos, os quais estavam depositados pelos desenvolvedores no GitHub (<https://github.com/>) ou em sites de acesso específicos. Nos tópicos a seguir são apresentados em detalhes todas as análises realizadas.

4.5.1 Curadoria de Qualidade

Primeiramente, foi realizada a análise da qualidade das *reads* brutas de cada genoma geradas pelo sequenciamento. Para essa análise, foi utilizado o programa FastQC, versão 0.11.9 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>), o qual sintetiza informações que dizem respeito dos dados gerados tal como a quantidade total de dados gerados, o tamanho das sequências obtidas, se há e onde se encontram possíveis problemas de qualidade nas sequências, porcentagem de GC, duplicidade de reads etc. Posteriormente, as informações geradas para todas as amostras

foram visualizadas em conjunto no programa MultiQC, versão 1.13 (acesso em: <https://multiqc.info/>).

Feita a análise da qualidade das suas sequências, é possível o desempenho do aperfeiçoamento das sequências, ou seja, retirar as regiões de baixa qualidade dos dados brutos gerados. Para isso, fez-se uso do programa Trimmomatic, versão 0.39 (acesso em: <https://github.com/usadellab/Trimmomatic>).

Assim, através do Trimmomatic, foram removidos os adaptadores das sequências das amostras, baseados nos moldes dos seguintes adaptadores utilizados na técnica de sequenciamento por Illumina: NexteraPE-PE.fa; TruSeq2-PE.fa; TruSeq2-SE.fa; TruSeq3-PE-2.fa; TruSeq3-PE.fa; TruSeq3-SE.fa. Além da remoção dos possíveis adaptadores acima, foram realizados três ajustes a mais nas sequências: foram cortadas 3 bases do início da leitura, pelo comando “LEADING:3”; foram cortadas 3 bases do final da leitura, pelo comando “TRAILING:3”; e foram removidas as sequências que possuíam número de bases inferior a 20, pelo comando “MINLEN:20”.

Após a trimagem, os dados foram revisados para que fosse avaliado se ainda apresentam problemas na qualidade pelos mesmos programas citados acima e depois utilizados na montagem dos genomas como descrito a seguir.

4.5.2 Montagem dos genomas

A montagem do genoma em *contigs* foi realizada através do software de bioinformática Unicycler, versão 0.5.0 (acesso em: <https://github.com/rrwick/Unicycler>). Com os genomas montados, foi possível, por fim, a tipificação das amostras e pesquisa dos genes de virulência, como especificado nos tópicos a seguir.

4.6 Identificação de sorovares *in silico*

A identificação taxonômica de *Salmonella* foi feita através do uso do software SeqSero 2, versão 1.2.1 (acesso em: <https://github.com/denglab/SeqSero2>) que permite a identificação a nível de espécie, subespécie e sorovar. A identificação dos sorovares pelos softwares é feita pela análise do genoma completo de cada amostra em documento FASTA.

4.7 Identificação de genes de virulência

A pesquisa de genes de virulência foi realizada através da plataforma Virulence Factors Database (VFDB), uma base de dados que contém sequências de diversos genes de virulência de diferentes microrganismos. Esta ampla referência é interessante porque pode

captar não somente genes classicamente descritos em *Salmonella*, mas também outros adquiridos por transferência horizontal, os quais são encontrados em algumas SPIs. Assim, genes comumente encontrados em outros microrganismos, como *Escherichia coli* e *Yersinia sp.* etc, podem ser encontrados em *Salmonella*.

Portanto, para tal análise fora utilizado o software Abricate, versão 1.0.0 (acesso em: <https://github.com/tseemann/abricate>), o qual utiliza o algoritmo de alinhamento entre sequências Blast para a comparação entre as os genes providos pelo banco de dados específico que se deseja analisar e o genoma fornecido. Neste caso, o banco de dados utilizado foi o VFDB. No dado momento que é feita a comparação, caso a sequência seja identificada com um certo nível de identidade (possíveis mutações levadas em consideração) e cobertura, tal genoma é identificado como portador, ou não, do gene de virulência. O diferencial do Abricate é a possibilidade de pesquisa por diversos genes de virulência em diversos genomas fornecidos concomitantemente, o que minimiza o tempo de análise e erros cometidos pelo operador.

4.8 Análise filogenética

A análise filogenética permite, além da avaliação de cepas clonais, a identificação de sorovares filogeneticamente próximos dentro do gênero *Salmonella*, como por exemplo a diferenciação de sorovares ambientais, como os pertencentes à espécie *Salmonella bongori* e aos sorovares das demais subespécies de *Salmonella enterica*, que não a subespécie *enterica*. Essa análise permite a avaliação da ocorrência e recorrência de diferentes sorovares, ambientais ou não nos corpos d'água em que as cepas isoladas foram adquiridas, o que fornece material para possíveis estudos epidemiológicos e vigilância de ocorrência, recorrência e disseminação dos sorovares.

Para as análises filogenéticas, foram necessárias as sequências dos genomas montados processados como descrito acima. Os genomas foram assim, alinhados, para a obtenção das sequências preservadas entre os mesmos (core genoma), e a análise da presença de Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs) e Inserções/Deleções (Indels) nesta região, em comparação com um genoma de referência (*Salmonella enterica* subsp *enterica* Typhimurium LT2 (Número de acesso AE006468.2); pelo programa Snippy, versão 4.6.0 (acesso em: <https://github.com/tseemann/snippy>). O arquivo de alinhamento do core genoma entre as amostras foi então utilizado para inferir uma árvore filogenética de máxima verossimilhança através do programa RAxML versão 8.2.12, no qual foi utilizado o modelo evolutivo GTRCAT em 1000 bootstraps.

Por fim, a árvore filogenética foi inserida na ferramenta online de visualização, anotação e gerenciamento de árvores filogenéticas, iTol (acesso em: <https://itol.embl.de/>). A partir do iTol, foi gerada imagem da árvore filogenética das 184 amostras analisadas, em conjunto com os metadados dos genes de virulência. Os genes de virulência foram agrupados em 10 conjuntos de genes: (i) adesão; (ii) invasão; (iii) sistemas de secreção; (iv) proteínas efectoras; (v) nutrição/metabolismo; (vi) sobrevivência ao estresse; (vii) fatores antimicrobianos; (viii) chaperonas/estabilização; (ix) exotoxinas; e (x) modulação do sistema imune – o que gerou uma árvore filogenética associada a um heatmap de prevalência dos genes de virulência de acordo com os sorovares. Dessa forma, será possível analisar a proximidade filogenéticas dos isolados relacionada com a presença dos genes de virulência.

Além da análise por SNPs, foi realizado a análise de MLST das cepas bacterianas, onde os genomas da coleção foram disponibilizados na plataforma online Enterobase (acesso em <https://enterobase.warwick.ac.uk/>). Ao buscar os genomas nessa plataforma, foi possível a montagem de uma árvore filogenética baseada nos STs de cada sorovar, utilizando o programa GrapeTree (não é possível inferir a versão do programa; acesso em <https://github.com/achtman-lab/GrapeTree>).

A **Figura 7** apresenta graficamente a sequência de etapas que será adotada na análise dos genomas para a identificação dos sorovares e de genes de virulência e SPIs nos mesmos.

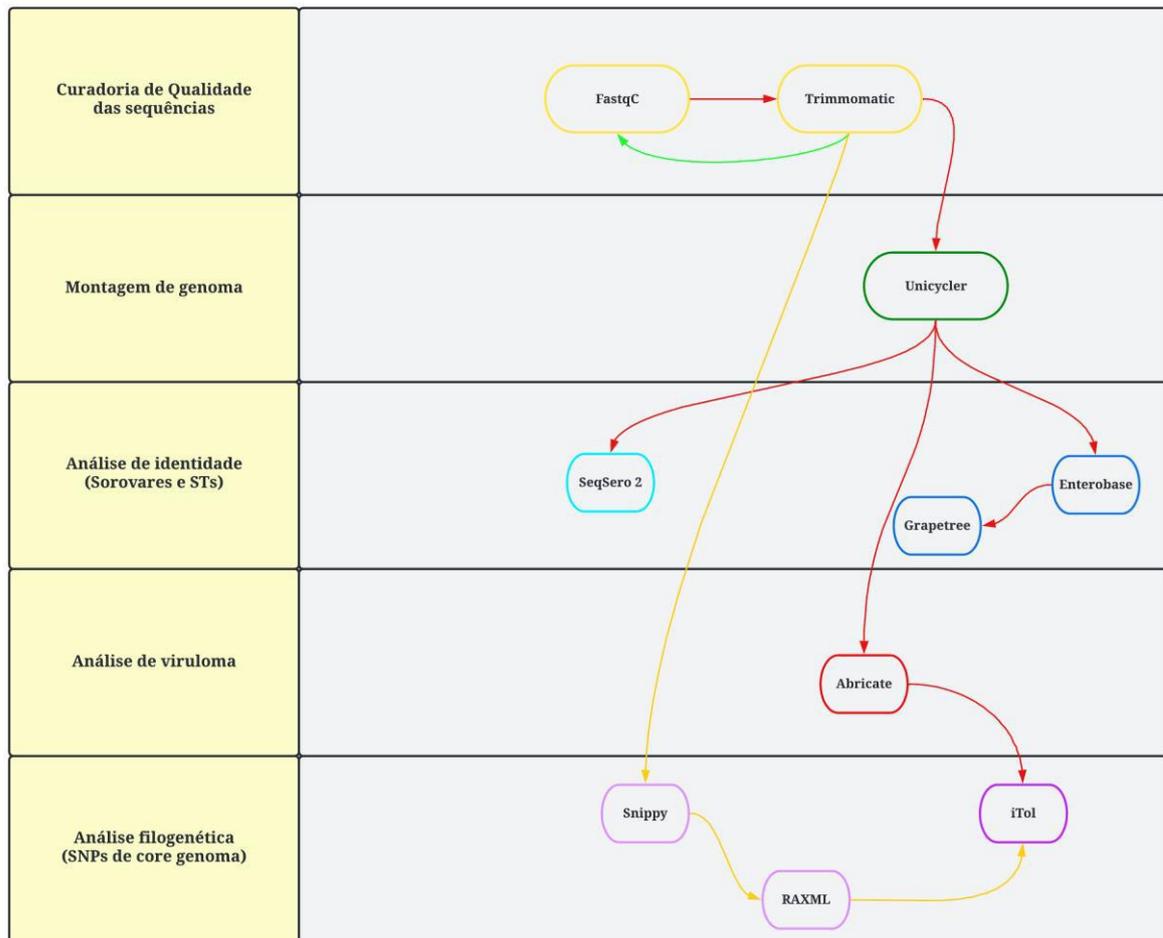


Figura 7 – Fluxograma da metodologia de bioinformática adotada neste estudo. Metodologia de bioinformática dividida em: (I) curadoria de qualidade das sequências obtidas pelo sequenciamento; (II) montagem do genoma; (III) tipificação pelo softwar SeqSero 2, para identificação dos sorovares de *Salmonella spp.*, e análise dos STs dos isolados disponibilizados na plataforma Enterobase; (IV) análise do viruloma pelo software Abricate que utiliza um banco de dados de genes de virulência de acesso público para pesquisa pelos genes, onde o compilado dos genes foi utilizado para a montagem de um Heatmap de prevalência dos genes por sorovares na plataforma online iTol; e (V) análise filogenética de SNPs de core genoma pelo software Snippy e montagem do arquivo contendo a árvore filogenética pelo RAXML, posteriormente, graficamente montada, em conjunto com o Heatmap, no iTol. As setas com cores vermelhas representam o fluxo de análises que passam pela montagem do genoma. As setas em amarelo dispensam a montagem do genoma. A seta verde representa possibilidade de repetição da validação da qualidade da trimagem.

5 Resultados

5.1 Identidade dos isolados

Foram identificados 33 sorovares entre as 192 amostras de *Salmonella* sp. enviadas para sequenciamento. O sorovares mais isolados foram Typhimurium (31), Panama (26) e Newport (26), correspondendo em conjunto a 43% das amostras. Outros sorovares também isolados com certa frequência foram Sandiego (12) e IV 43:z4z24:- (12), Infantis (10) e Carrau (10). Outros 26 sorovares foram identificados em uma a oito amostras. Tais dados estão compilados na **Figura 8**.

Entre os 33 sorovares encontrados, 26 (169 isolados; 88,02%) são pertencentes à *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, enquanto os outros 7 sorovares (23 isolados; 11,97%) são pertencentes a algumas das demais subespécies de *Salmonella enterica*. As subespécies representantes dos isolados são: *S. enterica* subsp. *salamae* (II 42:r:-; o dígito II corresponde à *S. enterica* subsp; *salamae*); *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb 50:r:z e IIIb 38:(k):z35); e *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV 43:z4z24:-, IV 38:gz51:-, IV 21:z4z23:- e IV 16:z4z32:-).

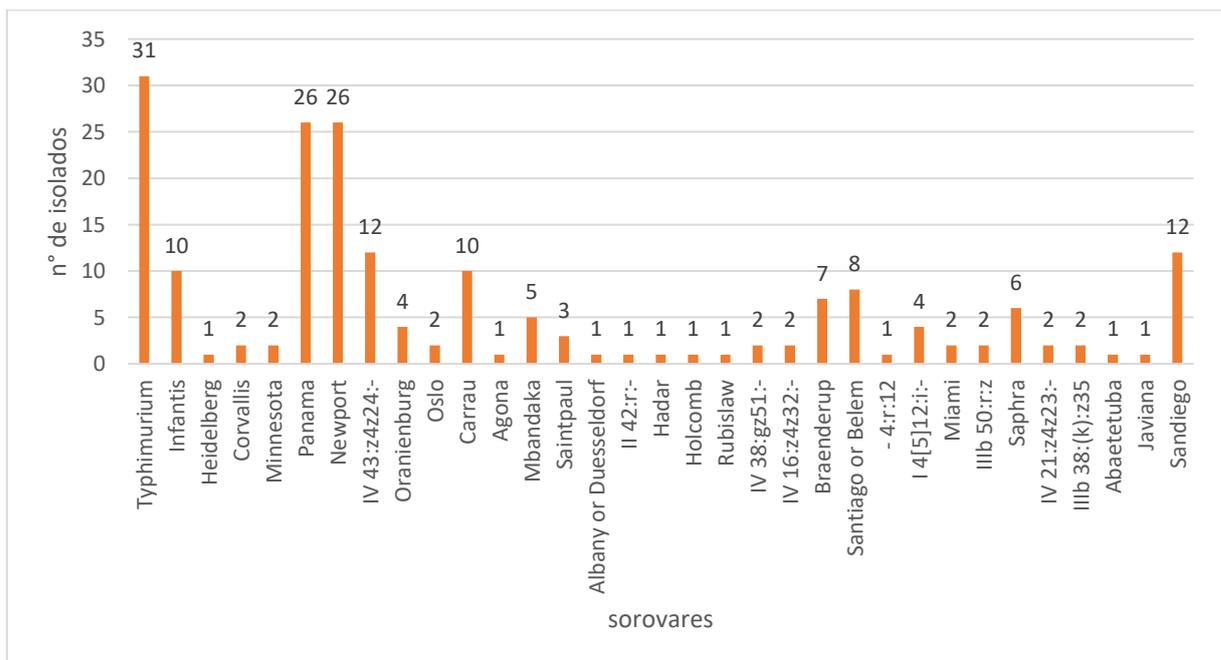


Figura 8 – Diversidade de sorovares isolados em águas superficiais de regiões agrícolas do Rio de Janeiro, no período de 2019 a 2021. Representação dos sorovares encontrados a partir do sequenciamento do genoma completo (WGS) de 192 amostras de *Salmonella* sp. isoladas da partir de águas superficiais de regiões agrícolas do Rio de Janeiro

5.2 Genes de virulência

Embora 192 isolados tenham sido enviados para sequenciamento, foi possível realizar esta análise em apenas 184 deles, devido ao atraso na divulgação dos dados do sequenciamento e tempo de análise. Portanto, as análises aqui contempladas, e outras que seguirão além da predição dos sorovares, abrangem 184 isolados, com a exclusão apenas dos sorovares Heidelberg e Holcomb, cuja amostras representante estava entre os não analisados. Assim, na pesquisa de genes de virulência, os isolados foram agrupados conforme os respectivos sorovares (32), e comparados com nove conjuntos dos genes de virulência. Os conjuntos de genes são: adesão (28); invasão (9); sistemas de secreção (28); proteínas efetoras (45); metabolismo e nutrição (20); sobrevivência ao estresse (4); agentes antimicrobianos (1); regulação (2); exotoxinas (2); modulação do sistema imune (2); e flagelina G (1) (Anexo 1).

Numa análise preliminar é possível perceber que os genes de virulência, quando relacionados aos diferentes sorovares, apresentam diferenças quantitativas e qualitativas. O sorovar Infantis, por exemplo, apresenta em seus 10 isolados 104 genes de virulência bem conservados em número; o sorovar Carrau apresenta cerca de 99 genes de virulência, com variações de 1 gene a mais ou a menos entre os 10 isolados que constituem o grupo; o sorovar Newport, em seus 26 isolados, apresenta em média 102 genes por isolado, com variação de mais ou menos 1 gene; o sorovar Panama, em seus 26 isolados, apresenta em média 97 genes, com variação de 1 gene a mais em 5 isolados. Além disso, pouca variação antigênica foi observada entre as amostras de um mesmo sorovar. Por exemplo, os 31 isolados do sorovar Typhimurium apresentam 116 genes de virulência em média, número esse que se estende por todas as cepas, com variação de presença e ausência de alguns genes, como *sodCL*, *sseL* e *shdA* em apenas 3 isolados do sorovar. Essa quantidade de genes, de 116, se preserva nos 4 isolados do sorovar monofásico de Typhimurium (I 4[5]12:i:-).

Alguns sorovares não pertencentes à *Salmonella enterica* subsp. *enterica* apresentaram um notável mais restrito viruloma. O único isolado de *S. salamae* apresenta 91 genes de virulência, onde a reduzida presença de genes de virulência está bem associada a ausência da maioria dos genes de metabolismo (apresenta apenas *fepC*, *fepG* e, como todas as cepas desse estudo, *mgtB* e *mgtC*) e completa ausência de qualquer gene referente à modulação do sistema imune. Os 4 sorovares de *S. houtenae* apresentam cerca de 83 genes de virulência, com uma impactante ausência de genes associados à adesão, proteínas efetoras, metabolismo, exotoxinas e modulação do sistema imune. Os isolados pertencentes aos 2 sorovares de *S. diarizonae*, entretanto, não apresentaram qualquer redução significativa quando comparados aos sorovares

de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, com 102 e 103 genes (IIIb 38:(k):z35 e IIIb 50:r:z, respectivamente).

Um único isolado de *S. enterica* subsp. *enterica* 4:r:12 (fórmula antigênica associada ao sorovar Heidelberg) apresentou tal perfil, com 88 genes de virulência, onde foi notada a ausência operon *inv*, o qual contém 9 genes codantes de proteínas constituintes do T3SS de *Salmonella* (*invA,B,C,E,F,G,H,I,J*), fator importante para a infecção. Outra característica desse isolado é a ausência dos 9 genes que influenciam a invasão na da célula animal (*sipA, sipB, sipC, sipD, spaO, spaP, spaQ, spaR* e *spaS*).

Ao analisar a distribuição dos genes isoladamente dos sorovares, dos 142 genes encontrados, 45 estiveram presentes em todos os 184 isolados. Entre estes 45 genes, 12 estão associados ao processo de adesão da bactéria, 19 associados à produção do sistema de secreção, 11 são genes de proteínas efetoras, 2 associados a nutrição/metabolismo e 1 associado a sobrevivência ao estresse celular. Entre os genes conservados, se destacam o operon *csgABCDEFG*, operon *fimCDFHI* e o operon *ssaCDEGHIJKLMNOPQRSTU*. Dos 142 genes, 30 estiveram presentes em 184 isolados, neles inclusos todos os 9 genes associados à adesão; 9 genes associados ao sistema de secreção, o operon *invABCEFGHIJ*; 8 genes associados a proteínas efetoras, incluindo o operon *prgHIJK*; e 2 chaperonas. Nenhum dos isolados apresentaram os 142 genes encontrados nos genomas. Outros genes de virulência podem ser associados a *Salmonella spp.*

5.3 Análise por Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Os genomas disponibilizados na plataforma de acesso público, Enterobase, foram utilizados para gerar uma árvore (grapetree) com os dados de similaridade entre 7 genes específicos dos isolados. Os genes analisados foram: *aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA* e *thrA*. Ao todo foram identificados entre os isolados 35 STs (representado na **Figura 9**), dos quais os ST19, ST48, ST2370, ST20 e ST226 agruparam 54% da coleção, com 34, 25, 21, 10 e 10 isolados, respectivamente. O ST19 representa claramente os sorovares de Typhimurium (31 isolados), incluindo o sorovar Typhimurium monofásico (I 4[5]12:i:-), com 4 isolados. Também, o ST48 representa todos os isolados de Panama, o ST2370 representa 22 dos 26 isolados de Newport-, o ST20 representa 10 dos 12 isolados de Sandiego, e o ST226 representa todos os 10 isolados de Carrau.

Foram identificados 4 sorovares estão distribuídos em mais de um ST. Os sorovares são: Sandiego (ST20 e ST126), Infantis (ST32 e ST1032), Newport (ST45 e ST2370) e IV

43:z4z24:- (ST9492, ST9483 e ST9486). Todos os demais sorovares estiveram associados a um único e respectivo ST. Essa relação é demonstrada na **Tabela 1**.

As análises filogenéticas por MLST também permitem visualizar mais facilmente sorovares que são mais próximos ou distantes uns dos outros (**Figura 9**). Os STs 9490, 2374, 4340, 1541, 13 e 1280, representantes dos sorovares IV 38:gz51:-, IIIb 50:r:z, IIIb 38:(k):z35, Corvallis, Agona e II 42:r:-, foram identificados em um mesmo ramo da árvore. Os STs 20, 126, 48 e 9484, representantes dos sorovares Sandiego, Panama e Santiago ou Belém, também apresentam proximidade filogenética. Outros sorovares como Abaetetuba (ST 2041) e Rubislaw (ST 1575) são, também, filogeneticamente próximos, assim como Miami (ST 140) e Javiana (ST 2783).

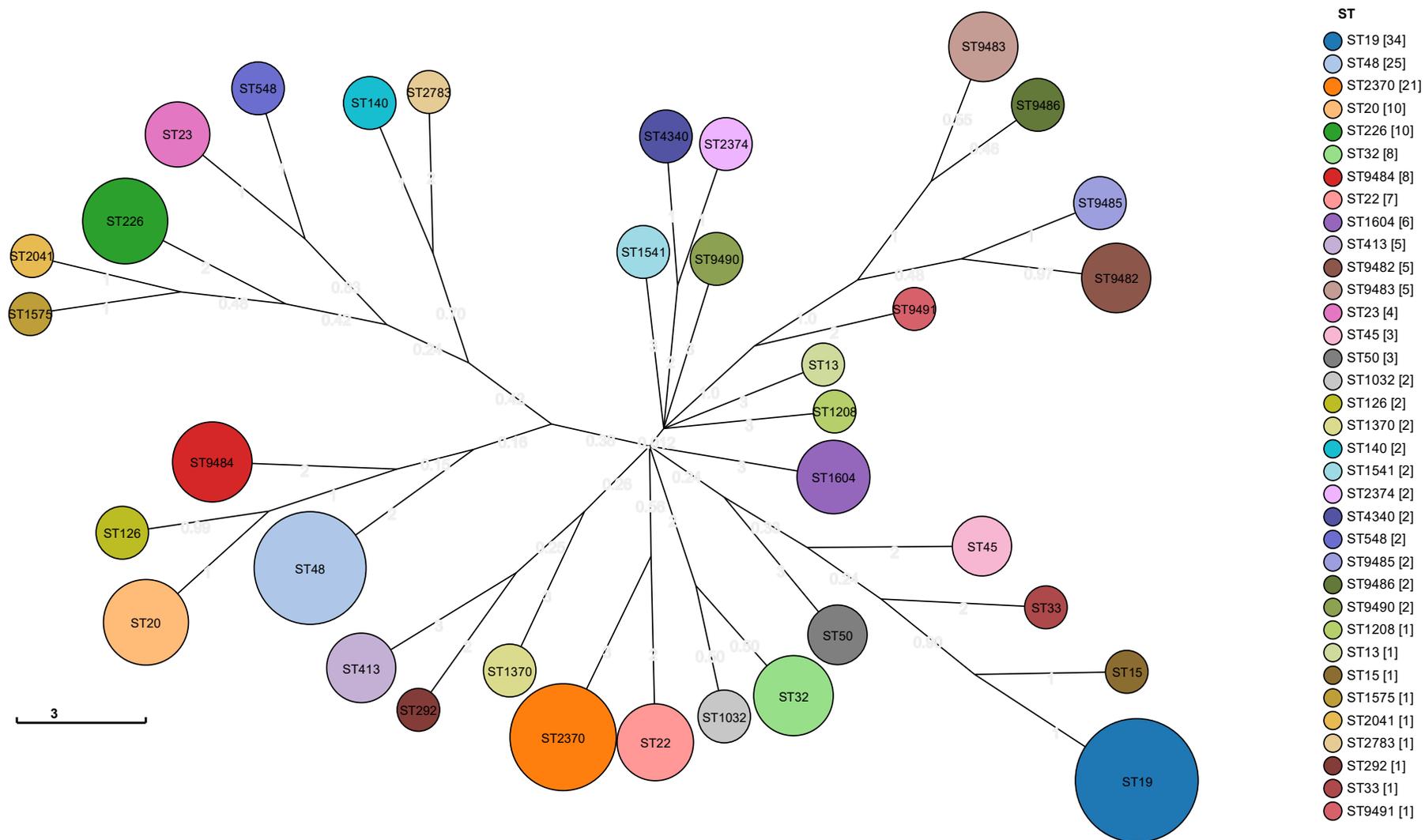


Figura 9 – STs identificados em 184 isolados de *Salmonella* sp, obtidos em águas superficiais de regiões agrárias do Rio de Janeiro. Os STs estão distribuídos ao longo da árvore, onde os sorovares mais relacionados, em relação à similaridade dos genes *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA*, encontram-se mais próximos. Ao lado direito, há uma legenda com o número de isolados por ST

Tabela 1– Distribuição de STs entre os 33 sorovares de *Salmonella spp.* obtidos a partir de águas superficiais de regiões agrárias do estado do Rio de Janeiro

Sorovar	STs	Número de amostras com a associação identificadas nestes estudo
- 4:r:12	15	1
Abaetetuba	2041	1
Agona	13	1
Albany ou Duesseldorf	292	1
Braenderup	22	7
Carrau	226	10
Corvallis	1541	2
Hadar	33	1
I 4[5]12:i:-	19	4
II 42:r:-	1208	1
IIIb 38:(k):z35	4340	2
IIIb 50:r:z	2374	2
Infantis	32 e 1032	8 e 2
IV 16:z4z32:-	9491	1
IV 21:z4z23:-	9485	2
IV 38:gz51:-	9490	2
IV 43:z4z24:-	9482, 9483 e 9486	5, 5 e 2
Javiana	2783	1
Mbandaka	413	5
Miami	140	2
Minnesota	548	2
Newport	45 e 2370	3 e 21
Oranienburg	23	4
Oslo	1370	2
Panama	48	25
Rubislaw	1575	1
Saintpaul	50	2
Sandiego	20 e 126	10 e 2
Santiago or Belem	9484	8
Saphra	1604	6
Typhimurium	19	30

5.4 Análise de SNPs de core genoma

Com os genomas montados, os dados acerca da presença de SNPs de core genoma da coleção de isolados foram obtidos pelo programa Snippy, que analisou os genomas em comparação com uma cepa referência *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium LT2, para a busca pela presença de SNPs no genoma. Com os dados referentes aos SNPs, foi investigada a presença de SNPs no core genoma dos isolados, com base na comparação entre

os SNPs dos isolados. A partir dos resultados obtidos, o arquivo de alinhamento de SNPs de core genoma foi processado pelo programa RaxML, para que fosse gerada a árvore filogenética dos isolados. A árvore gerada em arquivo newick foi graficamente gerada pela ferramenta online iTol.

Com os dados obtidos pela análise de core genoma dos isolados, é possível perceber o que o enquadramento filogenético dos isolados pertencentes à *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e dos isolados das demais subespécies são divergentes. Além da divergência entre os isolados de subespécies diferentes, há divergências claras entre os isolados da mesma subespécie, como os sorovares Carrau e Typhimurium se localizarem nos polos da árvore, sendo então, os genomas mais divergentes. Dois sorovares se inseriram em um clado majoritariamente pertencente a outro sorovar. Foram os sorovares Hadar e Santiago ou Belém, que estavam inseridos entre os isolados dos sorovares Panama e Sandiego, respectivamente. Ao analisar a raiz e as ramificações da árvore, é possível perceber que o sorovar Typhimurium – incluindo sua variação monofásica – se apresenta mais próximo à raiz (ancestral comum a todos os isolados) do que os demais sorovares. Vale salientar que todos os isolados de outras subespécies que não a subsp. *enterica*, possuem um mesmo ancestral comum. O ancestral comum das demais subespécies, está compreendido dentro da árvore. Alguns sorovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* compartilham do mesmo ancestral que as demais subespécies aqui encontradas. Pela análise de SNPs de core genoma dos isolados, é possível identificar que alguns dos sorovares, como Mbandaka, Albany ou Duesseldorf, Corvallis e Agona, possuem um genoma mais parecido com sorovares de outras subespécies do que com os sorovares Carrau, Minnesotaa, Tyhpimurium, por exemplo. As relações aqui descritas podem ser visualizadas na **Figura 10**.

Ao analisar a filogenia dos isolados comparada com os seus respectivos virulomas, nota-se os genes de virulência encontram-se conservados entre os sorovares, independente da proximidade entre os isolados do mesmo sorovar. A proximidade filogenética não apresenta reflexo nas características quantitativas e qualitativas dos genes de virulência. Essa relação está descrita na **Figura 11**

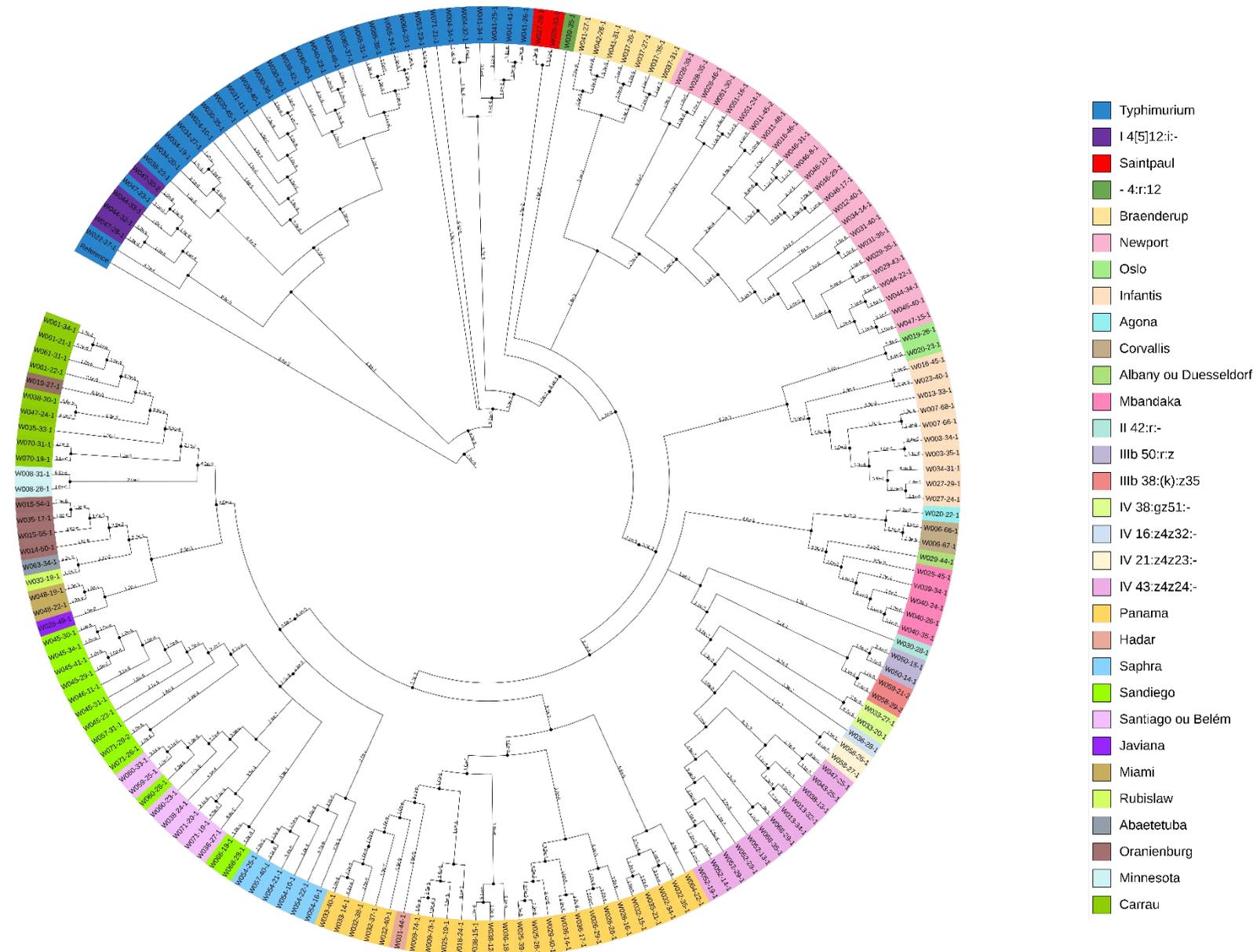


Figura 10 – Filogenia de 184 isolados de *Salmonella* sp. das grandes regiões de Vassouras e São José do Vale do Rio Preto. Estão representados 184 isolados de *Salmonella* sp. obtidos das grandes regiões de Vassouras e São José do Vale do Rio Preto, duas regiões impactadas por atividade agropecuária. Os isolados estão separados na figura de acordo com os seus respectivos sorovares (31), sendo clara a visualização de proximidade filogenética entre os isolados do mesmo sorovar e o distanciamento entre os diferentes sorovares

6 Discussão

Salmonella spp. é um gênero bacteriano encontrado no trato gastrointestinal de animais ectotérmicos e endotérmicos. Entretanto, bactérias desse gênero bacteriano podem representar uma ameaça ao estado de saúde em determinadas circunstâncias, como alteração da integridade imunológica do indivíduo (imunocomprometidos, HIV positivos), virulência do patógeno em infecções em diferentes hospedeiros, idade do indivíduo, infecções prévias etc. O gênero apresenta duas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. A primeira é comumente associada a animais ectotérmicos e ambientais, enquanto a segunda, que apresenta 6 subespécies, tem a subespécie *enterica* associada a animais de endotérmicos. Ao todo, o gênero apresenta mais de 2.600 sorovares, que variam a adaptação por seus hospedeiros, seja essa adaptação relacionada à poiquilotermia ou a espécie animal. Por se tratar de um patógeno associado ao trato gastrointestinal de diversos animais, como porcos, gado e aves de corte, esse microrganismo é um comum causador de DTHAs, sendo disseminado tanto por alimentos oriundos dos animais reservatórios, quanto por águas contaminadas pelos dejetos desses animais. Dessa forma, o estudo aqui realizado, tinha como objetivos a coleta de espécimes de águas de duas grandes regiões do estado do Rio de Janeiro (Vassouras e SJVRP), que são duas grandes regiões impactadas por rejeitos de propriedades com atividade agropecuária.

Após a primeira etapa do projeto, a de construção da coleção de amostras, foi constatado que as duas grandes regiões de São José do Vale do Rio Preto e Vassouras apresentam rios e córregos contaminados com uma alta diversidade de *Salmonella spp.* A diversidade encontrada corresponde a diferentes fontes de reservatórios dos patógenos aqui mencionados. Posteriormente ao sequenciamento dos genomas, foi determinada a identidade dos isolados, onde foram encontrados isolados de subsp. *salamae*, subsp. *houtenae* e subsp. *diarizonae*, por exemplo, que são comumente encontrados em animais de sangue frio. Embora infecções em humanos por *Salmonella spp.* não pertencentes à subespécie *enterica* não sejam tão recorrentes (Brenner *et al.*, 2000; Lamas *et al.*, 2018) o estudo e vigilância desses patógenos não devem ser descartados. Além disso, a grande maioria dos isolados é pertencente à *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Os sorovares da subespécie *enterica* foram mais prevalentes (26 sorovares, com 169 isolados) em relação as demais subespécies (7 sorovares, com 23 isolados). Tal prevalência nos isolados da subsp. *enterica* reforça e corrobora a escolha da região e pontos de coleta para amostragem, visto que são predominantes disseminados por animais de sangue quente, como gado, equinos e aves de corte. Vale mencionar que

contaminações de corpos d'água por animais de sangue frio como répteis e anfíbios, são comuns, principalmente em regiões rurais (Fookes *et al.*, 2011; Jajere, 2019).

Entre os isolados obtidos nesse trabalho, é notável a maior presença dos sorovares Typhimurium (31 isolados), Panama e Newport (ambos com 26 isolados), Sandiego e IV 43:z4z24:- (ambos com 12 isolados), Carrau e Infantis (ambos com 10 isolados). Sabe-se que esses sorovares são frequentemente encontrados em alimentos e fontes hídricas, e são recorrentes em infecções em humanos, com exceção de IV 43:z4z24:- - pertencente à *Salmonella* Houtenae, mais comum em anfíbios e répteis. Essa recorrência sugere um possível papel dos corpos d'água na rota de disseminação destes sorovares na cadeia das contaminações alimentares. Os achados se correlacionam com os dados de Bonadonna *et al.* 2006, onde em uma coleção de 95 isolados de *Salmonella spp.* obtidos de águas fluviais altamente impactadas da bacia hidrográfica de Fiume Sarno, Itália, foram identificados 45 sorovares, em que o sorovar Typhimurium foi o mais prevalente (13/95 isolados, 13,7% de representatividade), seguido de Infantis (5/95 isolados, 5,3% de representatividade) e Bredeney, Derby e Stanley (4/95, cada um, com 4,2% de representatividade), que não foram encontrados nesse estudo. Entre os outros 40 sorovares identificados por Bonadonna e colaboradores, apenas Agona (1/95 isolado, 1,05% de representatividade) e Saintpaul (2/95 isolados, 2,1% de representatividade) foram, também, identificados no presente trabalho, indicando também como pode divergir a ocorrência de sorovares de *Salmonella* em diferentes locais

É provável que a prevalência de Typhimurium sobre os demais sorovares seja justificada tanto por ser um sorovar generalista quanto pela persistência em ambiente aquático (Feasey *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 1999). Os dados aqui apresentados também se correlacionam com o estudo realizado por Baudart *et al.* 2000. Segundo estes autores, em amostras de água de 4 rios, 1 esgoto e sedimentos de 1 rio e 2 baías da costa oeste mediterrânea da comuna Banyuls-sur-Mer, França, foram obtidos 574 isolados e identificados 41 sorovares. Entre os isolados, 156 foram de Typhimurium (27,18%), obtidos principalmente de rios impactados por dejetos vindos de propriedades com criação de gado, javali, patos, frangos e gansos. O segundo sorovar mais isolado foi Newport, com 84 isolados representativos (14,63%). Ainda, entre os 41 sorovares, alguns deles que se mostram representados nesse estudo, foram: Panama (26 isolados, 4,5%); Infantis (23 isolados, 4,0%); Saintpaul (20 isolados, 3,5%); Hadar (20 isolados, 3,5%); Agona (7 isolados, 1,22%); Oranienburg (1 isolado, 0,2%); Braenderup (1 isolado, 0,2%); e Mbandaka (1 isolado, 0,2%). Vale ressaltar que a maior parte dos sorovares aqui destacados, foram obtidos a partir de águas fluviais impactadas por atividade agropecuária, com

exceção dos sorovares Newport, com 55 isolados (65,5%) e Saintpaul, com 20 isolados (100%), que foram obtidos a partir de esgoto.

Em um outro estudo realizado em São Paulo, Brasil, foram identificados 68 sorovares entre os 3554 isolados obtidos de amostras clínicas pelo Laboratório de Patógenos Entéricos, Instituto Adolf Lutz. Foram destacados 15 sorovares, justificados pela prevalência nas amostras clínicas estudadas. Entre os 15 isolados clínicos, 11 estão compreendidos na nossa coleção de isolados, sendo eles: Typhimurium (185); I 4[5]:12:i;- (184); Infantis (79), Agona (46); Panama (34); Oranienburg (31); Saintpaul (30); Newport (26); Hadar (22); Javiana (21); e Mbandaka (14). Todos os sorovares mencionados, tiveram mais de 80% dos isolados obtidos de amostras de fezes, com exceção de Typhimurium (79,4%) e I 4[5]:12:i; (65,7%). Os outros sítios avaliados, com menor frequência, foram: sangue; líquido cefalorraquidiano; urina; e outros. Esses dados sugerem menor virulência/invasibilidade dos isolados obtidos, visto que não foram encontrados, com proeminência, em amostras clínicas diferentes das fezes, quando comparados com sorovares restritos ao hospedeiro humano, como Typhi (91 isolados, 65,5%, obtidos de sangue) e adaptados, como Dublin (56 isolados, 65,2%, obtidos de sangue) (Fernandes *et al.*, 2006).

É digno de nota a observação de que nas amostras apresentadas nesse TCC, nenhuma cepa é restrita ao hospedeiro humano (*Salmonella* Tifóide), mas diversas cepas são invasivas (apresentam o operon *spv*) - tais dados serão discutidos mais a frente. Os dados aqui apresentados e os dados obtidos pelos estudos mencionados, sugerem que há uma prevalência de certos sorovares por determinados sítios de isolamentos. Uma característica interessante, é a de que a identidade dos sorovares se assemelham tanto quanto a localização geográfica, quanto a origem da amostra (espécime de água, material clínico, alimento contaminado etc.) o fator localização geográfica se mostra mais influente quanto a identidade dos sorovares do que o material amostrado, visto que os sorovares por nós identificados se assemelharam mais em nível de identidade com os sorovares dos isolados obtidos de material clínico no Brasil pelo estudo de Fernandes *et al.*, do que com espécimes de água obtidos em países como Itália e França, na Europa, pelos estudos de Bonadonna *et al.* e Baudart *et al.*

O viruloma dos isolados obtidos se comporta de maneira semelhante à identidade dos sorovares em relação a localização geográfica - são semelhantes. Os genes variam minimamente em quesitos quantitativos e qualitativos, o que sugere que a virulência em *Salmonella spp.* é conservada entre os sorovares, e que os sorovares apresentam papéis distintos em processos infecciosos em diferentes hospedeiros e sítios anatômicos, além de apresentarem prevalência diferente em localizações geográficas distintas, fatores que estão diretamente

ligados à identidade dos sorovares e ao viruloma. Diversos isolados obtidos de pontos de coleta diferentes, em rotas diferentes, pertenciam ao mesmo sorovar e apresentavam os mesmos genes de virulência, o que corrobora a hipótese de que o viruloma está intimamente ligado à identidade da cepa, como as cepas W024-10 (1) e W047-23 (1) sendo coletadas da rota Vassouras II e SJVRP I, respectivamente, ambas serem Typhimurium e apresentarem correspondência quantitativa e qualitativa em 100% e não apresentarem perfil clonal, de acordo com as análises filogenéticas. A conservação do viruloma correspondente ao sorovar, infere que as ilhas de patogenicidade de *Salmonella* sejam igualmente conservadas. Ao analisar os genes contidos em cada ilha, em comparação com os genes encontrados pela pesquisa realizada por (dos Santos *et al.*, 2021), foram identificadas as SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-11, SPI-12, o plasmídeo de virulência pLST, genes de profagos Gifsy-1, Gifsy-2 e Gifsy3, e uma Ilha de alta patogenicidade de *Yersinia* (HPI).

Sabe-se que muitos dos genes contidos nessas ilhas genômicas são adquiridos por Transferência Horizontal de Genes, ou seja, são oriundos de outros microrganismos. O que leva à interpretação de que os genes transferidos remetem a uma maior associação entre um dado microrganismo doador do gene e a *Salmonella* receptora. Um exemplo é o gene *ybtE*, uma yersiniabactina, um sideróforo de *Yersinia spp.*, estar presente em todos os isolados da subespécie *Diarizonae*. Assim como o gene *yopJ/yopP*, uma proteína efetora de *Yersinia spp.*, estar presente apenas nos isolados de Santiago/Belém, que não apresentam perfil clonal. É sugestivo de que a *Yersinia spp.* apresente correlação com *Salmonella spp.* da mesma forma que os genes mencionados estão conservados nos sorovares mencionados. Outros genes são compartilhados entre outros microrganismos e diferentes sorovares. Alguns genes foram conservados entre os isolados da coleção, genes como os do operon *csgABCDEFG*, operon *fimCDFHI* e operon *ssaCDEGHIJKLMNOPQRSTU*V. O estudo realizado por Santos e colaboradores corrobora os dados aqui obtidos. Entre os 775 genomas analisados - 12% das amostras foram obtidas de fonte ambiental (93 isolados) - os genes *mgtC*, *csgC*, *ssaI* e *ssaS* foram prevalentes em mais de 99% dos genomas, sendo, inclusive, sugeridos como alvos para identificação de *Salmonella spp.* por PCR. Esses dados indicam que além destes genes apresentarem prevalência em determinados sorovares, alguns genes de virulência são conservados no gênero bacteriano.

Ao analisar, comparativamente, os dados obtidos pelas análises de MLST e SNPs de core genoma, foi identificada a equivalência entre as análises a respeito de proximidade filogenética. Os STs identificados como filogeneticamente próximos, como os STs 20 e 126 (sorovar *Sandiego*) e os STs 40 (*Panama*) e ST 9484 (*Santiago* ou *Belém*), pelo MLST,

apresentaram proximidade pelas análises de SNPs de core genoma. Assim como STs 9490 (IV 38:gz51:-), 2374 (IIIb 50:r:z), 4340 (IIIb 38:(k):z35), 1541 (Corvallis), 13 (Agona) e 1280 (II 42:r:-). Ao analisar, por vez, o distanciamento filogenético, é possível constatar que a análise de core genoma corrobora o resultado do MLST. Sorovares como Typhimurium e Carrau, pertencentes a apenas um ST cada um, estão localizados nos extremos de cada árvore filogenética, o que leva à conclusão de os sorovares são filogeneticamente distantes. Os resultados acerca de proximidade dos sorovares encontrados se relacionam com os dados de Worley *et al.*, 2018, em que de 445 isolados analisados de todas as 6 subespécies de *Salmonella enterica*, os isolados de Typhimurium, Typhimurium monofásico, Saintpaul, Newport e Braenderup se encontram mais próximos. Além disso, outros sorovares, como Braenderup e Newport pertencem ao mesmo clado, tal qual Agona e Albany e Duesseldorf no presente estudo. Os sorovares Oranienburg, Miami e Rusbislaw seguem o mesmo padrão, em que estão mais polarizados na árvore filogenética e pertencem ao mesmo grande clado. Os dados de Worley são mais diversos, pois abrangem todas as subespécies de *S. enterica* e conta com 260 isolados de *S. enterica* subsp. *enterica*, enquanto o trabalho aqui apresentado conta com 184 isolados. Os dados aqui obtidos e discutidos referenciam apenas um pequeno grupo de isolados, em que alguns sorovares contam com apenas um isolado representante, o que não permite uma análise filogenética mais profunda acerca da estrutura populacional do gênero bacteriano, mas ainda assim permite uma visão ampla da coleção de isolados.

A correlação entre os genes de virulência e filogenia foi constatada pelas análises realizadas, uma vez que sorovares com a caráter quantitativo e qualitativo semelhantes, a respeito dos genes de virulência, apresentam um perfil de viruloma parecidos. Ao observar o heatmap obtido, nota-se que os sorovares filogeneticamente mais próximos, pertencentes a sorovares distintos, apresentam perfis de virulência mais semelhantes quando levados em conta os 11 grupos de genes de virulência estipulados. Sorovares como Typhimurium, Typhimurium monofásico, Braenderup, - 4:r:12, Infantis, Newport e Mbandaka apresentam um perfil quantitativo semelhante para o grupo de genes associados ao processo de adesão. Os genes de invasão e sistemas de secreção apresentam caráter quantitativo parecido em todos os sorovares deste grupo, inclusive que os genes ali abrigados são conservados. Apenas dois sorovares apresentam valor divergente dos demais, são os sorovares IV 16:z4z32:- e - 4:r:12, que apresentam um menor número de genes de invasão (pelo IV 16:z4z32:-), e genes de invasão e sistema de secreção (ambos os sorovares). O sorovar IV 16:z4z32:- é pertencente à subsp. *houtenae*, o que justificaria o tal fenômeno, se não fossem pelos outros isolados de *houtenae* terem tais genes conservados. O sorovar - 4:r:12, entretanto, é relatado pelo programa SeqSero2

como um perfil antigênico associado ao sorovar Heidelberg, um sorovar da subsp. *enterica*. Como o único isolado da coleção pertencente ao sorovar Heidelberg não pode ser analisado por problemas técnicos, não é possível a comparação entre as características quantitativas e qualitativas do sorovar. Em geral, ao analisar o heatmap, foram encontrados mais genes de virulência no sorovares pertencentes à subsp *enterica*, quando comparados com as demais subespécies. Poucos grupos de genes foram encontrados em relevância nessas subespécies, como os genes associados à metabolismo e nutrição, exotoxinas e o gene referente à flagelina G (encontrado apenas nos isolados IIIb 50:r:z e IV 38:gz51:-), quando comparado com os sorovares da subsp. *enterica*.

Além das análises particulares de cada sorovar, não foi identificada qualquer divergência entre a virulência dos isolados obtidos de espécimes de água de diferentes pontos de coleta, rotas e datas de coleta. Essa manutenção dos genes pelos sorovares sugere que o viruloma de cada sorovar é conservado.

Por fim, vale destacar que a disseminação de *Salmonella sp.* se dá, principalmente por vias alimentares. É de praxe que seja atribuído um destaque maior para alimentos de origem animal, como carne bovina, suína, frango, ou consumo de produtos contendo leite e ovos, por exemplo. A disseminação de cepas de *Salmonella* não pode ser, entretanto, atrelada apenas a esses produtos alimentícios. Diversos produtos alimentícios podem sofrer contaminação cruzada, como verduras, frutas, chocolates, pães etc (Carrasco *et al.*, 2012). São produtos que podem ter entrado em contato com superfícies contaminadas pelo patógeno. Além disso, fontes hídricas também podem ser um importante fator de disseminação do patógeno seja pelo consumo direto da água contaminada, ou pela utilização dessas águas para irrigação de plantios. Dito isso, os dados aqui encontrados, de presença de *Salmonella* em águas que circundam propriedades com atividade agrícola, em conjunto com dados da literatura, reforçam a necessidade de atenção para a vigilância e prevenção de doenças ocasionadas pelo patógeno. Portanto, medidas recomendadas pela OMS em (WHO, 2003) que envolvam disponibilização de saneamento básico, políticas públicas de educação para manuseio de alimentos e disponibilização de alimentos seguros para o consumo, tornam-se necessárias para a prevenção de disseminação do patógeno.

7 Conclusão

O presente trabalho constitui um estudo acerca da diversidade de isolados de *Salmonella sp.* obtidas em águas superficiais de regiões agrícolas do Rio de Janeiro, com enfoque na identificação e caracterização molecular dos perfis de virulência dos isolados.

- A coleção de isolados que compõe o estudo é diversa em número e identidade dos sorovares obtidos nas diferentes rotas e pontos de coleta.
- Houve boa congruência entre a classificação por sorovar e MLST, demonstrando a robustez da análise genômica para acessar a identidade por sorovares e a sugerindo a possibilidade de que no futuro seja feita a opção por somente uma destas caracterizações, onde MLST é mais facilmente executável
- A análise realizada por SNPs refinou a obtida por MLST sem importantes divergências. Por SNPs foi possível identificar as amostras clonais da coleção.
- Houve boa associação dos sorovares com perfis específicos de virulência, que divergiram em amostras filogeneticamente mais diversas. Os isolados filogeneticamente mais distantes apresentaram ligeiras divergências quanto a caracterização molecular dos perfis de virulência. Sorovares classicamente associados a infecções em humanos apresentaram mais genes de virulência notadamente das classes adesão, proteínas efetoras, sobrevivência ao estresse e modulação do sistema imune, do que sorovares menos associados a estes quadros.
- A presença de cepas de *Salmonella* pertencentes a sorovares diversos, e portadoras de genes de virulência, em águas superficiais de regiões agrícolas no Rio de Janeiro aponta tais corpos d'água como possível rota de disseminação deste patógeno entre animais, ambiente e humanos. Neste contexto, medidas como saneamento, disponibilidade de água tratada, e boas práticas na produção de alimentos, são importantes para evitar a ocorrência de DTHA.

8 Referências:

- Abrahams, G. L., Müller, P., e Hensel, M. (2006) Functional Dissection of SseF, a Type III Effector Protein Involved in Positioning the Salmonella-Containing Vacuole. *Traffic*, 7(8), 950–965.
- Alikhan, N.-F., Moreno, L. Z., Castellanos, L. R., Chattaway, M. A., McLauchlin, J., Lodge, M., O’Grady, J., Zamudio, R., Doughty, E., Petrovska, L., Cunha, M. P. V., Knöbl, T., Moreno, A. M., e Mather, A. E. (2022) Dynamics of Salmonella enterica and antimicrobial resistance in the Brazilian poultry industry and global impacts on public health. *PLOS Genetics*, 18(6), e1010174.
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., e Peixe, L. (2016) Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110–121.
- Ao, T., Feasey, N., Gordon, M., Keddy, K., Angulo, F., e Crump, J. (2015) Global Burden of Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease, 2010. *Emerging infectious diseases*, 21, 941–949.
- Azimi, T., Zamirnasta, M., Sani, M. A., Soltan Dallal, M. M., e Nasser, A. (2020) Molecular Mechanisms of Salmonella Effector Proteins: A Comprehensive Review. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, 11–26.
- Bakowski, M. A., Braun, V., e Brumell, J. H. (2008) Salmonella-Containing Vacuoles: Directing Traffic and Nesting to Grow. *Traffic*, 9(12), 2022–2031.
- Banerji, S., Simon, S., e Tille, A. (2020) Genome-based Salmonella serotyping as the new gold standard. *Scientific Reports*, 10(1), 4333.
- Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A., e Lebaron, P. (2000) Diversity of Salmonella Strains Isolated from the Aquatic Environment as Determined by Serotyping and Amplification of the Ribosomal DNA Spacer Regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1544–1552.
- Bayer-Santos, E., Durkin, C. H., Rigano, L. A., Kupz, A., Alix, E., Cerny, O., Jennings, E., Liu, M., Ryan, A. S., Lapaque, N., Kaufmann, S. H. E., e Holden, D. W. (2016) The Salmonella Effector SteD Mediates MARCH8-Dependent Ubiquitination of MHC II Molecules and Inhibits T Cell Activation. *Cell Host & Microbe*, 20(5), 584–595.
- Bonadonna, L., Filetici, E., Nusca, A., e Paradiso, R. (2006) Controlli ambientali sulla diffusione di sierotipi di Salmonella spp in acque fluviali. *Microbiologia Medica*, 21.
- BRASIL. (2011) Manual técnico de diagnóstico laboratorial da Salmonella spp. Obtido 15 de junho de 2022, de https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/sislab/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_laboratorial_salmonella_spp.pdf/view
- Brenner, F. W., Villar, R. G., e Angulo, F. J. (2000) Salmonella Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465–2467.
- Brown, N. F., Vallance, B. A., Coombes, B. K., Valdez, Y., Coburn, B. A., e Finlay, B. B. (2005) Salmonella Pathogenicity Island 2 Is Expressed Prior to Penetrating the Intestine. *PLOS Pathogens*, 1(3), e32.
- Cai, Y., Tao, J., Jiao, Y., Fei, X., Zhou, L., Wang, Y., Zheng, H., Pan, Z., e Jiao, X. (2016) Phenotypic characteristics and genotypic correlation between Salmonella isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 56–64.
- Campos, J., Mourão, J., Peixe, L., e Antunes, P. (2019) Non-typhoidal Salmonella in the Pig Production Chain: A Comprehensive Analysis of Its Impact on Human Health. *Pathogens*, 8(1), 19.
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., e García-Gimeno, R. M. (2012) Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556.
- CDC. (2019a) Snapshots of Salmonella Serotypes. Obtido 19 de junho de 2022, em <<https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotype-snapshots.html>>
- CDC. (2019b) Outbreak of Salmonella Infections Linked to Pre-Cut Melons | Outbreak of Salmonella Infections Linked to Pre-Cut Melon | April 2019 | Salmonella | CDC. Obtido 7 de fevereiro de 2020, de <https://www.cdc.gov/salmonella/carrau-04-19/index.html>
- CDC. (2022) Salmonella. Obtido 5 de junho de 2022, de <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
- Chakraborty, S., Mizusaki, H., e Kenney, L. J. (2015) A FRET-Based DNA Biosensor Tracks OmpR-Dependent Acidification of Salmonella during Macrophage Infection. *PLOS Biology*, 13(4), e1002116.

- Chattaway, M. A., Langridge, G. C., e Wain, J. (2021) Salmonella nomenclature in the genomic era: a time for change. *Scientific Reports*, 11(1), 7494.
- Chen, L.-M., Hobbie, S., e Galán, J. E. (1996) Requirement of CDC42 for Salmonella-Induced Cytoskeletal and Nuclear Responses. *Science*, 274(5295), 2115–2118.
- Collier-Hyams, L. S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A. D., Bao, Z. Q., Chen, H., Madara, J. L., Orth, K., e Neish, A. S. (2002) Cutting Edge: *Salmonella* AvrA Effector Inhibits the Key Proinflammatory, Anti-Apoptotic NF- κ B Pathway. *The Journal of Immunology*, 169(6), 2846–2850.
- Crosa, J. H., Brenner, D. J., e Ewing, W. H. (1973) Molecular Relationships Among the Salmonelleae. *Journal of Bacteriology*, 115(1), 307–315.
- Crump, J. A., Ramadhani, H. O., Morrissey, A. B., Saganda, W., Mwako, M. S., Yang, L.-Y., Chow, S.-C., Morpeth, S. C., Reyburn, H., Njau, B. N., Shaw, A. V., Diefenthal, H. C., Shao, J. F., Bartlett, J. A., e Maro, V. P. (2011) Invasive Bacterial and Fungal Infections Among Hospitalized HIV-Infected and HIV-Uninfected Adults and Adolescents in Northern Tanzania. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(3), 341–348.
- Crump, J. A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M. A., e Parry, C. M. (2015) Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), 901–937.
- Cunha-Neto, A., Carvalho, L. A., Castro, V. S., Barcelos, F. G., Carvalho, R. C. T., Rodrigues, D. dos P., Conte-Junior, C. A., e Figueiredo, E. E. de S. (2020) *Salmonella* Anatum, *S. Infantis* and *S. Schwarzengrund* in Brazilian Cheeses: Occurrence and antibiotic resistance profiles. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 296–300.
- D’Costa, V. M., Braun, V., Landekic, M., Shi, R., Proteau, A., McDonald, L., Cygler, M., Grinstein, S., e Brumell, J. H. (2015) Salmonella Disrupts Host Endocytic Trafficking by SopD2-Mediated Inhibition of Rab7. *Cell Reports*, 12(9), 1508–1518.
- de Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., e Wiersinga, W. J. (2012) Host–Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathogens*, 8(10), e1002933.
- Del Fabbro, C., Scalabrin, S., Morgante, M., e Giorgi, F. M. (2013) An Extensive Evaluation of Read Trimming Effects on Illumina NGS Data Analysis. *PLoS ONE*, 8(12), e85024.
- Delyea, C., Luo, S. Y., e Dubrule, B. E. (2021, outubro 12) NOD1 is super-activated through spatially-selective ubiquitination by the Salmonella effector SspH2. bioRxiv, 1-21.
- Desai, Prerak T., Porwollik, S., e Long, F. (2013) Evolutionary Genomics of *Salmonella enterica* Subspecies | mBio, e00579-12.
- Desjardins, M. (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of Cell Biology*, 124(5), 677–688.
- Doolittle, R. F., Feng, D.-F., e Tsang, S. (1996) Determining Divergence Times of the Major Kingdoms of Living Organisms with a Protein Clock. *Science*, 271(5248), 470–477.
- dos Santos, A. M. P., Ferrari, R. G., e Conte-Junior, C. A. (2019) Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Current Microbiology*, 76(6), 762–773.
- dos Santos, A. M. P., Ferrari, R. G., Panzenhagen, P., Rodrigues, G. L., e Conte-Junior, C. A. (2021) Virulence genes identification and characterization revealed the presence of the *Yersinia* High Pathogenicity Island (HPI) in *Salmonella* from Brazil. *Gene*, 787, 145646.
- Dos Santos Bersot, L., Quintana Cavicchioli, V., Viana, C., Konrad Burin, R. C., Camargo, A. C., de Almeida Nogueira Pinto, J. P., Nero, L. A., e Destro, M. T. (2019) Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Diversity of *Salmonella* along the Pig Production Chain in Southern Brazil. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(4), E204.
- EMBRAPA. (2021) Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudo. Obtido 14 de junho de 2022, de <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>
- Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., e Lee, L.-H. (2015) Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293.

- Fattinger, S. A., Sellin, M. E., e Hardt, W.-D. (2021) Salmonella effector driven invasion of the gut epithelium: breaking in and setting the house on fire. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 9–18.
- Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., e Gordon, M. A. (2012) Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*, 379(9835), 2489–2499.
- Fernandes, D. V. G. S., Castro, V. S., Cunha Neto, A. da, e Figueiredo, E. E. de S. (2018) Salmonella spp. in the fish production chain: a review. *Ciência Rural*, 48(8).
- Fernandes, S. A., Tavechio, A. T., Ghilardi, Â. C. R., Dias, Â. M. G., Almeida, I. A. Z. C. de, e Melo, L. C. V. de. (2006) Salmonella serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(4), 179–184.
- Ferrari, R. G., Rosario, D. K. A., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E. S., e Conte-Junior, C. A. (2019) Worldwide Epidemiology of Salmonella Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14), e00591-19.
- Food Safety Brasil. (2019) Perfil Epidemiológico das Doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA). *Portal e-food | Tudo sobre Segurança de Alimentos*. Obtido de <https://portalefood.com.br/haccp/perfil-epidemiologico-das-doencas-transmitidas-por-alimentos-DTHA/>
- Fookes, M., Schroeder, G. N., Langridge, G. C., Blondel, C. J., Mamma, C., Connor, T. R., Seth-Smith, H., Vernikos, G. S., Robinson, K. S., Sanders, M., Petty, N. K., Kingsley, R. A., Bäumler, A. J., Nuccio, S.-P., Contreras, I., Santiviago, C. A., Maskell, D., Barrow, P., Humphrey, T., Nastasi, A., Roberts, M., Frankel, G., Parkhill, J., Dougan, G., e Thomson, N. R. (2011) Salmonella bongori Provides Insights into the Evolution of the Salmonellae. *PLoS Pathogens*, 7(8), e1002191.
- Forgac, M. (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), 917–929.
- Foster, J. W. (2008) Low pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of Salmonella typhimurium. *Critical Reviews in Microbiology*, 21:4, 215-237.
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C., e Grassl, G. A. (2014) Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal Salmonella enterica serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-10.
- Grimont, P., e Weill, F.-X. (2007) Antigenic Formulae of the Salmonella serovars, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. *Institute Pasteur.*, 1–166.
- Groisman, E. A., e Ochman, H. (1996) Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps. *Cell*, 87(5), 791–794.
- Gutiérrez, S., Fischer, J., Ganesan, R., Hos, N. J., Cildir, G., Wolke, M., Pessia, A., Frommolt, P., Desiderio, V., Velagapudi, V., e Robinson, N. (2021) Salmonella Typhimurium impairs glycolysis-mediated acidification of phagosomes to evade macrophage defense. *PLOS Pathogens*, 17(9), e1009943.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., e Miller, S. I. (2008) Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53–66.
- Henry, T., Couillault, C., Rockenfeller, P., Boucrot, E., Dumont, A., Schroeder, N., Hermant, A., Knodler, L. A., Lecine, P., Steele-Mortimer, O., Borg, J.-P., Gorvel, J.-P., e Méresse, S. (2006) The Salmonella effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(36), 13497–13502.
- Hensel, M. (2004) Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2–3), 95–102.
- Hofer, E., Silva Filho, S. J. da, e Reis, E. M. F. dos. (1997) Prevalência de sorovares de Salmonella isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 17(2), 55–62.
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., e Dinh, A. (2021) Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811
- Hume, P. J., Singh, V., Davidson, A. C., e Koronakis, V. (2017) Swiss Army Pathogen: The Salmonella Entry Toolkit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 1-10.
- Hur, J., Choi, Y. Y., Park, J. H., Jeon, B. W., Lee, H. S., Kim, A. R., e Lee, J. H. (2011) Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(1), 49–56.

- Ibrahim, G. M., e Morin, P. M. (2018) Salmonella Serotyping Using Whole Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-8.
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P. I., e Weill, F.-X. (2014) Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7), 526–530.
- Jackson, B. R., Griffin, P. M., Cole, D., Walsh, K. A., e Chai, S. J. (2013) Outbreak-associated Salmonella enterica Serotypes and Food Commodities, United States, 1998–2008 - Volume 19, Number 8—August 2013 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC., 19, 1239-1244.
- Jackson, L. K., Nawabi, P., e Hentea, C. (2008) The Salmonella virulence protein SifA is a G protein antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 14141–14146.
- Jacobsen, A., Hendriksen, R. S., e Aaresturp, F. M. (2011) The Salmonella enterica Pan-genome. *Microbial Ecology*, 62(3), 487.
- Jajere, S. M. (2019) A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504–521.
- James, S. L., et al. 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1789–1858.
- Kolodziejek, A. M., Altura, M. A., Fan, J., Petersen, E. M., Cook, M., Brzovic, P. S., e Miller, S. I. (2019) Salmonella Translocated Effectors Recruit OSBP1 to the Phagosome to Promote Vacuolar Membrane Integrity. *Cell Reports*, 27(7), 2147-2156.e5.
- Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C. M., e Cepeda, A. (2018) A comprehensive review of non-enterica subspecies of Salmonella enterica. *Microbiological Research*, 206, 60–73.
- Lan, R., Reeves, P. R., e Octavia, S. (2009) Population structure, origins and evolution of major Salmonella enterica clones. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 996–1005.
- Lara-Tejero, M., e Galán, J. E. (2009) Salmonella enterica Serovar Typhimurium Pathogenicity Island 1-Encoded Type III Secretion System Translocases Mediate Intimate Attachment to Nonphagocytic Cells. *Infection and Immunity*, 77(7), 2635–2642.
- Lerminiaux, N. A., MacKenzie, K. D., e Cameron, A. D. S. (2020) Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1): The Evolution and Stabilization of a Core Genomic Type Three Secretion System. *Microorganisms*, 8(4), 576.
- Li, X., Bleumink-Pluym, N. M. C., Luijckx, Y. M. C. A., Wubbolts, R. W., Putten, J. P. M. van, e Strijbis, K. (2019) MUC1 is a receptor for the Salmonella SiiE adhesin that enables apical invasion into enterocytes. *PLoS Pathogens*, 15(2), e1007566.
- MacLennan, C. A. (2014) Editorial Commentary: Out of Africa: Links Between Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease, Typhoid Fever, and Malaria. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58(5), 648–650.
- Madico, G., Akopyants, N. S., e Berg, D. E. (1995) Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of Escherichia coli O157:H7 strains by using templates from boiled cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(6), 1534–1536.
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., Hoekstra, R. M., e for the International Collaboration on Enteric Disease “Burden of Illness” Studies. (2010) The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882–889.
- Mankhambo, L. A., Chiwaya, K. W., Phiri, A., e Graham, S. M. (2006) LOBAR PNEUMONIA CAUSED BY NONTYPHOIDAL SALMONELLA IN A MALAWIAN CHILD. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 25(12), 1190–1192.
- MAPA, M. da A., Pecuaría e Abastecimento. (2003) INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 78, DE 3 DE NOVEMBRO DE 2003. Obtido em 19 de Julho de 2022, de <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/imagens/INSTRUONORMATIVAN78DE3DENOVEMBRODE2003.pdf/view>>
- Marwaha, R., Arya, S. B., Jagga, D., Kaur, H., Tuli, A., e Sharma, M. (2017) The Rab7 effector PLEKHM1 binds Arl8b to promote cargo traffic to lysosomes. *Journal of Cell Biology*, 216(4), 1051–1070.

- Matsuoka, D. M., Costa, S. F., Mangini, C., Almeida, G. M. D., Bento, C. N., Van Der Heijden, I. M., Soares, R. E., Gobara, S., Távora, L. G. F., e Levin, A. S. (2004) A nosocomial outbreak of Salmonella enteritidis associated with lyophilized enteral nutrition. *Journal of Hospital Infection*, 58(2), 122–127.
- McGhie, E. J., Brawn, L. C., e Hume, P. J. (2009) Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), 117–124.
- Meneguzzi, M., Kich, J. D., Rebelatto, R., Pissetti, C., Kuchiishi, S. S., Reis, A. T., Guedes, R. M. C., Leão, J. A., e Reichen, C. (2017) Salmonella clinical isolates from Brazilian pig herds: genetic relationship and antibiotic resistance profiling. *International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork* (p. 170–174)
- Mesquita, F. S., Thomas, M., Sachse, M., Santos, A. J. M., Figueira, R., e Holden, D. W. (2012) The Salmonella Deubiquitinase SseL Inhibits Selective Autophagy of Cytosolic Aggregates. *PLOS Pathogens*, 8(6), e1002743.
- Mezal, E. H., Sabol, A., Khan, M. A., Ali, N., Stefanova, R., e Khan, A. A. (2014) Isolation and molecular characterization of Salmonella enterica serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. *Food Microbiology*, 38, 67–74.
- Nielsen. (2013) Gross margin losses due to Salmonella Dublin infection in Danish dairy cattle herds estimated by simulation modelling. 11, 51-62.
- Nillian, E., Ching, C. L., Fung, P. C., Robin, T., Anyi, U., Chilek, T. Z. T., Radu, S., e Nishibuchi, M. (2011) Simultaneous Detection of Salmonella spp., Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium in Raw Salad Vegetables and Vegetarian Burger Patties. *Food and Nutrition Sciences*, 02(10), 1077–1081.
- Ochman, H., e Wilson, A. C. (1987) Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 26(1–2), 74–86.
- Olsen, S. J., Bleasdale, S. C., Magnano, A. R., Landrigan, C., Holland, B. H., Tauxe, R. V., Mintz, E. D., e Luby, S. (2003) Outbreaks of typhoid fever in the United States, 1960-99. *Epidemiology and Infection*, 130(1), 13–21.
- Palmer, A. D., e Slauch, J. M. (2017) Mechanisms of Salmonella pathogenesis in animal models. *Human and ecological risk assessment : HERA*, 23(8), 1877–1892.
- Parry, C. M., Hien, T. T., Dougan, G., White, N. J., e Farrar, J. J. (2002) Typhoid Fever. *New England Journal of Medicine*, 347(22), 1770–1782.
- Patel, J. C., e Galán, J. E. (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella–host cell interactions. *Journal of Cell Biology*, 175(3), 453–463.
- Popoff, M.-Y., Bockemühl, J., e Brenner, F. W. (2000) Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, 151(1), 63–65.
- Post, A. S., Diallo, S. N., Guiraud, I., Lompo, P., Tahita, M. C., Maltha, J., Van Puyvelde, S., Mattheus, W., Ley, B., Thriemer, K., Rouamba, E., Derra, K., Deborggraeve, S., Tinto, H., e Jacobs, J. (2019) Supporting evidence for a human reservoir of invasive non-Typhoidal Salmonella from household samples in Burkina Faso. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(10), e0007782.
- Que, F., Wu, S., e Huang, R. (2013) Salmonella Pathogenicity Island 1(SPI-1) at Work. *Current Microbiology*, 66(6), 582–587.
- Rahman, G. A., Abubakar, A. M., Johnson, A.-W. B. R., e Adeniran, J. O. (2001) Typhoid ileal perforation in Nigerian children: an analysis of 106 operative cases. *Pediatric Surgery International*, 17(8), 628–630.
- Rehman, T., Yin, L., Latif, M. B., Chen, J., Wang, K., Geng, Y., Huang, X., Abaidullah, M., Guo, H., e Ouyang, P. (2019) Adhesive mechanism of different Salmonella fimbrial adhesins. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103748.
- Rohilla, R., Bhatia, M., Gupta, P., Singh, A., Shankar, R., e Omar, B. J. (2019) Salmonella osteomyelitis: A rare extraintestinal manifestation of an endemic pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*, 11(02), 164–170.
- Rukambile, E., Sintchenko, V., Muscatello, G., Kock, R., e Alders, R. (2019) Infection, colonization and shedding of Campylobacter and Salmonella in animals and their contribution to human disease: A review. *Zoonoses and Public Health*, 66(6), 562–578.
- Ryan, M. P., O’Dwyer, J., e Adley, C. C. (2017) Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella. *BioMed Research International*, 2017, 3782182.

- Sbodio, A., Maeda, S., Lopez-Velasco, G., e Suslow, T. V. (2013) Modified Moore swab optimization and validation in capturing *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in large volume field samples of irrigation water. *Food Research International*, 51(2), 654–662.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L., e Griffin, P. M. (2011) Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7–15.
- Scott, J. A. G., Berkley, J. A., Mwangi, I., Ochola, L., Uyoga, S., Macharia, A., Ndila, C., Lowe, B. S., Mwarumba, S., Bauni, E., Marsh, K., e Williams, T. N. (2011) Relation between falciparum malaria and bacteraemia in Kenyan children: a population-based, case-control study and a longitudinal study. *The Lancet*, 378(9799), 1316–1323.
- Seribelli, A. A., Cruz, M. F., Vilela, F. P., Frazão, M. R., Paziani, M. H., Almeida, F., Medeiros, M. I. C., Rodrigues, D. dos P., Kress, M. R. von Z., Allard, M. W., e Falcão, J. P. (2020) Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from humans and foods in Brazil. *PLOS ONE*, 15(8), e0237886.
- Singh, S., Singh, H., e Tiwari, S. C. (2013) Characterization of Virulence Factors among Diverse *Salmonella* Serotypes and Sources. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 1 (2): 69–74
- Srikanth, C. V., Mercado-Lubo, R., Hallstrom, K., e McCormick, B. A. (2011) *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(22), 3687–3697.
- Steele-Mortimer, O., Méresse, S., Gorvel, J. P., Toh, B. H., e Finlay, B. B. (1999) Biogenesis of *Salmonella* typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cellular Microbiology*, 1(1), 33–49.
- Suay-García, B., e Pérez-Gracia, M. T. (2021) Present and Future of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Advances in Clinical Immunology, Medical Microbiology, COVID-19, and Big Data*. Jenny Stanford Publishing, 8(3), 122.
- Tack, B., Vanaenrode, J., e Verbakel, J. Y. (2020) Invasive non-typhoidal *Salmonella* infections in sub-Saharan Africa: a systematic review on antimicrobial resistance and treatment. *BMC Medicine*, 18(1), 212.
- Trabulsi. (2015) *Microbiologia Trabulsi - Alterthum*. (6° Edição.). Atheneu, 351-360.
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesús, J., Platt, D. J., e Olsen, J. E. (2000) Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*, 125(2), 229–255.
- Vilela, F. P., dos Prazeres Rodrigues, D., Costa, R. G., Casas, M. R. T., Falcão, J. P., e Campioni, F. (2020) High similarity and high frequency of virulence genes among *Salmonella* Dublin strains isolated over a 33-year period in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 497–509.
- Vilela, F. P., Rodrigues, D. dos P., Allard, M. W., e Falcão, J. P. (2022) Genomic characterization and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serovar Infantis isolated from food, humans and veterinary-related sources in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 3327–3342.
- Voss-Rech, D., Vaz, C. S. L., Alves, L., Coldebella, A., Leão, J. A., Rodrigues, D. P., e Back, A. (2015) A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poultry Science*, 94(3), 433–441.
- Wagner, C., Polke, M., Gerlach, R. G., Linke, D., Stierhof, Y.-D., Schwarz, H., e Hensel, M. (2011) Functional dissection of SiiE, a giant non-fimbrial adhesin of *Salmonella enterica*. *Cellular Microbiology*, 13(8), 1286–1301.
- Wain, J., House, D., Zafar, A., Baker, S., Nair, S., Kidgell, C., Bhutta, Z., Dougan, G., e Hasan, R. (2005) Vi Antigen Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhi Clinical Isolates from Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1158–1165.
- Wang, M., Qazi, I. H., Wang, L., e Zhou, G. (2020) *Salmonella* Virulence and Immune Escape. *Microorganisms*, 8(3), 1-25.
- Wen, S. C., Best, E., e Nourse, C. (2017) Non-typhoidal *Salmonella* infections in children: Review of literature and recommendations for management. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 53(10), 936–941.
- WHO. (2003) Background document: the diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. Obtido 7 de janeiro de 2023, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., e Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535.

Wood, M. W., Jones, M. A., Watson, P. R., Hedges, S., Wallis, T. S., e Galyov, E. E. (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity*. *Molecular Microbiology*, 29(3), 883–891.

Worley, J., Meng, J., Allard, M. W., Brown, E. W., e Timme, R. E. (2018) *Salmonella enterica* Phylogeny Based on Whole-Genome Sequencing Reveals Two New Clades and Novel Patterns of Horizontally Acquired Genetic Elements. *mBio*, 9(6), e02303-18.

Zhang, Y., Higashide, W. M., e McCormick, B. A. (2006) The inflammation-associated *Salmonella* SopA is a HECT-like E3 ubiquitin ligase. *Molecular Microbiology*, 62(3), 786–793.

9 Anexo

Rota e pontos de coleta com a identidade dos sorovares e STs identificados entre 184 amostras bacterianas obtidas em águas superficiais das regiões de Vassouras e São José do Vale do Rio Preto, no Rio de Janeiro.:

Rota	Ponto	Amostra	Sorovares	STs
Vassouras I	2	W003-34-1	Infantis	32
Vassouras I	2	W003-35-1	Infantis	32
Vassouras I	3	W004-32-1	Typhimurium	19
Vassouras I	3	W004-34-1	Typhimurium	19
SJVRP I	3	W006-66-1	Corvallis	1541
SJVRP I	3	W006-67-1	Corvallis	1541
SJVRP I	5	W007-66-1	Infantis	1032
SJVRP I	5	W007-68-1	Infantis	1032
SJVRP I	8	W008-28-1	Minnesota	548
SJVRP I	8	W008-31-1	Minnesota	548
SJVRP I	29	W009-73-1	Panama	48
SJVRP I	29	W009-74-1	Panama	48
SJVRP I	31	W011-45-2	Newport	2370
SJVRP I	31	W011-48-1	Newport	2370
SJVRP I	28	W012-40-1	Newport	2370
SJVRP I	27	W013-32-1	IV 43:z4z24:-	9482
SJVRP I	27	W013-33-1	Infantis	1032
SJVRP I	27	W013-34-1	IV 43:z4z24:-	9482
SJVRP I	26	W014-50-1	Oranienburg	23
SJVRP I	25A	W015-54-1	Oranienburg	23
SJVRP I	25A	W015-55-1	Oranienburg	23
SJVRP I	23	W016-45-1	Infantis	1032
SJVRP I	23	W016-46-1	Newport	2370
Vassouras II	14B	W018-24-1	Panama	48
Vassouras II	15	W019-26-1	Oslo	1370
Vassouras II	15	W019-27-1	Carrau	226
Vassouras II	17	W020-22-1	Agona	13
Vassouras II	17	W020-23-1	Oslo	1370
Vassouras II	20	W022-37-1	Typhimurium	19
Vassouras II	21	W023-40-1	Infantis	1032
Vassouras II	23	W024-10-1	Typhimurium	19
SJVRP I	2	W025-19-1	Panama	48
SJVRP I	2	W025-28-1	Panama	48
SJVRP I	2	W025-39-1	Panama	48
SJVRP I	2	W025-45-1	Mbandaka	413
SJVRP I	2A	W026-16-1	Panama	48

Rota	Ponto	Amostra	Sorovares	STs
SJVRP I	2A	W026-26-1	Panama	48
SJVRP I	2A	W026-29-1	Panama	48
SJVRP I	2A	W026-33-1	Saintpaul	50
SJVRP I	2C	W027-24-1	Infantis	1032
SJVRP I	2C	W027-26-1	Saintpaul	50
SJVRP I	2C	W027-29-1	Infantis	1032
SJVRP I	2B	W028-35-1	Newport	45
SJVRP I	2B	W028-38-1	Newport	45
SJVRP I	2B	W028-46-1	Newport	45
SJVRP I	2B	W028-49-1	Javiana	2783
SJVRP I	3A	W029-35-1	Newport	2370
SJVRP I	3A	W029-40-1	Panama	48
SJVRP I	3A	W029-43-1	Newport	2370
SJVRP I	3A	W029-44-1	Albany or Duesseldorf	292
SJVRP I	55	W030-28-1	II 42:r:-	1208
SJVRP I	5	W030-30-1	Typhimurium	19
SJVRP I	5	W030-35-1	Typhimurium	19
SJVRP I	5	W030-36-1	Typhimurium	19
SJVRP I	5	W030-40-1	Typhimurium	19
SJVRP I	5	W030-45-1	Typhimurium	19
SJVRP I	31	W031-36-1	Newport	2370
SJVRP I	7A	W031-40-1	Newport	2370
SJVRP I	7A	W031-41-1	Typhimurium	19
SJVRP I	7A	W031-44-1	Hadar	33
SJVRP I	44	W032-15-1	Panama	48
SJVRP I	44	W032-34-1	Panama	48
SJVRP I	44	W032-35-1	Panama	48
SJVRP I	44	W032-37-1	Panama	48
SJVRP I	44	W032-38-1	Panama	48
SJVRP I	44	W032-40-1	Panama	48
SJVRP I	43A	W033-14-1	Panama	48
SJVRP I	43A	W033-19-1	Rubislaw	1575
SJVRP I	43A	W033-20-1	IV 38:gz51:-	9490
SJVRP I	43A	W033-27-1	IV 38:gz51:-	9490
SJVRP I	43A	W033-40-1	Panama	48
SJVRP I	43	W034-14-1	Newport	2370
SJVRP I	43	W034-19-1	Typhimurium	19
SJVRP I	43	W034-20-1	Typhimurium	19
SJVRP I	43	W034-27-1	Typhimurium	19
SJVRP I	43	W034-31-1	Infantis	1032
SJVRP I	43A	W035-17-1	Oranienburg	23
SJVRP I	43A	W035-21-1	Panama	48

Rota	Ponto	Amostra	Sorovares	STs
SJVRP I	43A	W035-33-1	Carrau	226
SJVRP I	8A	W036-14-1	Panama	48
SJVRP I	8A	W036-17-1	Panama	48
SJVRP I	8A	W036-18-1	Panama	48
SJVRP I	8A	W036-27-1	Santiago or Belem	9484
SJVRP I	8A	W036-28-1	IV 16:z4z32:-	9491
SJVRP I	10	W037-26-1	Braenderup	22
SJVRP I	10	W037-27-1	Braenderup	22
SJVRP I	10	W037-31-1	Braenderup	22
SJVRP I	10	W037-35-1	Braenderup	22
SJVRP I	10A	W038-12-1	Panama	48
SJVRP I	10A	W038-13-1	IV 43:z4z24:-	9482
SJVRP I	40A	W038-15-1	Panama	48
SJVRP I	10A	W038-23-1	Typhimurium	19
SJVRP I	10A	W038-24-1	Santiago or Belem	9484
SJVRP I	10	W038-30-1	Carrau	226
SJVRP I	27B	W039-34-1	Mbandaka	413
SJVRP I	27B	W039-35-1	- 4:r:12	15
SJVRP I	27B	W039-42-1	Typhimurium	19
SJVRP I	27B	W039-48-1	Typhimurium	19
SJVRP I	25A	W040-23-1	Typhimurium	19
SJVRP I	25A	W040-24-1	Mbandaka	413
SJVRP I	25A	W040-26-1	Mbandaka	413
SJVRP I	25A	W040-35-1	Mbandaka	413
SJVRP I	25A	W040-40-1	Typhimurium	19
SJVRP I	22	W041-25-1	Typhimurium	19
SJVRP I	22	W041-26-1	Typhimurium	19
SJVRP I	22	W041-27-1	Braenderup	22
SJVRP I	22	W041-31-1	Braenderup	22
SJVRP I	22	W041-34-1	Typhimurium	19
SJVRP I	22	W041-41-1	Typhimurium	19
SJVRP I	21	W042-26-1	Braenderup	22
SJVRP I	21A	W043-25-1	IV 43:z4z24:-	9482
SJVRP I	21B	W044-22-1	Newport	2370
SJVRP I	21B	W044-32-1	I 4[5]12:i:-	19
SJVRP I	21B	W044-33-1	I 4[5]12:i:-	19
SJVRP I	21B	W044-34-1	Newport	2370
SJVRP I	21C	W045-23-1	Sandiego	126
SJVRP I	21C	W045-29-1	Sandiego	126
SJVRP I	21C	W045-30-1	Sandiego	126
SJVRP I	21C	W045-31-1	Sandiego	126
SJVRP I	21C	W045-34-1	Sandiego	126

Rota	Ponto	Amostra	Sorovares	STs
SJVRP I	21C	W045-40-1	Newport	2370
SJVRP I	21C	W045-41-1	Sandiego	126
SJVRP I	21X	W046-10-1	Newport	2370
SJVRP I	21X	W046-11-1	Sandiego	126
SJVRP I	21X	W046-17-1	Newport	2370
SJVRP I	21X	W046-29-1	Newport	2370
SJVRP I	21X	W046-31-1	Newport	2370
SJVRP I	21X	W046-8-1	Newport	2370
SJVRP I	21D	W047-15-1	Newport	2370
SJVRP I	21D	W047-23-1	Typhimurium	19
SJVRP I	21D	W047-24-1	Carrau	226
SJVRP I	21D	W047-25-1	IV 43:z4z24:-	9482
SJVRP I	21D	W047-28-1	I 4[5]12:i:-	19
SJVRP I	21D	W047-30-2	I 4[5]12:i:-	19
SJVRP I	29	W048-19-1	Miami	140
SJVRP I	29	W048-22-1	Miami	140
SJVRP I	31	W050-14-1	IIIb 50:r:z	2374
SJVRP I	31	W050-15-1	IIIb 50:r:z	2374
SJVRP I	31A	W051-16-1	Newport	2370
SJVRP I	31A	W051-24-1	Newport	2370
SJVRP I	31A	W051-30-1	Newport	2370
SJVRP I	31B	W052-13-1	IV 43:z4z24:-	9483
SJVRP I	31B	W052-14-1	IV 43:z4z24:-	9483
SJVRP I	31B	W052-19-1	IV 43:z4z24:-	9483
SJVRP I	31B	W052-28-1	IV 43:z4z24:-	9483
SJVRP I	31B	W052-29-1	IV 43:z4z24:-	9483
Vassouras I	1R	W053-23-1	Typhimurium	19
Vassouras I	2R	W054-10-1	Saphra	1604
Vassouras I	2R	W054-16-1	Saphra	1604
Vassouras I	2R	W054-21-1	Saphra	1604
Vassouras I	2R	W054-22-1	Saphra	1604
Vassouras I	2R	W054-25-1	Saphra	1604
Vassouras I	5R	W057-31-1	Sandiego	20
Vassouras I	5R	W057-40-1	Saphra	1604
Vassouras I	6R	W058-26-1	IV 21:z4z23:-	9485
Vassouras I	6R	W058-27-1	IV 21:z4z23:-	9485
Vassouras I	6R	W058-29-2	IIIb 38:(k):z35	4340
Vassouras I	7R	W059-21-2	IIIb 38:(k):z35	4340
Vassouras I	7R	W059-25-1	Santiago or Belem	9484
Vassouras I	8R	W060-23-1	Santiago or Belem	9484
Vassouras I	8R	W060-28-1	Santiago or Belem	9484
Vassouras I	8R	W060-33-1	Santiago or Belem	9484

Rota	Ponto	Amostra	Sorovares	STs
Vassouras I	9R	W061-21-1	Carrau	226
Vassouras I	9R	W061-22-1	Carrau	226
Vassouras I	9R	W061-31-1	Carrau	226
Vassouras I	9R	W061-34-1	Carrau	226
Vassouras I	11R	W063-34-1	Abaetetuba	2041
Vassouras I	12R	W064-22-1	Panama	48
Vassouras I	12R	W064-23-1	Typhimurium	19
Vassouras I	13R	W065-24-1	Typhimurium	19
Vassouras I	13R	W065-31-1	Typhimurium	19
Vassouras I	13R	W065-37-1	Typhimurium	19
Vassouras I	13R	W065-38-1	Typhimurium	19
Vassouras I	16R	W068-19-1	Sandiego	126
Vassouras I	16R	W068-28-1	Sandiego	126
Vassouras I	16R	W068-29-1	IV 43:z4z24:-	9486
Vassouras I	16R	W068-35-1	IV 43:z4z24:-	9486
Vassouras I	18R	W070-19-1	Carrau	226
Vassouras I	18R	W070-31-1	Carrau	226
Vassouras I	19R	W071-19-1	Santiago or Belem	9484
Vassouras I	19R	W071-20-1	Santiago or Belem	9484
Vassouras I	19R	W071-21-1	Typhimurium	19
Vassouras I	19R	W071-26-1	Sandiego	20
Vassouras I	19R	W071-29-2	Sandiego	20