

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

VINICIUS DE CARVALHO MOURA

SALMONELLA SP. EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DE REGIÕES AGROPECUÁRIAS
DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO: OCORRÊNCIA, IDENTIDADE, VIRULÊNCIA
E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

RIO DE JANEIRO
2025



VINICIUS DE CARVALHO MOURA

SALMONELLA SP. EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DE REGIÕES AGROPECUÁRIAS
DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO: OCORRÊNCIA, IDENTIDADE, VIRULÊNCIA
E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
(Microbiologia), Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Raquel Regina Bonelli

RIO DE JANEIRO
2025

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

d278s de Carvalho Moura, Vinicius
Salmonella sp. em águas superficiais de regiões agropecuárias do Estado do Rio de Janeiro: ocorrência, identidade, virulência e resistência a antimicrobianos / Vinicius de Carvalho Moura. -- Rio de Janeiro, 2025.
146 f.

Orientadora: Raquel Regina Bonelli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), 2025.

1. Salmonella. 2. Águas superficiais. 3. Agropecuária. 4. Sequenciamento de genoma completo. 5. Elementos Genéticos Móveis. I. Bonelli, Raquel Regina, orient. II. 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.

ATA DA DEFESA



UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia)

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS (MICROBIOLOGIA) PARA A CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA)

REALIZADA EM: 31 de março de 2025

CANDIDATO(A): VINICIUS DE CARVALHO MOURA

BANCA EXAMINADORA: Prof. Dr. Marco Antônio Lemos Miguel (Presidente)
 Prof.ª Dr.ª Juliana Pfrimer Falcão (Membro Externo)
 Prof.ª Dr.ª Alice Gonçalves Martins Gonzalez (Titular externo)
 Prof.ª Dr.ª Agnes Marie Sa Figueiredo (Titular/Revisor)

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Salmonella Sp. Em águas superficiais de regiões agropecuárias do Estado do Rio de Janeiro: Ocorrência, identidade, virulência e resistência a antimicrobianos"

LOCAL: Anfiteatro do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

HORA DE INÍCIO: 09:00 horas

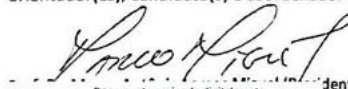
Em sessão pública, após a exposição oral do conteúdo referente ao trabalho de dissertação de Mestrado, o(a) candidato(a) foi arguido pelos membros da Banca. Após deliberação, a banca avaliadora resolve:

(X) aprovar.

() aprovar, condicionado à(s) exigência(s) formulada(s) pela Banca*** (Resolução CEPG Nº 1 de 01/12/2006, Artigo 57, Parágrafo 3º)

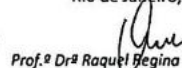
() reprov.

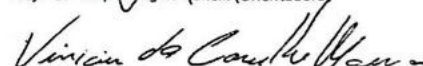
Na forma regulamentar, foi lavrada a presente Ata que é assinada pelos membros da Banca, orientador(es), candidato(a) e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia).


 Documento assinado digitalmente
 gov.br JULIANA PFRIMER FALCAO
 Data: 02/04/2025 10:06:26-0300
 Verifique em https://validar.jo.gov.br

Prof.ª Dr.ª Juliana Pfrimer Falcão (Titular externo)

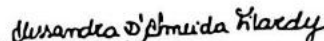
Rio de Janeiro, 31 de março de 2025.


 Prof.ª Dr.ª Raquel Regina Bonelli (Orientadora)


 Candidato(a): Vinicius de Carvalho Moura


 Prof.ª Dr.ª Alice Gonçalves Martins Gonzalez (Titular externo)


 Prof.ª Dr.ª Agnes Marie As Figueiredo (Titular/Revisor)


 Coordenadora do PPG-MICRO:
 Profa. Dra. Alessandra D'Almeida Filardy

*** A(s) exigência(s) foi(foram) cumprida(s) e aprovada(s) pelo Presidente da Banca em ____/____/____.

_____(assinatura do presidente).

Av. Carlos Chagas Filho 373, Cidade Universitária, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Centro de Ciências da Saúde, Bloco L, Cidade Universitária, Sala L-11-012. Tel. 55 (21) 3938-6734, posgrad@micro.uff.br

AGRADECIMENTOS

À minha família, mãe, avó e Half Eugênio, meu cachorro. Por sempre estarem presentes na minha vida, seja nos momentos bons e nos momentos ruins. Sem vocês eu não seria o que eu sou hoje. Muito obrigado por todo o amor, carinho, apoio e valores que vocês me deram ao longo desses 23 anos. Hoje eu sou uma pessoa compromissada, respeitosa, educada e carinhosa graças a tudo o que me passaram. Eu amo vocês.

À minha madrinha, Vanessa, que ajudou a mim e a minha família em momentos difíceis e que sempre esteve presente para a minha mãe. Sempre fez bem a ela, que, por consequência, me fez bem também. É uma verdadeira amiga, que eu fico feliz em ter em minha vida.

Às minhas melhores amigas, Carolina, Isabella e Thaís, que estão comigo desde 2016. Vocês fizeram parte de momentos cruciais no meu desenvolvimento como indivíduo adulto e com certeza eu tenho um pouco de vocês em mim. Muito obrigado por serem quem vocês são.

À Raquel, minha orientadora. Pessoa que me instruiu e espero me guie por mais tempo nesse caminho árduo e pouco reconhecido da vida acadêmica. Você depositou em mim fé e confiança, que foram substanciais para a minha autoestima como estudante de graduação e mestrado. Você dedicou o seu tempo e paciência ao meu desenvolvimento e eu espero fazer valer a pena. Quero que sinta orgulho do aluno que você moldou.

Ao Dennys, que foi meu professor no laboratório de iniciação científica. Quase tudo o que eu aprendi no laboratório foi o Dennys quem me ensinou. Sou muito grato por todos os conselhos, puxões de orelha e por tornar o ambiente de trabalho mais amigável.

À Gabi, que me introduziu no mundo da bioinformática, me ajudando quando podia e me orientando como olhar para a bioinformática com olhos mais treinados.

Aos demais membros da equipe do projeto JIFSAN (Ingrid, Marquinho, Luca, Bia, Luiza, Letícia, Esther, Arthur e Ana Paula), que ajudaram na coleta e processamento das amostras abordadas nesse estudo.

Às minhas amigas e amigos Clarisse, Jessica, Vitória, Luca e Roberto por tornarem o meu dia a dia no LImm mais leve.

Ao Vitor, que me ajudou, acalmou e orientou sobre algumas análises de bioinformática.

Ao JIFSAN, pela proposta de projeto e financiamento que viabilizou esse trabalho.

À agência CAPES, por financiar a minha bolsa de mestrado.

Ao Instituto de Microbiologia, por ter sido um local de aprendizado e networking.

*‘no umbral me despojo da indumentária cotidiana, suja e
embarrada, e me ponho em roupas régias e curiais, e,
vestido assim dignamente, entro nas antigas cortes dos
homens antigos, onde, queridamente acolhido, me alimento
dessa comida que ‘solum’ me pertence e para qual nasci...’*

*Referência à “Carta a Francesco Vettori”, de Nicolau Maquiavel,
por Federico Chabod em “Escritos sobre Maquiavelo”*

PRESS-RELEASE

Salmonella é um microrganismo que pode causar infecções alimentares, resultando em casos isolados ou até grandes surtos, geralmente associadas ao consumo de alimentos crus ou malcozidos e de água contaminada. Muitas vezes, essa bactéria é encontrada em ambientes onde há criação intensiva de animais, ou lavouras que utilizam dejetos de animais como fertilizantes, podendo assim contaminar as águas que circulam nesses locais. Para compreender melhor como é essa situação em regiões que produzem leite, frangos, legumes e verduras no Estado do Rio de Janeiro, uma equipe de pesquisadores da UFRJ coletou amostras de água em locais próximos a granjas, pastos e plantações em duas bacias hidrográficas do estado, e caracterizou as *Salmonellas* isoladas.

As análises evidenciaram a ocorrência de diferentes tipos de *Salmonella* nessas águas, incluindo linhagens mais associadas a animais silvestres, que normalmente não causam infecções em humanos, e linhagens com reconhecido potencial patogênico, já descritas em surtos de gastroenterite e, em casos mais graves, como causadoras de infecções na corrente sanguínea. O estudo também revelou que algumas amostras de *Salmonella* apresentavam resistência a vários antibióticos, indicando a circulação de genes de resistência fora dos hospitais e alertando para a emergência de infecções por *Salmonella* mais difíceis de tratar. Muitos desses genes estavam em elementos genéticos móveis, o que permite sua transferência entre bactérias de diferentes linhagens e espécies, agravando o problema da resistência antimicrobiana.

As descobertas deste estudo são cruciais sob o ponto de vista da saúde humana, ambiental e animal, pois destacam que águas em áreas agropecuárias podem representar uma fonte de exposição a linhagens de *Salmonella* patogênicas. Essa contaminação representa um risco para a saúde das pessoas que consomem água ou alimentos irrigados com água contaminada, caso não sejam adotados procedimentos adequados, como a cloração. Além disso, é fundamental cuidar da água utilizadas nas criações de animais e tratar adequadamente os resíduos gerados nestas atividades, incentivando a implementação de práticas que reduzam a contaminação ambiental com bactérias de origem fecal. Tais medidas não apenas impactam a qualidade e os aspectos econômicos da produção, com também protegem a saúde das comunidades locais e dos consumidores dos alimentos ali produzidos.

RESUMO

MOURA, Vinicius de Carvalho. *Salmonella* sp. Em Águas Superficiais de Regiões Agropecuárias do Estado do Rio de Janeiro: Ocorrência, Identidade, Virulência e Resistência a Antimicrobianos. Rio de Janeiro, 2025. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Salmonella sp. é um gênero bacteriano da família *Enterobacteriaceae*, composto por duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo esta última de maior relevância clínica e econômica devido à sua subespécie *S. enterica* subsp. *enterica* (I), responsável por infecções em animais de sangue quente, como humanos, bovinos e aves. Esse patógeno desempenha um papel central no contexto das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHAs), impactando a saúde humana, animal e ambiental. Sua associação com hospedeiros como gado e frangos de corte torna as regiões de produção agropecuária possíveis epicentros de disseminação, seja por fontes hídricas ou produtos alimentícios. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de *Salmonella* em corpos d'água de regiões agropecuárias do Estado do Rio de Janeiro, abrangendo áreas impactadas pela criação de bovinos, aves de corte e olericultura. Além disso, o estudo visou caracterizar aspectos dos isolados, como sorovares, viruloma, resistoma e plasmidoma. Foram analisadas 313 amostras de águas coletadas de rios, riachos e córregos das bacias hidrográficas do Médio Paraíba do Sul (MPS; marcada pela criação de bovinos e com atividade de olericultura) e Piabanha (Pb, com intensa olericultura e criação de frangos de corte). De 181 (58%) destas amostras, foi possível isolar *Salmonella*. Após isolamento, a triagem foi realizada por RAPD e sequenciamento de até cinco isolados por amostra de água. Com base nas análises de bioinformática, foram selecionados 308 isolados como representativos da coleção, considerando aqueles não clonais dentro de cada amostra de água. Entre os isolados, foram identificados 46 sorovares, com destaque para Panama (44/308), Newport (43/308), Typhimurium (27/308) e Saphra (23/308), sendo os três primeiros presentes em ambas as bacias e o último exclusivo da MPS. Foram detectados 146 genes de virulência, com operons como *spv*, *pef*, *rck* e *yopJ/yopP* associados a plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncF, comumente ligados a genes de virulência invasivos. Além disso, foram identificados mecanismos de resistência a β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, fenicóis, quinolonas, sulfonamida-trimetoprim em genes cromossômicos (mutações em *gyrA* e *ramR*), e em *contigs* associadas a marcadores plasmidiais como Col440I (contendo *qnrB19*), ColRNAI (*aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *sul2* e *tet(A)*), IncC/A2 (*sul2* e *tet(A)*), IncFIC (*floR* e *tet(A)*), IncR e IncX (*bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-135}* e *tet(A)*), além de genes *bla_{CMY-2}*, *aadA1*, *aadA2*, *tet(B)*, *tet(C)*, *qnrS1* e *dfrA* em plasmídeos sem grupo Inc definido. O gene *fosA7* (fosfomicina) foi encontrado no genoma de todos os isolados de Saphra. Os resultados deste estudo fornecem insights inéditos sobre a filogenia, virulência, resistência e plasmidoma de *Salmonella* em corpos d'água de regiões agrícolas do Rio de Janeiro, contribuindo para a compreensão da disseminação e adaptação desse patógeno nesta região.

Palavras-chave: *Salmonella*, águas superficiais, agropecuária, sequenciamento de genoma completo, viruloma, resistoma, plasmidoma

ABSTRACT

MOURA, Vinicius de Carvalho. *Salmonella* sp. in Surface Waters of Agricultural Regions in the State of Rio de Janeiro: Occurrence, Identity, Virulence, and Antimicrobial Resistance. Rio de Janeiro, 2025. Dissertation (Master's in Biological Sciences – Microbiology), Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Salmonella sp. is a bacterial genus of the *Enterobacteriaceae* family, composed of two species: *S. bongori* and *S. enterica*, the latter being of greater clinical and economic relevance due to its subspecies *S. enterica* subsp. *enterica* (I), which is responsible for causing infections in warm-blooded animals such as humans, cattle, and poultry. This pathogen plays a central role in the context of Waterborne and Foodborne Diseases (WFDs), impacting human, animal, and environmental health. Its association with hosts such as cattle and broiler chickens makes agricultural production regions potential epicenters of dissemination, either through water sources or food products. In this context, the aim of this study was to investigate the occurrence of *Salmonella* in water bodies in agricultural regions of the State of Rio de Janeiro, focusing on area impacted by cattle farming, broiler chicken production, and horticulture, as well as to characterize aspects of the isolates, such as serovars, virulome, resistome, and plasmidome. A total of 313 water samples were collected from rivers, streams, and creeks within the hydrographic basins of Médio Paraíba do Sul (MPS; marked by cattle farming and horticulture) and Piabanha (Pb; with intense horticulture and broiler chicken farming). From 181 (58%) of these samples, *Salmonella* was successfully isolated. After isolation, screening by RAPD, sequencing of up to five isolates per water sample, and bioinformatics analyses, 308 isolates were selected as representatives of the collection (all those that were determined to be non-clonal within each evaluated water sample). Among them, 46 serovars were identified, with emphasis on Panama (44/308), Newport (43/308), Typhimurium (27/308), and Saphra (23/308), with the first three serovars present in both basins and the last one exclusive to MPS. A total of 146 virulence genes were detected, including operons such as *spv*, *pef*, *rck*, and *yopJ/yopP*, which were associated with plasmids of the incompatibility group IncF, commonly linked to invasive virulence genes. Additionally, resistance mechanisms to β -lactams, aminoglycosides, tetracyclines, phenicols, quinolones, sulfonamide-trimethoprim were identified in chromosomal genes (mutations in *gyrA* and *ramR*) and in contigs associated with plasmid markers such as Col440I (containing *qnrB19*), ColRNAI (*aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *sul2*, and *tet(A)*), IncC/A2 (*sul2* and *tet(A)*), IncFIC (*floR* and *tet(A)*), IncR, and IncX (*bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-135}*, and *tet(A)*), as well as genes *bla_{CMY-2}*, *aadA1*, *aadA2*, *tet(B)*, *tet(C)*, *qnrS1*, and *dfrA* in plasmids without a defined Inc group. The *fosA7* gene (fosfomycin) was found in the genome of all Saphra isolates. The results of this study provide unique insights into the phylogeny, virulence, resistance, and plasmidome of *Salmonella* in water bodies of agricultural regions in Rio de Janeiro, contributing to a better understanding of the dissemination and adaptation of this pathogen in this region.

Keywords: *Salmonella*, surface waters, agriculture, whole genome sequencing, virulome, resistome, plasmidome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da classificação do gênero <i>Salmonella</i>	6
Figura 2 – Comparação de estruturas celulares entre <i>S. Typhi</i> e <i>S. Enteritidis</i>	7
Figura 3 – Mecanismos moleculares de resistência a antimicrobianos.	23
Figura 4 – Áreas de amostragem no estado do Rio de Janeiro.	42
Figura 5 – Rota I e II para coleta de água impactada por atividade agropecuária na bacia hidrográfica do Médio Paraíba do Sul (MPS).	43
Figura 6 – Rotas I e II para coleta de água impactada por atividade agropecuária na bacia hidrográfica do Piabanha (Pb).	43
Figura 7 – Equipamentos utilizados na coleta de amostras de água para pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	45
Figura 8 – Fluxograma da metodologia de bioinformática adotada neste estudo.	51
Figura 9 – Heatmap de caracterização dos pontos de coleta de acordo com o impacto de Atividades Econômicas (AE) e Níveis de Urbanização (NU).	58
Figura 10 – Análise de ocorrência de <i>Salmonella</i> em amostras de águas superficiais (rios, riachos e córregos) em áreas próximas a propriedades agropecuárias nas bacias hidrográficas do Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb) do Rio de Janeiro.	58
Figura 11 – Distribuição de amostras de água de acordo com as Atividades Econômicas (AE) e Níveis de Urbanização (NU).	60
Figura 12 – Análise de associação entre a ocorrência de <i>Salmonella</i> sp. e o impacto das atividades econômicas (AE) e Níveis de Urbanização (NU).	61
Figura 13 – Diagrama que ilustra, em valores numéricos, a representatividade da obtenção de isolados selecionada para o estudo.	63
Figura 14 – Ocorrência de sorovares nas bacias hidrográficas Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb).	64
Figura 15 – Análise de correspondência (CA) entre sorovares com as diferentes atividades econômicas (AE).	66
Figura 16 – Análise de correspondência (CA) entre sorovares com as diferentes Níveis de Urbanização (NUs).	67
Figura 17 – Ocorrência de grupos Inc e prevalência de sequências plasmidiais nas bacias hidrográficas do Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb).	71
Figura 18 – Heatmap da ocorrência de genes de virulência que variam entre os sorovares.	75
Figura 19 – Clusterização de sorovares com base nos genes de virulência, por análise de redes.	76
Figura 20 – Heatmap de ocorrência de genes de resistência aos antimicrobianos em cada sorovar.	78
Figura 21 – Árvore filogenética de SNPs de core genes integrada a metadados.	85

Figura 22 – Árvore filogenética de SNPs de genoma completo de isolados de <i>Salmonella</i> Saphra.	86
---	----

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Legislação que no Brasil limitou o uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho na produção animal	28
Quadro 2 – <i>Primers</i> referentes à amplificação randômica de sequências genômicas para diferenciação de linhagens de <i>Salmonella</i> por (Madico <i>et al.</i> , 1995).....	48
Tabela 1 – Associação entre grupos Inc carreadores de genes de resistência aos antimicrobianos e diferentes microrganismos	34
Tabela 2 – Ocorrência do Sequence Type (ST) de cada sorovar nas bacias hidrográficas do Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (PB).....	68
Tabela 3 – Ocorrência de grupos Inc nos sorovares identificados neste estudo	72
Tabela 4 – Genes de resistência associados a sequências plasmidiais com grupo Inc e sorovares em que foram detectados*.....	79
Tabela 5 – Genes de resistência aos antimicrobianos nos isolados caracterizados	79
Tabela 6 – Associação da ocorrência de mecanismos de resistência com as diferentes atividades econômicas associadas às amostras de água coletadas	82

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
cgSNPs	do inglês “core genes Single Nucleotide Polymorphisms”
cgMLST	do inglês “core genoma Multi Locus Sequence Typing”
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
hilD:	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> ”
Inv:	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
MPS:	Bacia Hidrográfica do Médio Paraíba do Sul
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
Pb:	Bacia Hidrográfica do Piauí
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 “ribossomal 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”
Pb:	Piabanha
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</i> Shigella
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:	tetrionato
USA:	do inglês “United States of America”
VFDB:	do inglês “Virulence Factors Database”
WGS:	do inglês “Whole genome sequencing”
wgSNPs:	do inglês “Whole genome Single Nucleotide Polymorphisms”
wgMLST:	do inglês “Whole genome Multi Locus Sequence Type”
XLT4:	Xilose-Lisina-Tergitol-4

ÍNDICE

PRESS-RELEASE.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
ÍNDICE.....	xv
 1 Introdução	 1
1.1 Características do microrganismo e sua relevância para a saúde e a economia.....	1
1.1.1 Taxonomia e a classificação por sorovares	4
1.1.2 Classificação de <i>Salmonella</i> conforme hospedeiros e patogenicidade ...	8
1.2 Aspectos epidemiológicos e manifestações clínicas.....	10
1.3 Tipificação molecular	12
1.3.1 Epidemiologia molecular de <i>Salmonella</i> sp.....	13
1.4 Patogenia e genes de virulência em <i>Salmonella</i>	15
1.4.1 Adesão.....	16
1.4.2 Invasão	18
1.4.3 Disseminação e persistência.....	19
1.4.4 <i>Salmonella</i> Pathogenicity Islands (SPIs)	20
1.5 Fármacos antimicrobianos e respectivos mecanismos de resistência	22
1.5.1 β -lactâmicos	23
1.5.2 Sulfonamidas.....	24
1.5.3 Aminoglicosídeos.....	24
1.5.4 Tetraciclina	25
1.5.5 Macrolídeos.....	25
1.5.6 Fenicolis	26
1.5.7 Quinolonas	26
1.6 Emergência e impacto da resistência aos antimicrobianos.....	26
1.6.1 Resistência em <i>Salmonella</i> sp.....	27
1.7 Transferência horizontal de genes no contexto evolutivo	30
1.7.1 Elementos genéticos móveis	32
1.7.2 Elementos genéticos móveis em <i>Salmonella</i> sp.....	36
 2 Justificativa e Contextualização	 39
 3 Objetivos.....	 41
3.1 Objetivos Gerais	41

3.2	Objetivos Específicos.....	41
4	Metodologia.....	42
4.1	Coleta de amostras de água: pontos de amostragem e técnica utilizada...	42
4.2	Caracterização dos pontos de coleta	45
4.3	Recuperação e isolamento de <i>Salmonella</i>	46
4.4	Identificação bacteriana por MALDI-TOF	47
4.5	Diferenciação de linhagens por RAPD	48
4.6	Preparo das amostras para sequenciamento e acesso às sequências	49
4.7	Montagem e análises genômicas.....	49
4.7.1	Curadoria de Qualidade	49
4.7.2	Montagem dos genomas.....	52
4.7.3	Identificação de sorovares <i>in silico</i>	52
4.7.4	Exclusão de clones	52
4.7.5	Identificação de genes de virulência	53
4.7.6	Identificação de mecanismos de resistência à antimicrobianos	53
4.7.7	Identificação de sequências plasmidiais e genes de virulência e resistência associados.....	54
4.7.8	Análise filogenética.....	54
4.8	Avaliação de associação da ocorrência de sorovares, genes de resistência e plasmídeos com bacias hidrográficas e atividade econômica das regiões .	56
5	Resultados.....	57
5.1	Caracterização dos pontos de coleta	57
5.2	Obtenção de espécimes de água	57
5.3	Montagem da coleção de estudo.....	62
5.4	Identificação dos isolados	63
5.5	Ocorrência de sorovares associada à bacia hidrográfica.....	64
5.6	Sequence-Types de <i>Salmonella</i> sp. em MPS e Pb	68
5.7	Caracterização de grupos Inc plasmidiais identificados nos genomas dos isolados	70
5.8	Caracterização molecular de genes de virulência.....	71
5.9	Caracterização molecular de genes de resistência a antimicrobianos.....	76
5.10	Filogenia por Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)	82
6	Discussão.....	87
7	Conclusão	101
8	Referências:	103
9	Anexos.....	127

1 INTRODUÇÃO

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

O primeiro isolamento de *Salmonella*, na ocasião ainda descritos como “espécimes microscópicos bacilares” associados à febre tifóide, foi feito por Karl Eberth em 1880. Posteriormente, o microrganismo foi cultivado por Gaffky, a partir de amostras clínicas de pacientes com febre tifoide, em meados de 1884, sendo, tempos depois, identificado o gênero bacteriano *Salmonella* 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 com Theobald Smith (Eberth, 1880; Eng *et al.*, 2015; Ibrahim e Morin, 2018; Jajere, 2019).

O gênero *Salmonella* compreende microrganismos com morfologia de bastonetes curtos, móveis, ou em poucos casos imóveis, com flagelos peritríquios. São Gram-negativos e anaeróbios facultativos, e pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Geralmente 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 e produtores de H₂S. Entretanto, as subespécies e sorovares de *Salmonella* podem apresentar variações por perfis bioquímicos, como por exemplo, a subespécie *diarizonae* que é fermentadora de lactose e o sorovar *Choleraesuis* que não é produtor de H₂S (Grimont e Weill, 2007; Trabulsi, 2015).

A salmonelose é considerada umas das infecções do trato gastrointestinal mais comuns em humanos e algumas espécies de animais, sendo usualmente associada ao consumo de produtos alimentícios contaminados crus ou malcozidos, 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 são mais susceptíveis a quadros graves quando infectados por *Salmonella* do que a média da população (Matsuoka *et al.*, 2004; Mezal *et al.*, 2014).

Estima-se que ocorram cerca de 1,3 bilhão de casos de salmonelose no mundo por ano. Dados de um estudo retrospectivo, revelam que de 2009 à 2018, de mais de 152 mil pacientes com diarreia aguda na China, *Salmonella* foi o segundo patógeno mais associado ao quadro infeccioso, após *Escherichia coli* diarreiogênica (Chimalizeni, Kawaza, & Molyneux, 2010; L.-P. Wang *et al.*, 2021; Zining Wang *et al.*, 2024). Devido às hospitalizações e enfermidades causadas pelo microrganismo, o mercado de produtos agropecuários também é impactado, afetando sobretudo países com perfil econômico pautado na exportação desses produtos (Singh *et al.*, 2013; Eng *et al.*, 2015 Vilela *et al.*, 2020). De 2000 a 2008 nos Estados Unidos da América (EUA), foi estimado que, de 1 milhão de casos de infecções de origem alimentar, 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, cerca de 10 anos depois, para 1,35 milhão 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 estudos apontam que 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*). (de Jong *et al.*, 2012; Ao *et al.*, 2015; 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 manifestações clínicas mais graves, decorrentes da fragilidade de pacientes nos extremos de idade e do debilitado estado de saúde de pacientes sem acesso a tratamentos adequados para doenças imunodepressoras (Post *et al.*, 2019).

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 a presença de *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 o de exportação (dos Santos Bersot *et al.*, 2019; Alikhan *et al.*, 2022). A este respeito, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), apresentou em 2003 a Instrução Normativa Nº 78 que traz como anexo o documento “Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como Livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium” (MAPA, 2003). Estes sorovares são comumente associados a aves, ovos e produtos derivados. Portanto, a medida visa evitar sua disseminação pela rota alimentar (Voss-Rech *et al.*, 2015). Vale ressaltar que em 2020 o Brasil ganhou destaque por se tornar o país com o maior volume de exportação de carne de aves no mundo (EMBRAPA, 2021). Dados de 2023 apontaram um total de 5,1 milhões de toneladas, representando 37,9% das exportações que circulam no mercado global. Neste mesmo ano o país teve o segundo maior rebanho de galináceos do planeta, tendo registro de abate de 5,296 bilhões de animais, apenas considerando os vinculados ao selo de inspeção federal (SIF) (ABPA, 2024).

Mesmo sendo alvo de controle pela indústria de produção de alimentos, *Salmonella* ainda é muito importante no contexto das DTHAs no Brasil. Dados de 2018 relatam que o gênero *Salmonella* representava 35% dos agentes associados a DTHAs identificados 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 atenção às boas práticas na produção de alimentos (Ehuwa, Jaiswal, & Jaiswal, 2021). 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), consequentemente aumentando a exposição da comunidade a possíveis infecções por *Salmonella* através de rotas que normalmente não deveriam estar contaminadas com este 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)

1.1.1 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, como os sorovares Typhisuis e Abortusovis, que causam “tifo” em suíno e abortos em ovelhas, respectivamente (Langenegger & Langenegger, 1975; Colombo, Leori, Rubino, Barbato, & Cappuccinelli, 1992). 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, que foi bem aceita no mundo científico e forneceu as bases para o esquema classificatório Kauffmann-White usado até hoje (Grimont & Weill, 2007; BRASIL, 2011)

No entanto, na década de 1960, Kauffmann propôs que cada sorovar identificado fosse considerado uma nova espécie, o que teria resultado, atualmente, em mais de 2.500 espécies de *Salmonella*. Na ocasião, tal proposta foi refutada por Crosa e colaboradores, que por técnicas de hibridização de DNA-DNA, constataram uma grande similaridade genômica de muitos sorovares, onde a única exceção era a subespécie V, *S. enterica* subsp. *bongori* (Crosa *et al.*, 1973). Esta e outras análises complementares fizeram com que, cerca de 20 anos depois, *S. enterica* subsp. *bongori* fosse reclassificada como uma espécie, *S. bongori* (Reeves *et al.* 1989; Brenner, Villar, & Angulo, 2000; Ryan, O'Dwyer, & Adley, 2017)

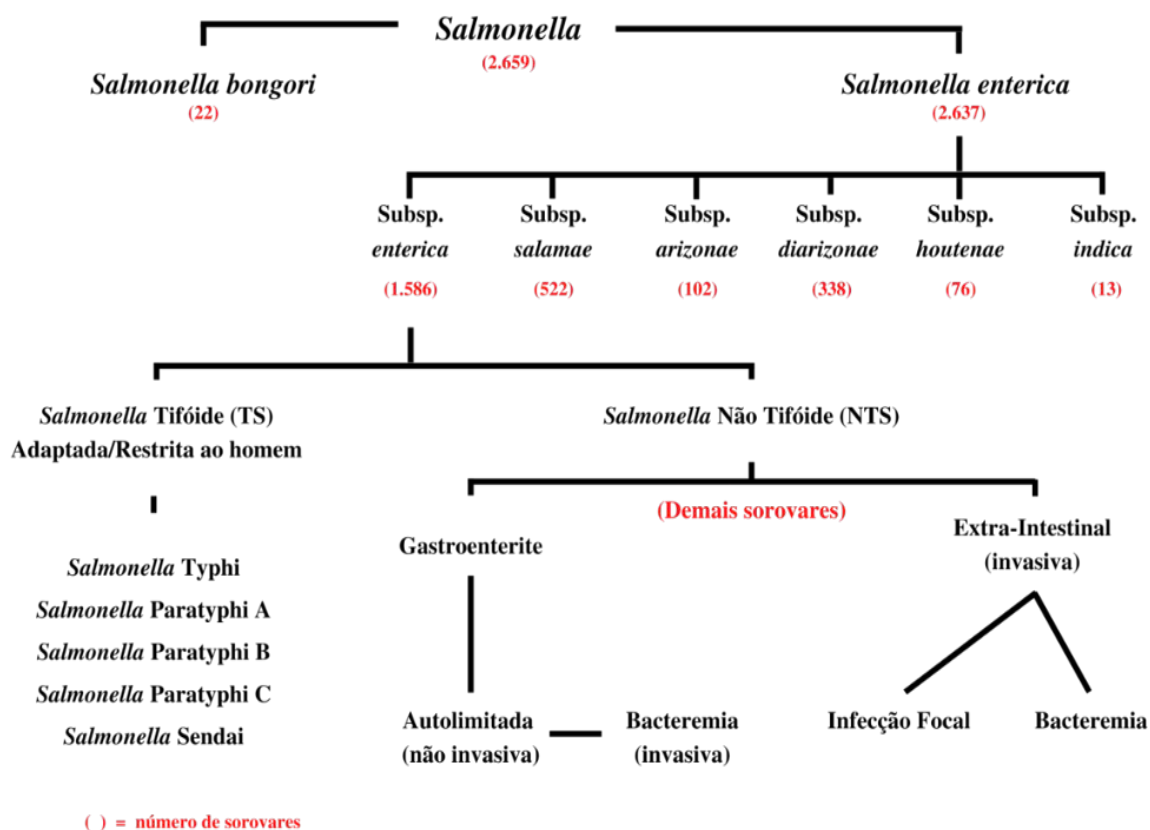
Desde seu desenvolvimento, o esquema de Kauffmann-White, ainda que mantenha a racional da classificação, vem sofrendo atualizações em virtude do desenvolvimento de novas tecnologias e da facilidade de acesso às mesmas, o que tem afetado principalmente a diferenciação e identificação de sorovares. Com dados genômicos tornou-se possível a 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 entre diferentes bactérias,

contatou-se 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).

Salmonella enterica é costumeiramente associada a infecções em animais de sangue quente, ou endotérmicos, como humanos, porcos, bois e aves; enquanto *Salmonella bongori* está, usualmente, associada a animais de sangue frio, ectotérmicos, como insetos e alguns vertebrados (répteis e peixes). É importante citar que tal associação pode ser imprecisa, uma vez que *S. bongori* pode eventualmente causar infecções em humanos (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* (Lan *et al.*, 2009; Chattaway *et al.*, 2021). 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* subsp. *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.

A partir da identificação das subespécies e do conhecimento de diferentes quadros clínicos, geolocalização e hospedeiros, a classificação de *Salmonella* avançou 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. No entanto, mais recentemente, métodos de biologia molecular, como sequenciamento de genoma completo (em inglês, *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 *Multi Locus Sequencing Typing* (MLST). Tal estratégia pode ser uma importante vantagem diante da tipificação trabalhosa e onerosa, que é a sorologia de *Salmonella* (Banerji *et al.*, 2020; Chattaway *et al.*, 2021).



*Imagem adaptada e atualizada do livro "Microbiologia Trabulsi - Alterthum" edição de 2015

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 de livro (Trabulsi, 2015), pelo autor com dados disponibilizados por (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014), na plataforma online <https://www.canva.com/>.

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). Os antígenos somáticos (O) associados à composição do LPS (lipopolissacarídeos presente na membrana externa de bactérias gram-negativas) são codificados por clusters de genes *rfb*. O antígeno flagelar (H), codificado pelos genes *fliC* e *fliB*, que codificam duas flagelina (H1e/ou H2), as quais sofrem o fenômeno de variação de fases, podendo a célula ser imóvel, por não apresentar nenhuma flagelina, ou expressar uma das duas, H1 ou H2. Tal variabilidade deve-se ao fato de que os genes *fliC* e *fliB* têm sua expressão regulada por uma invertase *hin* e pelo gene *fljA*, repressor de *fliC*. A *hin* é uma recombinase que pode levar a inversão do promotor dos genes *fliA* e *fliB*, e dependendo da posição do promotor, em relação a esses genes, tais genes poderão ser expressos ou não. O antígeno capsular (Vi), por sua vez, não é usual em todos 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 e contribuindo para a 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, 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, como Typhi, Paratyphi C e Dublin (Wain *et al.*, 2005; Banerji *et al.*, 2020). A **Figura 2** evidencia as principais estruturas de superfície em *Salmonella*, com destaque para os antígenos de identificação dos sorovares.

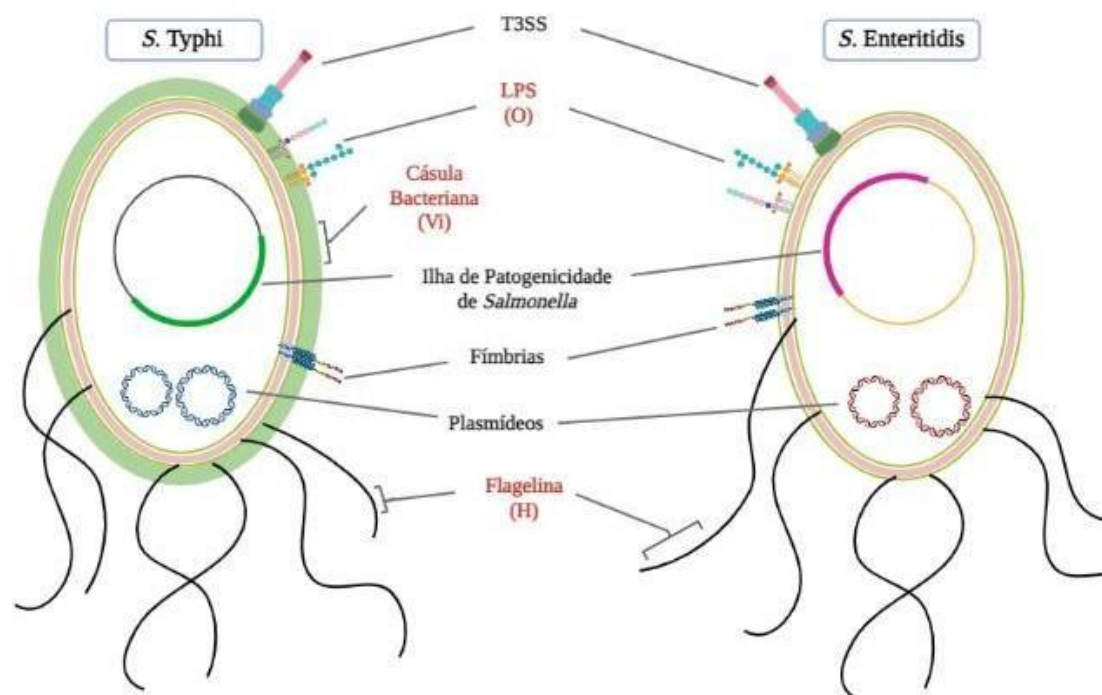


Figura 2 – Comparação de estruturas celulares entre *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Enteritidis. A célula da esquerda, *Salmonella* Typhi, apresenta todos os componentes celulares característicos do gênero *Salmonella*, em destaque o Lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa, representando o antígeno 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, *Salmonella* Enteritidis, apresenta os mesmos componentes, com exceção da cápsula bacteriana (Vi). Imagem adaptada de artigo (Jong *et al.*, 2012), pelo autor na plataforma online <https://www.canva.com/>.

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).

1.1.2 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 que 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 maior afinidade por hospedeiros específicos. Assim *S. Typhimurium* e *Salmonella Choleraesuis* são comumente associadas à porcos, *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* são comumente associadas à frangos, *Salmonella Typhi* são comumente disseminadas entre humanos, assim como *Salmonella Enteritidis*, que tem a sua disseminação associada ao consumo de frango e ovos malcozidos. Entretanto, vale salientar que os sorovares *Typhimurium* e *Enteritidis* são generalistas, causando infecções em diferentes hospedeiros (Hur *et al.*, 2011; de Jong *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2019).

Com relação à prevalência de diferentes sorovares em casos de salmonelose no Brasil, um estudo envolvendo 3.554 amostras isoladas de humanos no estado de São Paulo, entre 1996 e 2003, encontrou como sorovar mais prevalente *Salmonella 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 2.123 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 afinidade por hospedeiros específicos, alguns sorovares são capazes de causar infecções invasivas e, conseqüentemente, mais graves. Estirpes de *Salmonella*

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 *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis. À medida que esse repertório diminui, com a perda de função de genes “generalistas” e aquisição de genes de virulência mais específicos para um determinado hospedeiro, os sorovares passam a ser designados adaptados, e são capazes de causar infecções invasivas e mais letais em seus hospedeiros específicos, como Dublin em gado e Choleraesuis em suínos. Portanto, quando o repertório de genes de virulência se afunila mais para genes específicos, os sorovares passam a ser denominados restritos, como por exemplo Typhi em humanos e Gallinarum em frangos, os quais são capazes de causar infecções invasivas e potencialmente letais em apenas um tipo de hospedeiro (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 infecções localizadas. Essas infecções são causadas por NTS denominadas invasivas, ou iNTS (Uzzau *et al.*, 2000; CDC, 2019a). Sorovares como *S. Dublin* e *S. Choleraesuis*, por exemplo, são comumente identificados em casos de bacteremia em bovinos e suínos. Em um estudo publicado por Wilkins & Roberts, 1988, com 6.564 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. Destas, 38 eram Typhimurium, 9 Enteritidis, 4 Dublin e 1 Choleraesuis. Entretanto, quando observada a proporção de isolados extraintestinais/isolados totais foi identificada uma tendência de *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* se comportarem 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%).

1.2 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 ser disseminada pelo ambiente (águas contaminadas com dejetos e restos de abates) e produtos alimentícios de origem animal e vegetal, com ocorrência relatada também 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. Alguns indivíduos são mais suscetíveis a infecções sistêmicas, como crianças com menos de um ano de idade e pacientes imunossuprimidos (Wen *et al.*, 2017).

As salmonelas tifoides (*S. Typhi* e *S. Paratyphi*), por sua vez, causam a febre entérica, que é conhecida como febre tifoide e paratifoide, a depender do sorovar causador da infecção (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; ou um quadro mais grave, com febre alta, desconforto abdominal e estado mental alterado. A febre alta pode durar cerca de três dias, acompanhada de quadros de anorexia, náusea, vômito, dores abdominais, fezes amolecidas, mialgia, letargia, tosse seca, dores de cabeça e convulsões. Diferentes complicações podem ocorrer, como perfuração

intestinal (uma condição com alta taxa de mortalidade), miocardite, hepatite, choque séptico e meningite (Qamar, Hussain, & Qureshi, 2022).

Em um estudo retrospectivo realizado por Rahman e colaboradores com 954 pacientes menores do que 15 anos de idade, diagnosticados clinicamente com febre tifoide, no Hospital Universitário da Universidade de Ilorin, Nigéria, entre 1984 e 1999, foi relatado que 108 (11%) pacientes apresentaram perfuração ileal, uma complicação do quadro infeccioso de *Salmonella* tifoide. Estes indivíduos também apresentaram febre ($n = 108$; 100%), dor abdominal ($n = 98$; 90,6%), vômito ($n = 65$; 60%) e diarreia ($n = 37$; 34%), demonstrando uma manifestação variada de 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 fazem referência a portadores de longo prazo, podendo excretar o microrganismo por anos. Ou seja, tais portadores podem se tornar uma fonte de disseminação de *Salmonella* (Parry *et al.*, 2002).

Infecções ocasionadas por iNTS são descritas como processos ocasionados por *Salmonella* Não Tifoide em indivíduos com imunodeficiência, permitindo ao microrganismo a evasão do sistema imune e invasão do organismo. Tal imunodeficiência pode estar 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, Tanzânia, avaliou ao longo de um ano 403 pacientes, com mais de 13 anos de idade, que deram entrada no hospital com febre igual ou maior que 38° C. Destes, considerando os 161 infectados com HIV, 1,2% ($n = 2$) dos pacientes apresentavam infecção por NTS e 1,2% ($n = 2$) 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* ($n = 24$; 9,8%) e zero infecções por NTS. Os 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).

1.3 Tipificação molecular

O gênero *Salmonella* apresenta um desafio significativo em sua classificação devido à sua diversidade. Enquanto as classificações tradicionais baseadas em sorotipagem têm sido amplamente utilizadas para validar a variedade de sorovares, estudos recentes em epidemiologia molecular têm destacado uma heterogeneidade filogenética. A análise filogenética revela padrões de divergência genética tanto dentro de um mesmo sorovar quanto entre diferentes sorovares, sugerindo a existência de sorovares monofiléticos e polifiléticos (Yin *et al.*, 2020; Seribelli *et al.*, 2021).

Neste contexto, a técnica de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), que se baseia no sequenciamento de sequências nucleotídicas de sete genes conservados para criar agrupamentos denominados *Sequence Types* (STs), a qual é capaz de evidenciar similaridades genéticas com maior resolução e precisão do que a sorotipagem. Especificamente com relação à *Salmonella*, cepas de um mesmo sorovar podem ser classificadas em diferentes STs, o que ratifica o poder discriminatório dos sete genes analisados. Para a maior compreensão filogenética, são criados eBurst Groups (eBGs), grupos de diferentes STs que divergem em apenas um alelo (*Single Locus Variant*), caracterizados como filogeneticamente similares (Alikhan *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2021).

Um estudo conduzido por Achtman *et al.* (2012) examinou a correlação entre sorotipagem e MLST, propondo a substituição da primeira pela última. Nesta pesquisa, entre 4257 isolados pertencentes a 554 sorovares, o sorovar Typhimurium chama a atenção, pois a grande maioria das cepas pertence ao mesmo ST (ST19) e se enquadram no eBG1, assim como ocorre com o ST11 de Enteritidis. No entanto, observou-se que, em alguns casos, cepas do mesmo sorovar podem ser agrupadas em outros ST e eBG. Essa problemática na tipagem por sorologia também foi evidenciada em isolados dos sorovares Farsta e Hato, que estão presentes no eBG1, embora esse grupo seja predominantemente representado pelo sorovar Typhimurium. Portanto, a tipificação molecular por MLST apresenta uma resolução mais refinada na tipificação de *Salmonella*, em comparação com a sorotipagem, visto que isolados geneticamente próximos e caracterizados como sorovares diferentes estão enquadrados em um mesmo eBG, enquanto isolados geneticamente distintos e caracterizados como mesmo sorovar, são

alocados em eBGs diferentes. Além disso, foi possível validar que alguns sorovares são polifiléticos, como Newport (com estirpes alocadas nos eBG 2, 3, 7 e 35), Paratyphi B (presentes nos eBG 5, 19, 32 e 59) e Saintpaul (presente nos eBG14 e 209).

Embora MLST forneça uma representação mais precisa dos dados epidemiológicos, outras técnicas mais robustas, como *core genome* MLST (cgMLST), *whole genome* MLST (wgMLST) e *whole genome* SNPs (wgSNPs), oferecem uma resolução ainda maior. Estas técnicas analisam um maior número de genes ou nucleotídeos, permitindo uma investigação mais detalhada da filogenia de *Salmonella*, configurando um maior número de cgSTs e wgSTs, (Alikhan *et al.*, 2018; Pearce *et al.*, 2018).

Em um estudo retrospectivo, Seribelli e colaboradores (2021) analisaram genomas de *Salmonella* Typhimurium coletados ao longo de três décadas (1983 a 2013), de diferentes origens (clínica, alimento, suínos), utilizando diversas estratégias, como MLST, cgMLST, wgSNPs e análise de clusters baseada na presença de genes marcadores únicos. Análises de MLST identificaram, entre 120 amostras, 9 ST, sendo eles: ST19; ST1649; ST3343; ST1921; ST313; ST639; ST14; ST516; e ST64. As análises por cgMLST e wgSNPs explorando minuciosamente genomas, evidenciaram a ocorrência de cepas cuja similaridade genômica seria maior com STs alternativos àqueles determinados por MLST. Por outro lado, a análise acerca de comparação de clusters baseada na presença de genes marcadores únicos, embora evidencie uma diversidade no repertório de genes de virulência e fatores metabólicos, mostrou-se menos eficaz ao verificar a variação entre os grupos filogenéticos. Além disso, o estudo demonstrou que, na referida coleção de genomas de *S. Typhimurium*, o ST19 foi o mais encontrado entre as amostras de humanos e alimentos ($n = 77/91$), enquanto as amostras de suínos se apresentaram mais diversas. Em todas as análises, a maioria das amostras de origem humana ficaram agrupadas em um só cluster. As amostras de alimentos e suínos, entretanto, foram agrupadas em mais de um subtipo.

1.3.1 Epidemiologia molecular de *Salmonella* sp.

A epidemiologia molecular, como discutido acima, fornece informações epidemiológicas mais precisas do que apenas a identificação de sorovares, e quando diferentes técnicas são aplicadas em conjunto, a resolução da análise é mais refinada. Essas análises permitem o rastreamento de cepas mais virulentas e comumente associadas a determinados perfis de resistência. Dessa forma, a epidemiologia molecular permite

identificar a circulação de STs e patótipos de elevada relevância clínica para a população local (Okoro *et al.*, 2015; Seribelli *et al.*, 2021).

Estudos acerca de epidemiologia molecular se mostram relevantes na busca por patógenos virulentos e resistentes à antibióticos, causadores de surtos e epidemias em determinados locais do mundo. Em países da África Subsaariana, cepas do ST313 de *Salmonella* Typhimurium são comumente encontradas em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano (CSF) de indivíduos imunocomprometidos. Embora *S. Typhimurium* seja caracterizada como uma NTS, o ST313 apresenta um repertório de genes de virulência associado a perfil mais adaptado ao hospedeiro humano, causando infecções invasivas (iNTS) (Okoro *et al.*, 2012, 2015). Em território brasileiro, no entanto, o ST313 foi encontrado não somente em amostras clínicas de infecções invasivas, como também em amostras de fezes e alimentos. Além disso, as amostras encontradas na África subsaariana apresentaram um perfil resistência a múltiplas drogas (MDR), enquanto as brasileiras eram pan-sucetíveis (Gordon *et al.*, 2008; Feasey *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2017; Panzenhagen *et al.*, 2018). No estudo realizado por Panzenhagen *et al.* (2018), é evidenciada a divergência filogenética entre as cepas brasileiras e subsaarianas. Todavia, a divergência filogenética encontrada aponta para processos evolutivos distintos, em que as cepas subsaarianas parecem demonstrar maior adaptação ao hospedeiro humano, enquanto as brasileiras, apesar de seguir o mesmo caminho evolutivo, ainda não apresentam o mesmo perfil de adaptação ao hospedeiro.

Análises realizadas por grupos de pesquisa no Brasil, Chile e México, em uma colaboração com o *Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition* (JIFSAN) com foco em amostras isoladas de águas de regiões agrícolas, revelam uma maior prevalência de 3 sorovares entre as estirpes obtidas: Newport ($n = 161$), Infantis ($n = 112$) e Typhimurium ($n = 106$). Embora a proporção dos isolados de cada sorovar não tenha sido similar, a caracterização molecular dos isolados revelou uma associação filogenética entre as amostras dos 3 países latino-americanos. Entre os isolados de Newport, foram observados 7 sequence types (STs 31, 45, 118, 132, 164, 2370 e 7815) e, em uma análise de wgSNPs, foi observada uma grande quantidade de subtipos entre os isolados dos 3 países e dos isolados de um mesmo país, o que sugere que este sorovar apresenta um perfil populacional diverso. Ademais, foram encontrados 5 sequence types (STs 19, 34, 99, 213 e 2072) do sorovar Typhimurium, com um caráter populacional também variado. O sorovar Infantis, entretanto, apresentou uma menor diversidade populacional, com a identificação de 4 sequence types (STs 32, 1032, 9835 e um ST não identificado), com

baixa variação de SNPs entre os isolados. Análises relacionadas à presença e ausência de mutações em genes de resistência aos antimicrobianos (GRAs), assim como a presença e ausência de GRAs e genes de virulência, auxiliaram a elaborar uma resposta mais profunda sobre a filogenia dos isolados, refletindo a influência de valores evolutivos e ambientais em estudos epidemiológicos de *Salmonella* (Chen *et al.*, 2024).

Em uma perspectiva epidemiológica, sabe-se que o emprego de técnicas de sorotipagem mostram-se pouco discriminatórias no rastreamento de surtos e podem não apresentar concordância com estudos filogenéticos, o que destaca a necessidade de aplicação de técnicas moleculares para tais tarefas. Todavia, o emprego dessas técnicas não pode ser arbitrário. A escolha da técnica implementada deve responder à pergunta do estudo. Dessa forma, uma metodologia mais discriminatória, como o wgMLST, pode ser mais informativa do que o MLST convencional. No entanto, o emprego desta técnica demanda um banco de dados atualizado e alimentado com inúmeros genomas de referência, e se aplica melhor a estudos em pequena e média escala. Em estudos epidemiológicos em larga escala, a robustez do banco de dados usado na análise pode não ser o suficiente para refletir a diversidade amostral proposta pela análise. Neste caso, uma tipificação por MLST normalmente atende às necessidades do estudo e gera resultados mais fidedignos quanto à sua interpretação (Alikhan *et al.*, 2018).

1.4 Patogenia e genes de virulência em *Salmonella*

Salmonella é um microrganismo capaz de habitar o trato intestinal. Sua virulência está essencialmente associada à capacidade de invadir células presentes na parede do intestino, como as células epiteliais, as células M, as células dendríticas e os macrófagos residentes. Em geral, a infecção de células M é mais rápida (Santos & Bäumlér, 2004). Dadas as rotas de aquisição de *Salmonella*, por se tratar de um organismo associado à DTHAs, é comum que ele seja contraído através da via fecal-oral. É bem descrito na literatura que, para que ocorra a infecção, o patógeno precisa resistir ao ambiente hostil do estômago, para então colonizar o intestino e promover a infecção (Haraga *et al.*, 2008). Com a sobrevivência das células bacterianas, inicia-se o processo de infecção, o qual 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 local. 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 bacterianas secretadas por sistemas de secreção tipo 3 (T3SS), até que ocorra o englobamento da bactéria e, então, invasão da célula eucariótica. Após a invasão, a formação de vacúolos incompatíveis com a formação de fagolisossomos, e a inibição da apoptose celular, dentre outros mecanismos, o patógeno, por intermédio de proteínas efetoras, promove a sua disseminação pelo hospedeiro através da infecção de células da imunidade inata, os macrófagos. A partir da infecção dos macrófagos, a *Salmonella* torna-se capaz de infectar outros sítios anatômicos (Haraga *et al.*, 2008; Hume *et al.*, 2017). Eventualmente, o hospedeiro pode desenvolver uma infecção crônica e vir a se tornar um portador e reservatório do microrganismo, levando à disseminação da *Salmonella* por meio das fezes (Rehman *et al.*, 2019).

Para se entender melhor a patogênese de *Salmonella*, faz-se necessária a compreensão dos mecanismos que facilitam e levam à persistência da infecção. Esses mecanismos envolvem os chamados fatores de virulência, codificados por genes presentes no cromossoma bacteriano e em plasmídeos. Todo o processo infeccioso conta com a expressão desses genes para a adesão, invasão e persistência e disseminação do patógeno (Wang *et al.*, 2020).

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 no estômago 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, além da possível ativação de diferentes genes de virulência do patógeno, como os genes que são regulados pela Resposta Ácido-Tolerante (ATR), que se caracteriza 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 (Foster, 2008; Palmer e Slauch, 2017; dos Santos *et al.*, 2019).

A adesão é promovida por fímbrias 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, e codificam proteínas que desempenham papéis relativos à estrutura e regulação necessárias para a montagem extracelular da fimbria. Existem diversos genes associados às estruturas fimbriais, o que resulta em mais de uma possibilidade de montagem dessas estruturas. Tal diversidade na montagem das fimbrias permite 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 das proteínas estruturais da fimbria, existe a presença de outras subunidades proteicas, presentes na extremidade da fimbria, com propriedade de adesinas, as quais favorecessem também a auto adesão: ligação célula-célula (Rehman *et al.*, 2019).

A adesão de *Salmonella* às células polares do tecido epitelial é resultado de um processo que envolve uma adesina e fimbrias 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 por um gene presente na Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 4 (SPI4), no mesmo *locus* que codifica SiiCDF. No entanto, a expressão de genes da SPI4 é corregulada com genes de um Sistema de Secreção Tipo 3 (T3SS) codificado em outra ilha de patogenicidade. Tal corregulação 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 fimbrias na associação da superfície celular bacteriana com a superfície das células do hospedeiro, existe a atuação de translocases bacterianas, como as proteínas 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 antes do contato com a célula, enquanto as SipB e SipC são apenas detectadas após a associação bactéria-célula hospedeira. Foi sugerido que a SipD realiza o papel de sinalizar a associação entre as células e, então, o recrutamento das demais proteínas. Foi observado

ainda, que na ausência de SipD, a associação íntima de *S. Typhimurium* não foi possível, assim como na ausência de SipB e SipC, a associação íntima se manteve inviável. Isso leva à conclusão de que a presença das três translocases é 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 introdução 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), como os genes do operon *inv*, *prg*, *org* e *spa* (Lou, Zhang, Piao, & Wang, 2019a). Existem diversas SPIs, de maior ou menor complexidade, e uma abordagem mais completa será realizada no item 1.4.4. 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 de T3SS-1, SipB, SipC e SipD. A SPI-1 é ubíqua em todos os sorovares de *Salmonella*, o que sugere uma imprescindível relevância para os 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).

Uma vez ocorrida a interação do T3SS-1 com a membrana da célula hospedeira, as proteínas efetoras SopE, SopE2 e SopB são liberadas no citoplasma eucariótico e promovem a reorganização do citoesqueleto celular, através da ativação de Rho GTPases Cdc42, Rac1 e RhoG. Tal processo aciona o “ruffling” da membrana através de uma reorganização do citoesqueleto culminando com 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 eram essenciais para esse processo (Patel e Galán, 2006; Haraga *et al.*, 2008; Fattinger *et al.*, 2021). Após a macropinocitose, a célula bacteriana é mantida em um vacúolo, tecnicamente chamado de vacúolo contendo *Salmonella* (do inglês, *Salmonella* Containing Vacuole - SCV), onde fica protegida de respostas celulares, o que a permite sobreviver e se multiplicar (Haraga *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que proteínas efetoras do sistema de secreção, como SopE, SopE2 e SopB, possuem propriedades pró-inflamatórias para induzir a cascata de ativação Rho GTPase Cdc42 - MAP kinases (como Jnk), o que leva à indução da transcrição do fator NF- κ B, um regulador chave da resposta inflamatória. Tal processo causa um aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, TNF- α), quimiocinas e moléculas de adesão celular, ajudando no recrutamento de células do sistema imune para o local da infecção, o que poderia ser danoso à infecção por *Salmonella*. Para contrapor tal efeito, *Salmonella* expressa outros fatores que inibem a ativação de Jnk, como AvrA e, por consequência, 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, *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). Em 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. Uma vez formado, 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; Marwaha *et al.*, 2017; Gutiérrez *et al.*, 2021). Mas durante esses acontecimentos, *Salmonella* passa a se replicar no SCV. Concomitante à replicação, há a formação dos SIFs (*Salmonella*- Induced Filaments), que ocorre devido

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 efetoras, SifA, SifB e PipB2. Além de promoverem a extensão do SIF, elas promovem a proteção e estabilidade do SCV (Henry *et al.*, 2006; Bakowski *et al.*, 2008; 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 ubiquitinação da proteína SopA, por HsRMA1, viabiliza a liberação da *Salmonella* no SCV para o citosol da célula hospedeira. Essa proteína também desempenha uma função de escape do sistema imune; ao realizar um papel regulatório nas vias de ubiquitinação do hospedeiro, ubiquitinando e degradando proteínas E3 ligases do hospedeiro. . A SspH2, entretanto, apresenta papel pró-inflamatório pela super ativação de receptores NOD1 e NOD2 (Zhang *et al.*, 2006; Delyea *et al.*, 2021). Outras proteínas, como SseL, regulam o *killing* e autofagia de macrófagos, enquanto SteD inibe a ativação de células T pela depleção do MHCII (Mesquita *et al.*, 2012; Bayer-Santos *et al.*, 2016; Azimi *et al.*, 2020).

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 originários do genoma de *Salmonella*. As SPIs são estruturas genômicas adquiridas por transferência horizontal de genes (THG), ou seja, podem conter 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 em regiões 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 translocada pelo T3SS-1 (codificado por genes presentes na SPI-1), no momento de invasão celular (Wood *et al.*, 1998; Hur *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020). 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 (Hensel, 2004; Srikanth *et al.*, 2011; Azimi *et al.*, 2020;).

Como mencionado, algumas SPIs apresentam uma determinada função na patogenia, e o estabelecimento da função característica implica na estabilidade que tais ilhas de patogenicidade possuem no gênero bacteriano, visto que para que a infecção, multiplicação e disseminação da *Salmonella* faz-se necessária a presença de um determinado conjunto gênico, que precisam ser conservados ao longo das linhagens. A esse conjunto de genes conservados atribui-se o nome de “core genes”, em específicos os presentes na SPI-1 (Lerminiaux *et al.*, 2020). Algumas SPIs são comumente 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 à 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+} , importante para a sobrevivência 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 patoidentificação ao momento em que abordam a virulência do microrganismo. Ainda, numa perspectiva mais ampla, SPIs não apenas fornecem informações sobre o processo infeccioso da *Salmonella*, mas também contribuem para a compreensão da história

evolutiva desse microrganismo, que relaciona o seu nicho ecológico, transição e patogenia em diferentes hospedeiros, interações microbianas e diversidade de sorovares.

1.5 Fármacos antimicrobianos e respectivos mecanismos de resistência

Antimicrobianos podem ser caracterizados como moléculas que tem o potencial de eliminar um microrganismo ou inibir seu crescimento. Essas moléculas podem ser produzidas naturalmente por bactérias e fungos, como, também, podem ser sintetizadas com base em outros antimicrobianos de origem natural; fármacos antimicrobianos sintéticos. Essas moléculas dão origem a diversas classes de fármacos, que são amplamente utilizados em tratamentos de infecções de origem bacteriana (antibióticos), fúngica (antifúngicos) e viral (antiviral) (Madigan, Martinko, & Bender, 2016).

Os antibióticos sintéticos estão incluídos em cinco classes de antimicrobianos: (i) quinolonas, envolvidas no bloqueio da replicação e reparo do DNA, ao agir na enzima DNA girase; (ii) sulfas, inibem a formação de ácidos nucleicos, ao bloquearem a formação de co-fatores de ácido fólico; (iii) oxazolidinonas, inibem a síntese proteica, ao impedir a associação entre as subunidades 50S e 30S do ribossoma bacteriano; (iv) nitrofuranos, que agem na síntese de proteínas; e (v) azóis, que agem, principalmente, no bloqueio da síntese de ergosterol da parede celular fúngica (Carrillo-Muñoz, Giusiano, Ezkurra, & Quindós, 2006; Guimarães, Momesso, & Pupo, 2010; Hutchings, Truman, & Wilkinson, 2019).

Por outro lado, os antibióticos de origem natural (como betalactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina e macrolídeos) são produzidos por microrganismos, como bactérias e fungos. É ampla a diversidade e eficácia que esses antibióticos possuem (Madigan *et al.*, 2016; Hutchings *et al.*, 2019). Em geral, ao se tratar de bactérias, esses fármacos (naturais ou sintéticos) podem ser classificados como bactericidas, bacteriostáticos e bacteriolíticos. Os bacteriostáticos, apenas inibem o crescimento bacteriano, sendo associados à inibição de alguma via metabólica da bactéria, que quando cessada a administração, a bactéria pode voltar a proliferar; os bactericidas, por sua vez, são assim chamados pela sua capacidade de se ligar à bactéria alvo e promoverem a sua morte, sem a lise celular, deixando as células inviables, íntegras; os bacteriolíticos também estão associados à eliminação das bactérias, mas eles promovem a lise celular, com a liberação do conteúdo intracelular bacteriano (Nemeth, Oesch, & Kuster, 2015; Madigan, Martinko, & Bender, 2016).

A seguir, estão detalhadas as principais classes de antimicrobianos ativas contra *Salmonella* e os mecanismos de resistência capaz de impedir sua ação já descritos em enterobacterales. A **Figura 3** representa graficamente a diversidade destes mecanismos.

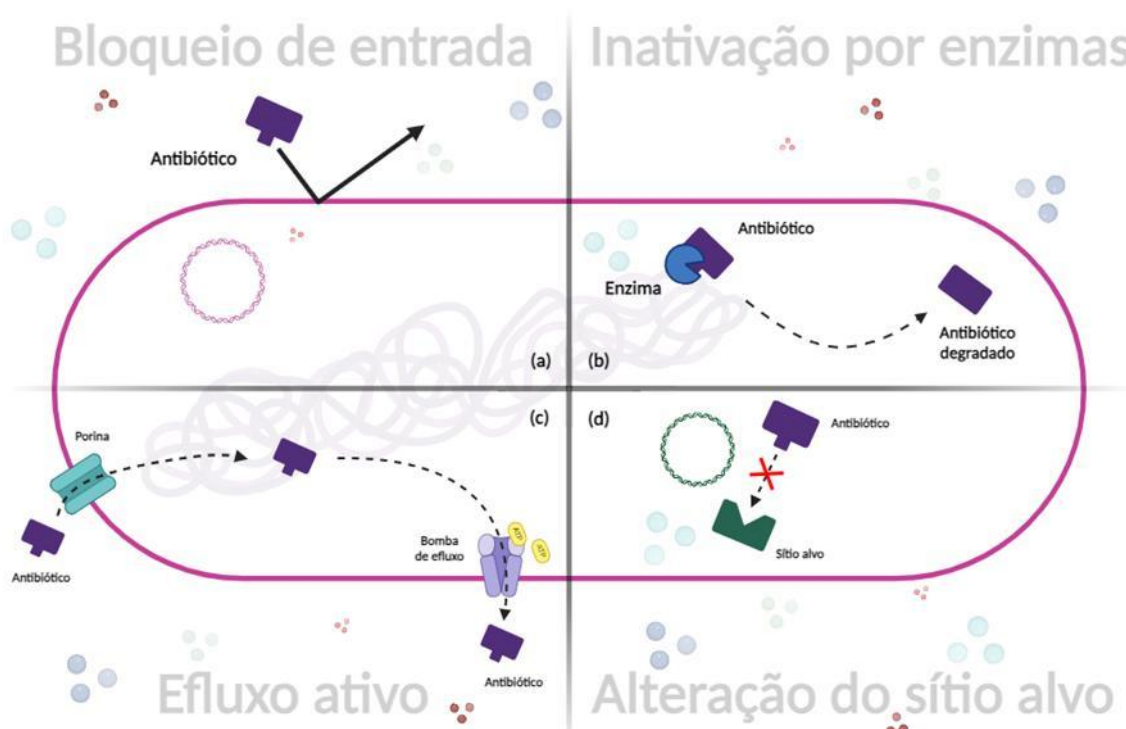


Figura 3 – Mecanismos moleculares de resistência a antimicrobianos. (a) o bloqueio da entrada de antibióticos ocorre pela ausência de porinas na membrana celular; (b) a inativação do antibiótico por enzimas ocorre por uma enzima produzida pela própria bactéria; (c) o efluxo ativo de antibiótico ocorre pela ação de uma bomba de efluxo; e (d) a alteração do sítio alvo faz com que o antibiótico não atue corretamente, pois não reconhece mais o sítio alvo. Imagem produzida pelo autor na plataforma online <https://www.biorender.com/>.

1.5.1 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são fármacos com potencial antimicrobiano bactericida. O seu mecanismo de ação se baseia na inibição do processo de transpeptidação; impedindo a formação das peptideoglicanas que dão origem à parede celular bacteriana. Este processo é normalmente realizado pelas proteínas PBP, presentes na membrana celular e voltadas para o espaço periplasmático de bactérias gram-negativas, que ao se associarem irreversivelmente aos β -lactâmicos perdem sua funcionalidade.

Essa classe de antimicrobianos é dividida em várias subclasses, sendo elas: penicilinas; cefalosporinas; carbapenemas; e monobactâmicos. Dentro da antibioticoterapia, há possibilidade de usar associação de alguns β -lactâmicos com inibidores de betalactamases, preservando a ação da droga frente a estas enzimas (muitas delas adquiridas), que se configuram um importante mecanismo de resistência em

bactérias gram-negativas. Na classe em questão, são encontrados os inibidores ácidos clavulânico, sulbactam e tazobactam, associados à amoxicilina, ticarcilina e piperacilina, respectivamente. Alguns mecanismos de resistência descritos para β -lactâmicos são: (i) produção de novas PBPs; (ii) produção de enzimas hidrolíticas; (iii) reduzida expressão de porinas; e (iv) alta expressão de bombas de efluxo (K. Bush & Bradford, 2016; Madigan *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2022; Aminov, 2017).

1.5.2 Sulfonamidas

As sulfonamidas são antimicrobianos bacteriostáticos, que atuam dificultando o processo de divisão celular da bactéria alvo. Essas drogas funcionam como competidoras antagonistas de moléculas de ácido p-aminobenzóico (PABA) no processo de síntese de ácido fólico, essencial para a síntese de DNA, ao se associar à enzima dihidropteroato sintase. A sua ação inibe a síntese do ácido dihidrofolato, que impede, então, a produção do ácido tetrahydrofolato, sendo ambos parte do processo de síntese de purinas, metionina, timina e serina. A associação de sulfonamidas com trimetoprim auxilia no processo de inibição de síntese de DNA, visto que o trimetoprim inibe diretamente a formação do ácido tetrahydrofolato ao se associar à enzima dihidrofolato redutase. A resistência a ambos os fármacos, está associada à: (i) alta expressão das enzimas alvo; e (ii) mutações nos genes codificantes para as enzimas (Sköld & Swedberg, 2017; Ovung & Bhattacharyya, 2021).

1.5.3 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas, que atuam na inibição da biossíntese de polipeptídios ao se ligarem à porção 30S do ribossomo, mais especificamente no sítio A da região 16S. Essa associação pode levar à não iniciação da tradução, bloqueio da tradução ou à alteração conformacional do sítio, que acaba permitindo associações indevidas de tRNAs, o que resulta na polimerização de um polipeptídio malformado. As proteínas sintetizadas não funcionarão corretamente, podendo, inclusive, causar danos à célula e levar à sua morte. A resistência a aminoglicosídeos é ocasionada por diversos mecanismos, como: (i) metilação do sítio alvo; (ii) alteração da droga por enzimas modificadoras de aminoglicosídeo (acetiltransferases, fosfotransferases, nucleotidiltransferases); e (iii) expressão de bombas

de efluxo (Ramirez & Tolmasky, 2010; Wachino & Arakawa, 2012; Krause, Serio, Kane, & Connolly, 2016).

1.5.4 Tetraciclina

As tetraciclina são antibióticos com potencial bacteriostático, que podem apresentar ação bactericida em determinados microrganismos. O seu mecanismo de ação está associado à interação da droga com a região 16S da porção 30S do ribossomo. Essa interação leva à não iniciação da tradução, ou imprecisão no processo de biossíntese de polipeptídios, mecanismo parecido com o visto em aminoglicosídeos. Diferentemente de outros antibióticos, as tetraciclina demandam o auxílio de uma molécula de Mg^{2+} para que a droga se difunda pelas porinas da membrana externa de bactérias gram-negativas. A posterior desassociação entre a tetraciclina e o Mg^{2+} permite a passagem da droga pela membrana interna da célula. Após a entrada no citoplasma, a tetraciclina se complexa com Mg^{2+} para a associação com o ribossomo. Entre os mecanismos de resistência às tetraciclina estão: (i) presença de mutações nos genes do rRNA (algumas bactérias); (ii) proteção do sítio alvo por uma proteína repressora (RPP); (iii) expressão de bombas de efluxo e (iv) inativação enzimática da tetraciclina (Markley & Wencewicz, 2018; Grossman, 2016; Beheshti *et al.*, 2020; Nogrado, Unno, Hur, & Lee, 2021).

1.5.5 Macrolídeos

Os macrolídeos são antimicrobianos majoritariamente bacteriostáticos com potencial bactericida sobre algumas bactérias. Assim como os aminoglicosídeos e tetraciclina, também atuam na inibição do processo de biossíntese de polipeptídios. Entretanto, diferentemente dos aminoglicosídeos e tetraciclina, os macrolídeos se associam à porção 23S da subunidade 50S do rRNA, mais especificamente no túnel de saída de peptídeos. Entre os mecanismos de resistência associados aos macrolídeos estão: (i) mutações no gene do 23S; (ii) mutações nos genes codificantes para as proteínas ribossomais; (iii) expressão de RPPs, ação de proteínas modificadoras de sítio alvo por metiltransferases; (iv) expressão de bombas de efluxo; e (v) inativação enzimática da droga (fosfotransferases e esterases) (Fyfe, Grossman, Kerstein, & Sutcliffe, 2016; Dinos, 2017).

1.5.6 Fenicóis

Os fenicóis são drogas com potencial bacteriostático, devido à sua característica de ligação reversível à subunidade 50S do ribossoma bacteriano. Entre os mecanismos de resistência associados à falha terapêutica com fenicóis, em especial o cloranfenicol, está: (i) expressão de proteínas modificadoras de cloranfenicóis (CATs, acetiltransferases e fosfotransferases); (ii) expressão de bombas de efluxo; (iii) baixa expressão de porinas; (iv) mutações no gene que codifica o 23S; e (v) modificação do sítio alvo por metiltransferases (Roberts & Schwarz, 2016).

1.5.7 Quinolonas

As quinolonas e suas variantes fluoroquinolonas são antimicrobianos com potencial bacteriostático e bactericida, a depender da concentração do fármaco administrado. Elas agem na inibição das topoisomerasas do tipo II, Topoisomerase IV e DNA Girase. A associação entre a droga e as topoisomerasas ocorre em um sítio específico, conhecido como Região Determinante de Resistência a Quinolonas (em inglês, *Quinolone Resistance Determining Region* – QRDR), que está associado à funcionalidade da enzima na modulação do nível de *supercoiling* do DNA. A inibição desse processo impede, por exemplo, que o DNA bacteriano seja replicado, visto que a remoção do *supercoiling* positivo formado durante a ação da DNA polimerase é essencial para que a replicação seja concluída. Os mecanismos de resistências associados à falha terapêutica das quinolonas são: (i) mutações nos genes das topoisomerasas; (ii) redução na expressão de porinas; (iii) expressão de bombas de efluxo; (iv) enzimas capazes de alterar a droga; e (v) expressão de proteínas protetoras do sítio alvo (Correia, Poeta, Hébraud, Capelo, & Igrejas, 2017; N. G. Bush, Diez-Santos, Abbott, & Maxwell, 2020).

1.6 Emergência e impacto da resistência aos antimicrobianos

A utilização de antibióticos para o tratamento de infecções, embora necessária, pode contribuir para a evolução da resistência aos antimicrobianos. Neste contexto, a antibioticoterapia pode selecionar bactérias resistentes a antibióticos, ou induzir o surgimento de mutações e processos de THG associados a alelos que levem à resistência (Huddleston, 2014). A utilização de antimicrobianos, entretanto, se dá também no setor agropecuário, onde muitas drogas podem ser utilizadas associadas à ração como melhoradoras de desempenho (destinação hoje não mais autorizada em muitos países) ou

como medida de prevenção e tratamento de doenças, com foco em aspectos sanitários e na mitigação de perdas. Os dejetos e carcaças de animais abatidos em fazendas de criação animal são lavados, levando à contaminação do solo, corpos d'água e lençóis freáticos, próximos ao local de criação e abate, com resíduos de antibióticos e bactérias resistentes a antimicrobianos. Tal contaminação contribui, igualmente, para o surgimento de novos microrganismos resistentes, especialmente porque antimicrobianos em baixas concentrações no ambiente podem oferecer a condição necessária para a seleção de mutações ou transferência de genes com bactérias de outras matrizes ambientais. Além da disseminação do esgoto comunitário e hospitalar, e dos dejetos do setor agropecuário, a indústria farmacêutica também contribui para a manutenção da pressão seletiva com resíduos de antimicrobianos no ambiente (He *et al.*, 2020; Zainab, Junaid, Xu, & Malik, 2020; Jian *et al.*, 2021).

A problemática relacionada à disseminação de resistência está diretamente associada ao aumento do número de casos de infecções por bactérias resistentes. De acordo com previsões em uma perspectiva global, mortes ocasionadas por microrganismos resistentes a antimicrobianos podem passar por um aumento no número de mortalidade, de 700.000 em 2014, para 10 milhões de fatalidades anuais em 2050, com países asiáticos e africanos à frente das taxas de mortalidade, somando ~8,9 milhões. Tal cenário indica a possibilidade de uma perda econômica global referente à 100 trilhões de dólares (O' Neill, 2014). Mais recentemente, um estudo avaliou as estimativas de morte mundial associada ou atribuída à resistência a antimicrobianos, levando em consideração dados de 204 países e territórios no ano de 2019. Essa avaliação incorporou na análise informações provenientes de revisões sistemáticas, dados clínicos e hospitalares, sistemas de monitoramento e artigos científicos, entre outros. Os resultados indicam que no ano de 2019 ocorreram 4,95 milhões de mortes associadas à resistência a antimicrobianos (aquelas em que o indivíduo é portador de bactérias resistentes), sendo 1,27 milhão atribuídas à resistência a antimicrobianos (a resistência como o fator determinante para morte). Entre as análises feitas, foi observado que países em desenvolvimento, como países africanos, sul-asiáticos, do leste europeu e latinos lideram o ranking mundial de mortes associadas e atribuídas à resistência aos antimicrobianos (Murray *et al.*, 2022).

1.6.1 Resistência em *Salmonella* sp.

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de proteína animal do mundo, numa produção altamente competitiva que demanda alto padrão de segurança

microbiológica, o que muitas vezes implica na utilização de antimicrobianos. Considerando essa afirmativa, e aplicando noções acerca do impacto da utilização intensiva de antimicrobianos no setor agropecuário, é bastante provável que a seleção de microrganismos resistentes ocorra neste ambiente (Uddin *et al.*, 2021; Crits-Christoph, Hallowell, Koutouvalis, & Suez, 2022).

Mesmo que hoje uma série de normativas não mais autorize o uso de muitos antimicrobianos como melhoradores de desempenho (**Quadro 1**), estas mesmas drogas podem ser utilizadas para fins profiláticos e terapêuticos. Tal regulação tem sido feita pela emissão de instruções normativas (Cardoso, 2019; MAPA, 2023).

Quadro 1 – Legislações brasileiras que limitaram o uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho na produção animal

Ano	Legislação	Antimicrobianos contemplados
1998	Ofício Circular DFPA nº 047/1998	Avoparcina
27/06/2003	IN nº 09	Cloranfenicol e Nitrofuranos
24/11/2004	IN nº 11	Olaquinox
14/11/2005	IN nº 35	Carbadox
09/07/2009	IN nº 26	Anfenicóis, Tetraciclina, Beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), Quinolonas e Sulfonamidas
17/05/2012	IN nº 14	Espiramicina e Eritromicina
22/11/2016	IN nº 45	Colistina
13/01/2020	IN nº 1	Tilosina, Lincomicina e Tiamulina

Dados obtidos a partir do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2023). DFPA, Departamento de Fiscalização de Produtos de Origem Animal; IN, Instrução Normativa.

Quanto à resistência de *Salmonella* associadas ao setor produtivo de proteína animal, uma revisão publicada em 2020 reuniu dados de estudos publicados no Brasil nos últimos 20 anos. Especificamente com relação à *Salmonella* isoladas de produção avícola, autores relataram porcentagens variadas de resistência à penicilina, cefalosporinas de primeira e segunda geração, sulfonamidas, tetraciclina e nitrofurantoína; e, a partir de 2010, crescentes taxas de resistência a quinolonas e fluoroquinolonas e casos de resistência à polimixina (Palmeira *et al.*, 2016; Koerich *et al.*, 2018; Rabello *et al.*, 2020). Entre os estudos abordados, chama atenção o relato de uma coleção de *S. Gallinarum* associada a um surto de febre tifoide em aves, com mais de 80% dos isolados resistentes a quinolonas, um estudo de *S. Enteritidis* associado a surtos diarreicos com mais de 40%

de resistência a esta mesma classe de antimicrobianos, e um terceiro estudo com mais de 40% das amostras de *S. Heidelberg* analisadas apresentando resistência a cefalosporinas de terceira geração (Medeiros, Oliveira, Rodrigues, & Freitas, 2011; Borges *et al.*, 2017; Koerich *et al.*, 2018).

Perfis fenotípicos de resistência a múltiplas drogas foram descritos em isolados de *S. Schwarzengrund* e *S. Newport* isoladas no estado de Goiás (incluindo cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim), e *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* isoladas no Paraná (cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina) (Penha Filho *et al.*, 2019; Perin *et al.*, 2019). Estes são apenas alguns exemplos de trabalhos que descreveram relevantes fenótipos de resistência em amostras de *Salmonella* ligadas à produção aviária. No entanto, de maneira geral *Salmonella* tem apresentado taxas e perfis de resistência a antimicrobianos menos expressivos do que os identificados em *E. coli* isoladas do mesmo contexto ambiental (Rabello *et al.*, 2020).

Considerando *Salmonella* isoladas de suínos, subprodutos ou ambiente de suinocultura, a mesma tendência de aumento da resistência a fluoroquinolonas foi observada ao longo dos anos, alinhada a um aumento também de taxas de resistência a penicilinas a partir de 2010, além de constantes altas taxas de resistência à tetraciclina durante todo o período. Curiosamente, taxas de resistência a aminoglicosídeos têm sido mais altas entre amostras isoladas de suínos do que de aves (Rabello *et al.*, 2020). Resistência a cefalosporinas de terceira geração não é historicamente significativa entre *Salmonella* isolada de suínos (Kich *et al.*, 2011; Viana *et al.*, 2019).

Poucos estudos descrevem *Salmonella* isoladas da cadeia produtiva de bovinos. Num trabalho que caracterizou amostras desta origem, os isolados apresentaram resistência a tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim, mas não a amoxicilina ou amicacina (Cossi *et al.*, 2013; Rabello *et al.*, 2020).

Contemplando também amostras isoladas de casos em humanos, Vaz e colaboradores analisaram amostras de *S. Enteritidis* associadas à carne de frango (n=53), surtos de salmonelose e amostras de pacientes (n=43) no período de 1995 a 2003. Os dados de resistência ilustram uma prevalência de 56,25% de resistência ou múltipla resistência (MDR) entre as amostras. Os perfis de resistência foram mais associados às amostras de origem animal (69,81%) do que associadas aos surtos de salmonelose (44,83%) e pacientes (28,57%). Em um contexto geral, resistência à sulfonamida (34,4%), trimetoprim-sulfametoxazol (25%), ácido nalidíxico (14,6%), estreptomicina

(2,1%), gentamicina (1%) e tetraciclina (1%) foram observadas (Vaz *et al.*, 2010; Rabello *et al.*, 2020).

Outro estudo, focando apenas em infecções em humanos, caracterizou 789 amostras de NTS obtidas entre 2000 e 2019. Entre os 359 isolados de *S. Enteritidis* pertencentes à esta coleção, foi observada resistência a 10 antimicrobianos, com maior prevalência de resistência à amoxicilina ($n = 41/359$; 11,42%), estreptomicina ($n = 43/359$; 9,47%), tetraciclina ($n = 26/269$; 7,24%) e gentamicina ($n = 15/359$; 4,18%); e 13 isolados com perfil MDR ($n = 13/359$; 3,62%). Amostras de *S. Typhimurium*, em contraste, foram menos prevalentes, mas com taxas de resistência mais elevadas à amoxicilina ($n = 17/79$; 21,52%), estreptomicina ($n = 45/79$; 56,96%), tetraciclina ($n = 21/79$; 26,58%), e sulfametoxazol-trimetoprim ($n = 14/79$; 17,72%); com 16 isolados ($n = 16/79$; 20,25%) apresentando perfil MDR. A variante monofásica de Typhimurium, 4,[5],12:i:, apresentou resistência a 9 antimicrobianos, predominantemente à estreptomicina ($n = 31/66$; 46,97%), tetraciclina ($n = 19/66$; 28,79%), amoxicilina ($n = 14/66$; 21,21%) e gentamicina ($n = 11/66$; 16,67%); e 15 isolados ($n = 15/66$; 22,72%) apresentaram perfil MDR (Calarga *et al.*, 2022).

1.7 Transferência horizontal de genes no contexto evolutivo

Dentro do contexto genético dos microrganismos, a evolução não se restringe à seleção de organismos pela capacidade de reprodução em um habitat (Darwin, 1859), mas também inclui processos adaptativos, por aquisição de material genético em um dado espaço de tempo (Goldenfeld & Woese, 2007).

O processo de seleção e adaptação de indivíduos ocorre com base na capacidade de permanecer e se reproduzir em um dado ambiente, seja por características inatas ou adquiridas. Se o ambiente for favorável às suas características, o organismo irá prosperar. Entretanto, se o ambiente for hostil, e ele não conseguir suplantar as adversidades do ambiente, a sua linhagem não será perpetuada. Conceituar o que seria um “ambiente hostil” para um dado organismo requer análises particulares sobre ele, envolvendo, principalmente, o seu contexto genético. Ainda assim, o antagonismo do ambiente para com o desenvolvimento do microrganismo é particular de cada indivíduo e sua respectiva linhagem, tendo em vista a existência de diferentes repertórios genéticos entre os microrganismos (Boto, 2009; Rodríguez-Beltrán *et al.* 2021). Dessa forma, indivíduos que estão aptos a sobreviver e se desenvolver apresentam um *fitness* mais adequado àquela situação específica, onde o *fitness* está diretamente ligado ao repertório genético

desse indivíduo (Lobato-Márquez *et al.* 2015; Pilla & Tang, 2018). Sendo o repertório genético característico de cada linhagem de indivíduos, os genes são passados verticalmente para os seus descendentes. Entretanto, entre procariotos, o compartilhamento de genes não é, unicamente, vertical, sendo possível o compartilhamento horizontal com outros grupos de indivíduos. A THG é caracterizada, segundo Goldenfeld & Woese (2007), como “a transmissão, não genealógica, de material genético de um indivíduo para outro”. Esses genes podem ser associados à sobrevivência, metabolismo e replicação, o que favorece a perpetuação, ou não, do organismo recipiente (Arnold, Huang, & Hanage, 2022; Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021; Boto, 2009).

A THG é uma potente forma de adaptação de bactérias a seus ambientes. Estudos indicam que, na natureza, microrganismos absorvem e descartam genes conforme necessário, em resposta ao seu ambiente (Goldenfeld & Woese, 2007). A transferência de genes associados a processos metabólicos viabiliza a nutrição de microrganismos, antes inaptos, em novos nichos (Arnold *et al.*, 2022). No contexto da patogenicidade, permite adquirir um perfil mais virulento, causando infecções mais invasivas ou agressivas do que as causadas pelo mesmo organismo que não adquiriam tais genes (Bakkeren *et al.*, 2022; Newson *et al.*, 2022). Quando observada pela perspectiva da disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos, a THG desempenha um papel preocupante no cenário mundial, associado à saúde pública. O surgimento de microrganismos com perfis de resistência ou suscetibilidade reduzida aos antimicrobianos, não somente dificulta o tratamento de infecções por antibioticoterapia, como torna estudos epidemiológicos sobre essas bactérias e seus perfis de resistência, mais complexos. (Fang, Liu, Jiang, Mu, & Huang, 2024; Oladeinde *et al.*, 2021).

Entende-se que THG é um processo natural entre microrganismos, em que as vantagens adquiridas podem ser perpetuadas, a depender do custo para o *fitness* que essa aquisição e manutenção possa trazer ao microrganismo (Guardatti, Kraychete, & Picão, 2024; Prensky, Gomez-Simmonds, Uhlemann, & Lopatkin, 2021). Considerando ser um processo que pode ocorrer entre indivíduos de diferentes espécies e, em alguns casos, até mesmo diferentes domínios (Guljamow *et al.*, 2007; Nelson-Sathi *et al.*, 2015), há a necessidade de uma versatilidade de mecanismos que envolvam esses processos de transferência. Tais processos ocorrem através dos elementos genéticos móveis (EGM).

1.7.1 Elementos genéticos móveis

Elementos genéticos móveis (EGM) são estruturas genéticas passíveis de serem transferidas verticalmente e horizontalmente entre microrganismos. Como mencionado acima, há a possibilidade de transferência entre organismos de diferentes espécies e domínios taxonômicos, o que demonstra uma versatilidade de mecanismos moleculares envolvidos no processo de transferência (Guljamow *et al.*, 2007; Nelson-Sathi *et al.*, 2015). Entre os principais EGM descritos na literatura, estão os plasmídeos, prófagos, sequências de inserção, transposons e integrons; todos elementos genéticos que estão envolvidos no processo evolutivo de microrganismos (Frost *et al.*, 2005; Vale, Lehours, & Yamaoka, 2022) Neste trabalho, foram explorados apenas os plasmídeos e prófagos como EGM.

Para que a THG ocorra, é necessário a presença de algum vetor ou aparato molecular que viabilize a passagem do material genético de um microrganismo para outro. Dessa forma, foram caracterizados 4 mecanismos de THG. Esses mecanismos são: (i) transformação, caracterizada pela incorporação de material genético disperso no ambiente por uma bactéria transformante; (ii) transdução, incorporação de material genético viral, mesclado com o de outra bactéria, no genoma bacteriano, após a reprodução lisogênica ou lítica de um bacteriófago; (iii) conjugação, transferência de um plasmídeo de uma bactéria doadora para uma conjugante; e (iv) transposição, ocorrência de transposons, cassetes de DNA que se replicam ou se transferem para outras regiões do genoma e entre diferentes materiais genéticos, como plasmídeos e prófagos (Partridge *et al.*, 2018; Snyder *et al.*, 2014).

Os plasmídeos são moléculas de dupla fita de DNA, em sua grande maioria, circulares com quantidade de pares de base variável. Alguns autores classificam os plasmídeos como sequências nucleotídicas autorreplicantes, que não possuem genes essenciais para a replicação celular (*housekeeping*); (Snyder *et al.*, 2014). Entretanto, Anda *et al.* (2015) notifica a ausência do operon de RNA ribossomal (RNAr) no cromossoma de isolados do gênero *Aureimonas* sp. Todavia, a bactéria carrega o seu único operon em várias cópias (18 a 34 cópias) de um pequeno plasmídeo (9,39 kpb). Os plasmídeos podem ser classificados como conjugativos ou não conjugativos. Os plasmídeos conjugativos apresentam todo o aparato necessário para a sua conjugação, como um sítio *oriT* (sítio de origem da replicação), relaxases MOB (*mobilization*) e MPF (*mate-pair formation*) Os genes MOB são responsáveis por mobilizar a cópia recém-

replicada do plasmídeo para a nova célula, enquanto os genes MPF formam o canal que viabiliza a passagem do plasmídeo entre as células (Bañuelos-Vazquez, Torres Tejerizo, & Brom, 2017; Waksman, 2019). Os plasmídeos não conjugativos, entretanto, apresentam um sítio *oriT*, mas não contém os genes que codificam as proteínas MOB e MPF. Para que a sua conjugação ocorra, outro plasmídeo conjugativo (plasmídeo ajudante) deve estar dentro da célula com ele, disponibilizando MOB e MPF (Coluzzi *et al.*, 2022).

Na sua descrição, os plasmídeos são, ainda, identificados de acordo com os seus grupos de incompatibilidade (Inc.). A incompatibilidade de um plasmídeo se refere à impossibilidade de permanência de dois ou mais plasmídeos de um mesmo grupo Inc. em uma mesma célula. Essa característica se dá pela possibilidade de regulação da replicação de um plasmídeo pelo outro fazendo com que um plasmídeo possa ser favorecido tanto no processo de replicação, quanto no encaminhamento de cópias para as células filhas. (Helinski, 2022; Novick, 1987). Ao todo, são conhecidos 28 grupos Inc. na família *Enterobacteriaceae*, com alguns grupos Inc. mais abundantes, como os grupos IncF, IncI, IncA/C e IncH (Rozwadowsicz *et al.*, 2018). Vale destacar que a ocorrência de muitos desses plasmídeos tem uma estreita correlação com a bactéria em que ocorrem, assim como os genes de resistência que carregam. (Carattoli, 2009; McMillan, Jackson, & Frye, 2020; Rozwadowsicz *et al.*, 2018), como descrito na **Tabela 1**.

Assim como a associação entre plasmídeos e genes de resistência, alguns plasmídeos estão associados com genes de virulência. É visto no gênero *Salmonella* a ocorrência de plasmídeos de virulência (pSV – *Salmonella Virulence plasmids*) em um grupo estrito de sorovares, sendo eles Abortusovis, Cholerasuis, Dublin, Gallinarum, Paratyphi C, Sendai, Enteritidis e Typhimurium. Entretanto, a ocorrência de genes de virulência em plasmídeos de *Salmonella* está associada ao grupo IncF, frequentemente carregando os genes *spvBCR* de virulência (Silva, Puente, & Calva, 2017). Em uma revisão bibliográfica feita por Yang *et al.* (2021), todos os plasmídeos de virulência de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* foram associados aos grupos IncF e IncHI, carregando os operons *iroBCDN*, *iucABCD*, *iutA*, *rmpA* e *rmpA2*, o que reforça a característica de plasmídeos apresentarem (pelo menos em algumas situações) um perfil conservado de associação com genes específicos em determinados microrganismos.

Tabela 1 – Associação entre grupos de incompatibilidade (Inc) carreadores de genes de resistência aos antimicrobianos e diferentes microrganismos

Grupo Inc	Associação com resistência ao antimicrobiano	Microrganismos
F	aminoglicosídeos, tetraciclinas, trimetoprim, cloranfenicóis, β -lactâmicos, sulfonamidas, e fluoroquinolonas	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. sonnei</i>
C	aminoglicosídeos, tetraciclinas, trimetoprim, cloranfenicóis, β -lactâmicos e sulfonamidas	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. marcescens</i>
H1 e H2	aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicóis, β -lactâmicos, sulfonamidas, e fluoroquinolonas	<i>C. youngae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>
N	β -lactâmicos e fluoroquinolonas	<i>E. coli</i> , <i>K. ascorbata</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>
I1	aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicóis, β -lactâmicos e sulfonamidas	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. sonnei</i>

Tabela adaptada de Carattoli (2009) e McMillan, Jackson, & Frye (2020)

A transferência de material genético por bacteriófagos, aqui chamados de fagos, ocorre através do seu ciclo replicativo. Vírus são considerados organismos não vivos, pela sua necessidade de infectar um organismo vivo e usufruir da maquinaria genética, permitindo a sua replicação (Madigan, Martinko, & Bender, 2016). No caso dos bacteriófagos, o ciclo replicativo ocorre no citoplasma de bactérias e pode levar, ou não, à morte da bactéria hospedeira após o fim da sua replicação. São conhecidos dois ciclos replicativos de bacteriófagos, sendo eles: (i) ciclo lítico, que é caracterizado pela replicação do DNA/RNA viral e produção das partículas virais, levando ao rompimento da membrana celular bacteriana (lise), no fim do ciclo replicativo; e (ii) ciclo lisogênico, que é caracterizado por fagos capazes de integrar o seu DNA ao cromossoma bacteriano, ou mantê-lo na forma de plasmídeo, sendo chamados de prófagos nesse estágio. O seu material genético é replicado junto ao bacteriano, onde o prófago apenas sairá do estado lisogênico se a célula for infectada por outro fago ou sofrer dano ao DNA cromossomal, induzindo o prófago a entrar no ciclo lítico (Snyder *et al.*, 2014). Nesse sentido, os prófagos são os agentes virais responsáveis por introduzir material genético exógeno no cromossoma bacteriano.

Devido à sua capacidade de se inserir no cromossoma bacteriano e, em situações de estresse, excisar a célula hospedeira, o fago pode carrear genes e sequências nucleotídicas da bactéria previamente infectada, para uma nova (Nepal, Houtak, Wormald, Psaltis, & Vreugde, 2022; Touchon, Sousa, & Rocha, 2017). Em um estudo realizado por Kodo, Kawano e Sugai (2021), foi investigada a ocorrência de prófagos contendo genes de virulência e resistência aos antimicrobianos em diferentes patógenos nosocomiais (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *E. coli*). Foram quantificados quantos prófagos continham genes de resistência aos antimicrobianos, totalizando 41, enquanto 66 prófagos continham genes de virulência, e uma baixa quantidade de prófagos continham ambos os tipos de genes. Os dados revelam que todas as espécies apresentaram prófagos contendo genes de resistência aos antimicrobianos. A ocorrência de genes de virulência, entretanto, não foi ubíqua entre as espécies, onde *A. baumannii* não apresentou qualquer prófago contendo genes de virulência, enquanto *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* apresentaram uma baixa proporção. Os genes encontrados nos prófagos de cada representante também variaram, na medida em que cada espécie/gênero abordado no estudo, continha prófagos com genes específicos que eram, em baixa frequência, comuns aos outros representantes. Esse trabalho suporta a hipótese

de que os prófagos, assim como os plasmídeos, são EGM com perfis característicos e infectam preferencialmente alguns microrganismos em detrimento de outros.

1.7.2 Elementos genéticos móveis em *Salmonella* sp.

A literatura acerca do gênero *Salmonella* é extensa, e relata uma diversidade de tipos de plasmídeos e fagos que evidencia o genoma diverso do gênero (McMillan *et al.*, 2020; Mottawea *et al.*, 2018).

Embora nenhum plasmídeo seja exclusivo de um dado sorovar, em alguns casos é possível observar forte associação entre sorovares e grupos Inc carregando genes específicos (McMillan *et al.*, 2020; Rychlik, Gregorova, & Hradecka, 2006). Essas recorrências são vistas com plasmídeos IncC codificando *strAB*, *sul2*, *tetAR*, *bla_{CMY-2}* e *floR* em Newport e Dublin (Carroll *et al.*, 2017); IncF, codificando o operon *spv* em Abortusovis, Abortusequi, Enteritidis, Cholerasis, Typhimurium, Gallinarum e Sendai (Anzai *et al.*, 2005; Silva, Puente, & Calva, 2017); e o plasmídeo ColV com genes de *E. coli* para patogenicidade em aves, em Kentucky (Johnson *et al.*, 2010).

É possível também identificar, no relato de surtos ou da emergência de algum sorovar, a associação com EGMs considerados interessantes. Inúmeros estudos relataram a emergência de cepas de *Salmonella* Infantis carregando o plasmídeo nomeado pESI (*plasmid of Emerging Salmonella Infantis*), um IncP, com genes de resistência e virulência, como os genes *tetRA*, *sul1*, *dfrA*, e os operons *mer* (tolerância ao mercúrio), *ybt* (sideróforos de *Yersinia*, “*yersinbactin*”) e *fea* (fimbrias chaperonas) (Aviv *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2018). Uma linhagem de *S. Infantis* carregando um plasmídeo mosaico FIB-I2-P pESI-like portando a β -lactamase *bla_{CTX-M-65}*, foi associada, em 2018, a um surto nos EUA, com o adoecimento de 129 pessoas em 32 estados estadunidenses, com 1 morte decorrente da infecção (CDC, 2019c, McMillan *et al.*, 2020). Embora *bla_{CTX-M-65}* seja recorrentemente reportada em plasmídeos de *E. coli*, a sua ocorrência em *Salmonella*, ainda que documentada em diferentes regiões geográficas, esteve sempre associada ao mesmo plasmídeo mosaico (pESI) no sorovar Infantis (McMillan, 2020).

Outro estudo realizado por Cohen e colaboradores (2022) identificou a ocorrência do pESI em 10 isolados de *Salmonella* Muenchen que emergiram após 2018 em Israel. A análise evidenciou que a sequência do pESI identificado em Israel apresentava grande similaridade com sequências de pESIs isolados de uma amostra clínica de *S. Muenchen* descrita nos EUA em 2021 e outra obtida de amostra de fezes humanas na África do Sul em 2019. Ainda, buscando avaliar se o plasmídeo teria

especificidade seletiva para alguns sorovares, o grupo avaliou o potencial conjugativo desse plasmídeo, tendo uma cepa de *S. Infantis* e outra de *E. coli* como doadoras, bem como outros 11 sorovares de *Salmonella* como cepas receptoras. Os resultados apontaram que sorovares como Muenchen, Afula, Anatum, Kentucky, Typhimurium e *E. coli* apresentaram uma baixa frequência de conjugação, enquanto Enteritidis, Give, Infantis, Mbandaka e Virchow apresentaram uma alta frequência conjugativa. Esses dados demonstram que diferentes cepas de *Salmonella* apresentam probabilidades diferentes para adquirir o pESI, da mesma forma que o plasmídeo, uma vez alterado, pode desenvolver maior especificidade por certos sorovares hospedeiros.

No cenário nacional, há estudos que relatam a ocorrência de cepas de *Salmonella* carreando pESI e pESI-like, notadamente em *S. Infantis* (dos Santos *et al.*, 2022; dos Santos *et al.*, 2021). Mais recentemente, dos Santos e colaboradores também relataram a emergência, no Brasil, de *Salmonella* Minnesota carreando um plasmídeo pESM (*plasmid Emerging Salmonella Minnesota*), contendo determinantes de resistência (*tetA*, *sul2* e *bla_{CMY-2}*) e virulência (sideróforos de *Yersinia*) (dos Santos *et al.*, 2024).

A ocorrência de prófagos também é comum em *Salmonella*, e contribui para a diversidade genômica deste gênero bacteriano. Em um estudo realizado por Mottawea *et al.* (2018), foram avaliados 1.760 genomas de *Salmonella*, de 151 sorovares, e apenas três deles não apresentavam sequências nucleotídicas de prófagos. O grupo de Mottawea ainda reconheceu uma elevada prevalência do prófago de *Escherichia* MG1655, ocorrendo em 82 dos 151 sorovares testados, seguido do prófago de *Salmonella* SPN3UB em 63 sorovares, Gifsy 2 em 61 sorovares, e Gifsy 1 e o prófago de *Burkholderia*, BcepMu, em 60 sorovares. Os sorovares com maior ocorrência de prófagos foram: (i) Typhimurium (148 isolados), onde foi encontrada uma diversidade de 41 prófagos diferentes, com maior prevalência de BcepMu (99,3% dos isolados), seguido de Gifsy 2 (95,8%) e Gifsy 1 (91,7%); (ii) Heidelberg (196), com uma diversidade de 26 prófagos, BcepMu (100%), Gifsy 2 (97,4%) e prófago de *Salmonella* 118970 sal4 (92,3%); e (iii) Enteritidis (208), com uma diversidade de 21 prófagos, com destaque para o prófago de *Erwinia* vB EamP S6 (96,2%), Gifsy 2 (95,8%) e prófago de *Salmonella* SJ46 (88,5%).

Genes essenciais para a patogenia de *Salmonella* também ocorrem em prófagos. Um exemplo é o gene *sopE*, uma proteína efetora dependente do T3SS1 responsável por induzir a fagocitose da bactéria pela célula hospedeira, que ocorre em SopEP de *S. Typhimurium*, (Diard *et al.*, 2017; Mirolid *et al.*, 1999). Da mesma forma, os genes *gogB* (anti-inflamação) em Gifsy 1; *sodCI* e *sseI* (ação antioxidante e evasão do sistema imune,

respectivamente) em Gifsy 2; *sspHI* (interfere nas vias de ubiquitinação da célula hospedeira) em Gifsy 3; e *nanH* e *sodCIII* (produção de ácido siálico como fonte de carbono e ação antioxidante, respectivamente) em FELS-1 (Kropinski *et al.*, 2007).

Embora a transmissão de genes de resistência aos antimicrobianos não seja tão associada a eventos transducionais como é pela conjugação de plasmídeos, os prófagos são capazes de mediar a transferência horizontal desses genes. Schmieger e Schicklmaier (1999) verificam a transdução de genes *cam* (cloranfenicol) e *amp* (ampicilina) pelo prófago PDT17, e dos genes *cam*, *amp* e *tet* (tetraciclina) por ES18 para uma cepa *S. Typhimurium* DT104. Resultados semelhantes foram encontrados por Bearson *et al.* (2014), que, após a indução de estresse celular, demonstraram a co-transdução de SGI1 (*Salmonella Genomic Island 1*), contendo *floR* e *bla_{pse-1}*, e *tetG* para uma cepa DT104. Outros estudos também relatam a transdução de *bla_{CMY-2}* e *tetAB*, por um prófago P24 de uma *S. Heidelberg* para uma *S. Typhimurium*; assim como a transdução de um epissomo (plasmídeo integrado ao genoma) com resistência à canamicina entre cepas de *S. Typhimurium* (Colavecchio *et al.*, 2017).

A ocorrência desses EGM em *Salmonella*, no contexto de saúde pública, deve ser considerada quando forem pautadas medidas de vigilância de patógenos e resistência, como a realizada pelo *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS) nos EUA. O potencial que esses EGM possuem em disseminar genes de resistência, que podem complicar o tratamento de infecções invasivas por *Salmonella*, assim como a disseminação de genes de virulência, que aumentam o potencial patogênico desses microrganismos, deve ser considerado por agências sanitárias nacionais.

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 relatado como associado a vegetais. Por exemplo, surtos causados pelo consumo de chocolates, sucos 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 relatando 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, a identificação e caracterização de 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 nasceu de uma iniciativa do Joint Institute for *Food Safety and Applied Nutrition* (JIFSAN), órgão que congrega a Universidade de Maryland e o *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos, com o objetivo de 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 fizeram parte do projeto (Estados Unidos, México, Chile e Brasil). No Brasil, duas regiões geográficas foram envolvidas (Rio de Janeiro e Paraíba).

No polo Rio de Janeiro, nosso grupo de pesquisa coordenou as ações com apoio da Dra. Rossiane de Moura Souza, da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO/RJ), realizando amostragens em cerca de 117 pontos de coleta d'água de duas grandes regiões com atividades agropecuárias distintas no estado: vários pontos próximos às cidades de São José do Vale do Rio Preto e Teresópolis, localizados na bacia do Piabanha (Pb), os quais estavam mais associados à produção de aves de corte e olericultura; e pontos na região de Vassouras e Paty de Alferes, localizados na bacia do Médio Paraíba do Sul (MPS), uma importante área de produção leiteira. Para isso, um

grande esforço coletivo, efetivado por uma equipe que envolveu, professores, técnicos e alunos de graduação e pós-graduação, foi realizado de 2019 a 2022 (inclusive durante a pandemia de COVID), com a finalidade de compor uma coleção de amostras robusta e representativa.

Assim, o presente projeto se dedica a caracterizar esta coleção de amostras de *Salmonella* obtidas no Rio de Janeiro após 3 rodadas de coletas em cada um dos pontos (exceto quando algum destes não esteve acessível por algum motivo específico), quanto à diversidade de sorovares, sua associação com a região e atividade produtiva local, e aspectos de resistência a antimicrobianos e virulência dos isolados. Eu, pós-graduando que apresento esta dissertação, colaborei com todas as etapas do processo, desde o início do projeto, em 2019, quando ainda estava na graduação. A descrição da composição da coleção neste documento se justifica pela relevância da compreensão da mesma para a discussão dos dados obtidos com as análises genômicas que foram realizadas.

A realização deste projeto possibilita, para além do interesse científico em conhecer a ocorrência deste microrganismo em águas do estado, estudos futuros 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.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Investigar a ocorrência de *Salmonella* sp. em águas superficiais de diferentes bacias hidrográficas em regiões agropecuárias, caracterizar os isolados obtidos de acordo com os seus sorovares, viruloma, resistoma, plasmidoma e avaliar se as características das regiões próximas aos pontos de coleta amostrados (no que diz respeito às atividades econômicas desenvolvidas e seu nível de urbanização) impactam na frequência, diversidade e características dos isolados caracterizados.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ocorrência de *Salmonella* sp. em águas superficiais de duas regiões agropecuárias em bacias hidrográficas distintas no estado do Rio de Janeiro.
- Identificar tais isolados de acordo com os seus sorovares e *Sequence Types* (STs), compondo uma coleção de amostras que represente a diversidade de isolados obtidos nos respectivos pontos de coleta.
- Reportar o viruloma, resistoma e plasmidoma dos isolados, e avaliar a associação destes marcadores com sorovares e com as características dos pontos de coleta incluídos no estudo.

4 METODOLOGIA

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

A coleta das amostras de águas das bacias hidrográficas do Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb) foi estabelecida em 4 diferentes rotas, sendo duas rotas para a bacia de MPS e duas rotas para Pb (**Figura 4**).

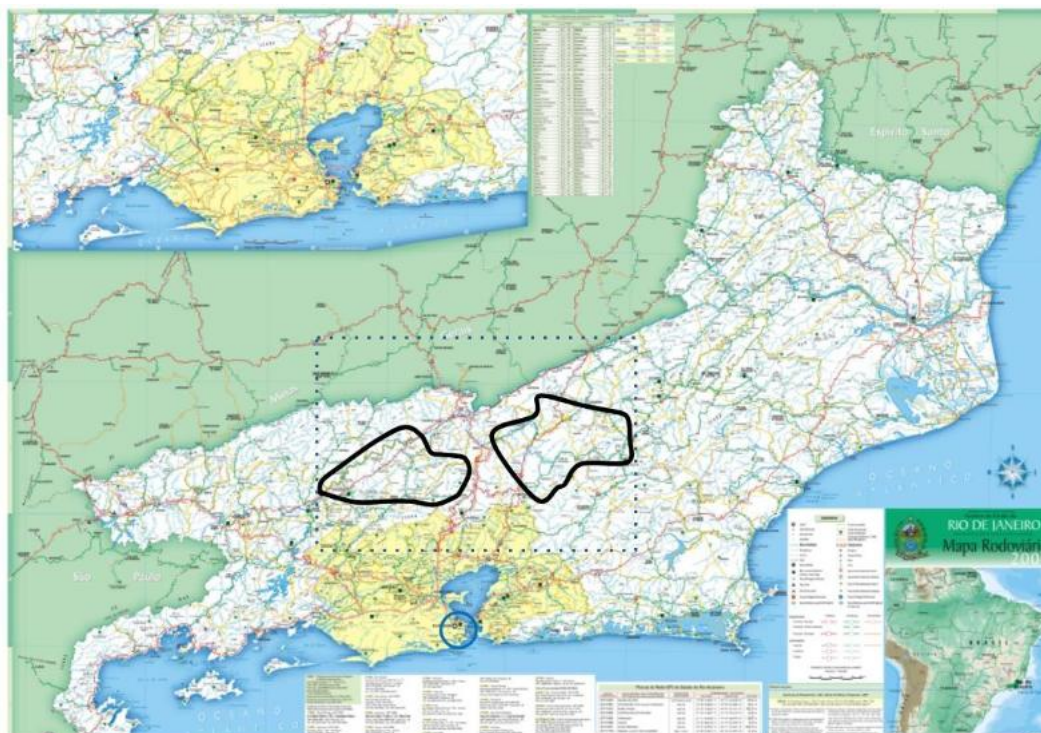


Figura 4 – Áreas de amostragem no estado do Rio de Janeiro. Com o perímetro delimitado das duas regiões, é possível dimensionar o impacto e abrangência do estudo quando comparado ao tamanho do estado do Rio de Janeiro.

Ao final de cerca de 2 anos e meio de coleta foram avaliadas 313 amostras de água de 117 pontos de coleta em ribeirões, córregos e rios pouco caudalosos que passam dentro ou próximos a propriedades com atividade agropecuária. Tais pontos foram definidos com o apoio da pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO), Dra. Rossiane de Moura Sousa, ao longo das quatro rotas (33 na rota I de Pb; e 27 na rota II de Pb, 28 pontos na rota I de MPS; 29 na rota II de MPS) (**Figura 5** e **Figura 6**). Amostras analisadas no presente projeto foram coletadas entre novembro de 2019 e dezembro de 2022.

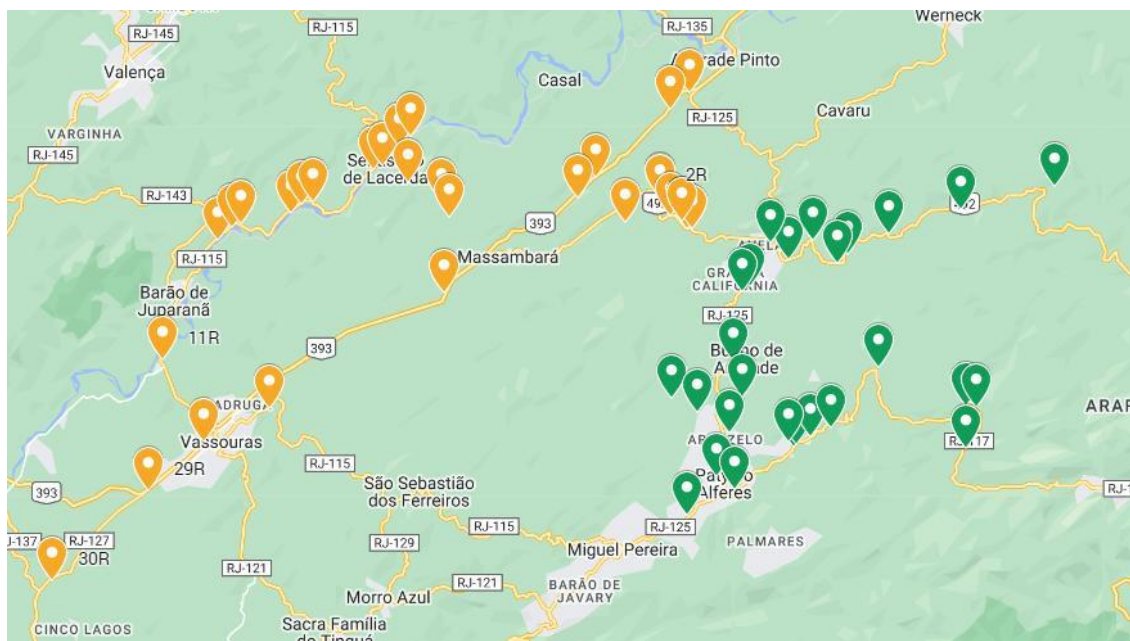


Figura 5 – Rota I e II para coleta de água impactada por atividade agropecuária na bacia hidrográfica do Médio Paraíba do Sul (MPS). A primeira rota (Rota I) de MPS está representada pelos pontos de coleta em amarelo, enquanto a segunda rota (Rota II) de MPS está representada em verde. Imagem obtida pela inserção de coordenadas dos pontos de coleta no aplicativo Google Maps.

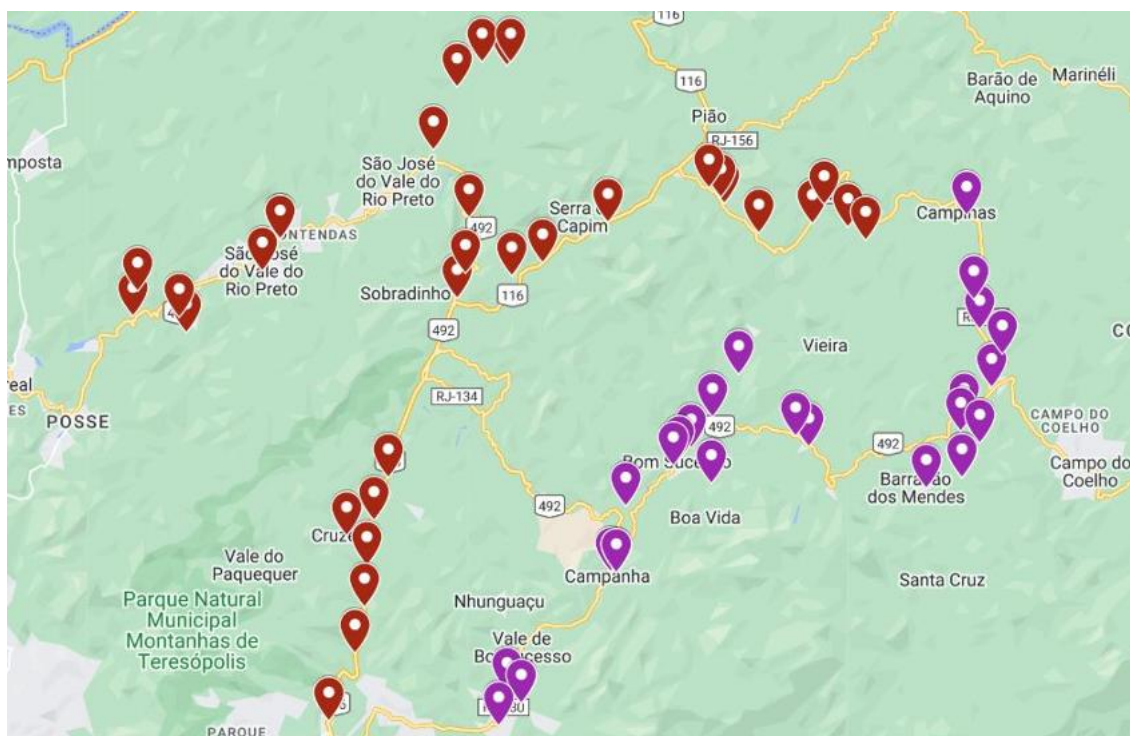


Figura 6 – Rotas I e II para coleta de água impactada por atividade agropecuária na bacia hidrográfica do Piabanha (Pb). A primeira rota (Rota I) de Pb está representada pelos pontos de coleta em grená, enquanto a segunda rota (Rota II) de Pb está representada pelos pontos em roxo. Imagem obtida pela inserção de coordenadas dos pontos de coleta no aplicativo Google Maps.

Foram realizadas viagens com pernoite para coletas de uma rota por vez (coleta de cerca de 15 pontos por dia, cerca de 30 pontos por campanha), 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 seguinte acontecesse. Os pontos identificados nos mapas das Figuras 5 e 6 correspondem às coordenadas de GPS dos pontos de coleta de cada região (Google Maps). Ambas as regiões estão associadas à produção de animais (criação de bovinos e frangos) e olericultura (cultivo de hortaliças). Entretanto, a predominância de atividade de cada região é diversificada. A região de MPS corresponde a uma bacia leiteira bovina com alguma atividade de olericultura. Enquanto a região de Pb possui uma intensa atividade de criação de frangos de corte, além da olericultura pujante. Alguns poucos pontos são próximos também de regiões habitadas, outros de mata virgem. Esta caracterização mais refinada dos pontos de coleta foi incorporada na dissertação para tornar mais completa a análise dos resultados.

A coleta de material microbiano foi realizada através de um aparato que utiliza um *swab* de Moore modificado como artefato para filtração da água (Sbodio *et al.*, 2013). Para tanto, um *Swab* de Moore (cartucho de gaze enrolada – **Figura 7A**) foi inserido em um aparato de PVC (**Figura 7B**), e ligado a uma bomba que propulsiona a água a passar pelo *swab* (**Figura 7C**). Esta montagem forma um conjunto que pode ser submerso no corpo d'água de interesse. Neste projeto, foi padronizada a passagem de água pelo *swab* por 10 minutos. Após a filtração, o *Swab* de Moore contendo material biológico a ele aderido era transferido para em um frasco contendo 100 mL de água peptonada tamponada (Buffered Peptone Water – BPW, Difco, Spark, Maryland, EUA) (**Figura 7D**), para estabilização das células coletadas, e mantido sob refrigeração durante todo o tempo até chegar ao laboratório.

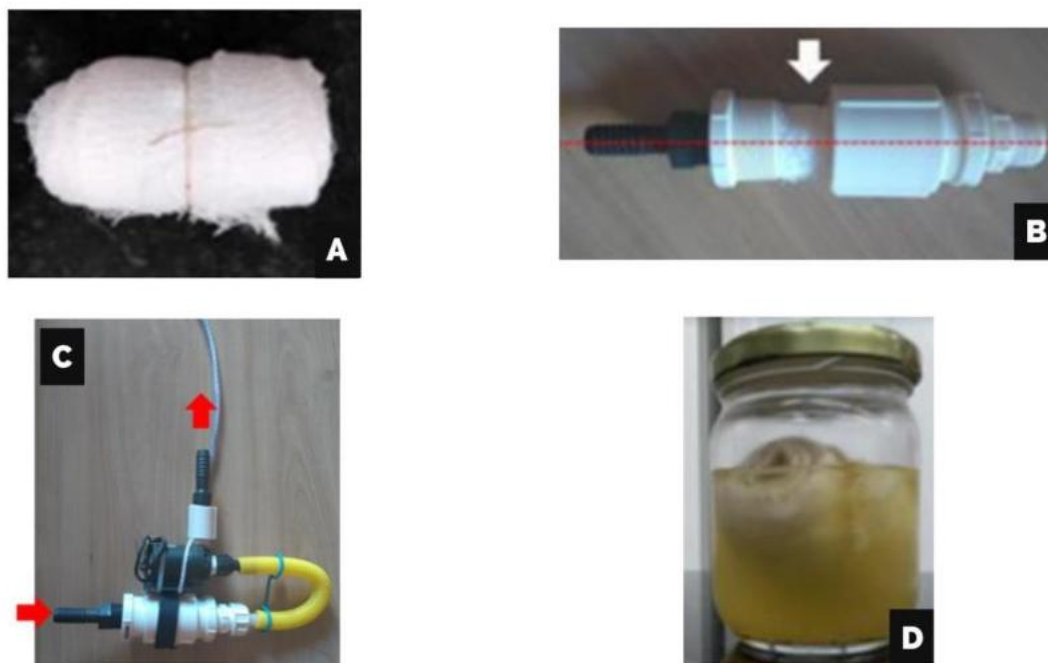


Figura 7 – Equipamentos utilizados na coleta de amostras de água para pesquisa de *Salmonella* sp. (A) Swab de Moore, estrutura formada de gaze a qual detém o material biológico presente nos corpos d'água que se objetiva amostrar; (B) aparato de PVC que funciona como suporte para o Swab de Moore que é imerso em corpos d'água (a seta branca indica o ponto de abertura para a inserção do Swab no sistema); (C) sistema completo consiste no aparato de PVC contendo o swab, conectado à bomba e ligado à bateria (setas vermelhas indicam o fluxo de água); (D) Swab de Moore em água peptonada.

4.2 Caracterização dos pontos de coleta

A caracterização dos pontos de coleta em MPS e Pb foi feita empiricamente, onde as características eram observadas e anotadas. Alguns pontos cercados por mata densa, em topologias mais baixas, ou com a menor possibilidade de avaliação do entorno, foram caracterizados com o auxílio de Google Maps e QGis, para a verificação da ocorrência e caracterização da atividade econômica de alguma propriedade próxima ao ponto.

Os pontos foram caracterizados com base na presença de propriedades exercendo alguma atividade econômica (AE), assim como pelo nível de urbanização (NU). As AE, foram caracterizadas pela presença de pastos de gado, granjas de frango e plantios voltados para olericultura. Todos os pontos, sem exceção, foram caracterizados quanto ao NU, onde áreas sem evidências de moradias ou com, no máximo, uma residência isolada, foram caracterizadas como rurais; áreas com pequenas comunidades de moradores (em geral os próprios proprietários e trabalhadores da terra ou granja) foram caracterizadas como semiurbanas; e áreas com uma certa estrutura social, apresentando comércio, escolas ou centros religiosos, foram denominadas urbanas. Quanto às AE, para a maioria dos pontos foi possível identificar uma ou duas AE (visivelmente, ou com o

auxílio de ferramentas digitais). Entretanto, alguns pontos claramente estavam em região cujas águas sofriam impacto do seu entorno, mas não tinham a presença de alguma AE aparente, o que levou à sua caracterização apenas de acordo com a bacia hidrográfica em que estava e seu respectivo NU.

4.3 Recuperação e isolamento de *Salmonella*

Com a chegada do material ao laboratório, iniciou-se o processamento para recuperação de *Salmonella*. Primeiramente, os frascos contendo os *swabs* na água peptonada foram incubados a 35 °C – 37 °C por um período de 18 – 24 horas, para recuperação e crescimento não seletivo das células bacterianas obtidas. Após este período o crescimento em água peptonada tamponada foi repicado para tubos contendo dois diferentes meios de enriquecimento seletivos para *Salmonella*, sendo 1 mL no Caldo Tetratonato (TT, Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid, Espanha) e 0,1 mL no Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid, Espanha), e incubados novamente por cerca de 18-24 horas a 42 °C.

Em seguida, cada um dos tubos contendo meio de enriquecimento (TT e RV) foram repicados em placas de ágar *Salmonella-Shigella* (SS, Difco, Sparks, Maryland, EUA) e ágar Xilose-Lisina Tergitol-4 (XLT4, Difco, Sparks, Maryland, EUA); acrescido de um suplemento para XLT4 (Difco, Sparks, Maryland, EUA); meios seletivos e indicadores utilizados para o isolamento do microrganismo (BRASIL, 2011). As culturas foram incubadas a 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) foram selecionadas e repicadas para tubos contendo meio de estoque semissólido, contendo Caldo Lúria Bertani (Difco, Sparks, Maryland, EUA), acrescido de Bacto Ágar (Difco, Sparks, Maryland, EUA) em uma concentração de 0,6% do volume total e incubadas a 37°C por 18 – 24 horas (estoque provisório). Esta cultura estoque foi submetida a testes de identificação das amostras e, posteriormente, estocada a -80°C, com glicerol a 80%, no caso de isolados identificados como *Salmonella*.

A nomenclatura estabelecida para as colônias isoladas foi baseada no espécime de água de onde foram isoladas, adicionada de um número relativo à 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.

Posteriormente, as colônias selecionadas 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 da amostra de água e o dígito “2” para a segunda análise da mesma amostra de água (uma segunda análise por vezes foi realizada a partir de material estocado, caso a primeira análise tenha gerado poucos isolados). Nenhuma amostra de água foi analisada por mais de duas vezes. Como exemplo ilustrativo, a décima segunda colônia da terceira amostra de água obtida na primeira tentativa de obtenção de colônias típicas (primeira análise), foi identificada como W003-12-1.

4.4 Identificação bacteriana por MALDI-TOF

As bactérias estocadas foram identificadas por espectrometria de massas, através da técnica *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). Portanto, as amostras bacterianas foram, primeiramente, reativadas em ágar McConkey em semeadura confluyente e, então, incubadas por cerca de 18 a 24 horas a 35 °C – 37 °C. Em seguida, uma fração da colônia foi obtida 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, foi aplicado 1 µL de ácido fórmico a 70% (v/v) para a ruptura das células bacterianas e exposição das proteínas ribossomais. Logo após foi aplicado 1 µL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker, Bremen, Alemanha) 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 foi 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 foram avaliados e julgados a partir do score que apresentaram. 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*) ou sorovares (Typhi, Typhimurium, Enteritidis, Gallinarum, Infantis, + 2.600). As amostras com score igual ou maior do que 2.0 para o gênero foram estocadas e consideradas elegíveis para envio para sequenciamento.

4.5 Diferenciação de linhagens por RAPD

A seleção das amostras para envio para sequenciamento ao JIFSAN levou em consideração uma análise de todos os isolados de *Salmonella* obtidos a partir de cada amostra de água por *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) (Madico *et al.*, 1995). A incorporação desta etapa de triagem contribuiu para tornar a seleção das amostras menos aleatória, e deixar a coleção final a ser caracterizada abrangente e diversa. Esta etapa do processamento das amostras foi majoritariamente realizada pela Dra. Ana Paula de Souza da Silva, membro da equipe envolvida no projeto.

Para a realização do RAPD, o DNA molde foi obtido por lise térmica (colônias bacterianas frescas suspensas em 200 µL de água estéril foram levadas à fervura por 10 minutos), resfriadas em gelo por 5 min.

A reação de amplificação foi preparada com 2,5 µL do DNA template, 6 µL de *Master Mix Green* (Promega), 20 pmol de cada primer (1247 e 1283; conforme indicado no **Quadro 2**) e 50 mM de MgCl₂. 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, hibridização dos *primers* e síntese das fitas, respectivamente. Ao final, a reação é deixada por 10 minutos a 72 °C para uma extensão final.

Foram selecionadas para envio até 5 isolados de *Salmonella* por amostra de água, priorizando aqueles que apresentavam diferentes padrões eletroforéticos por RAPD, ou, na ausência de divergência, aqueles provenientes de diferentes placas de isolamento em meio diferencial seletivo.

Quadro 2 – 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

4.6 Preparo das amostras para sequenciamento e acesso às sequências

Os isolados bacterianos foram enviados ao FDA para sequenciamento e cultivados em ágar inclinado (Luria Bertani e Bacto Ágar, Difco). Após o envio, os isolados foram reativados em ágar de soja trípticase (TSA; Fisher Scientific Inc., Hampton, NH, EUA) e posteriormente transferidos para caldo de soja tríptico (TSB; Fisher Scientific Inc., Hampton, NH, EUA). A partir da cultura em TSB, o DNA dos isolados foi extraído utilizando o kit Maxwell RSC Cultured Cells DNA Kit (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Com o DNA extraído, foi preparada a biblioteca genômica em um equipamento de automação Sciclone G3 NGSx iQ Workstation (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, EUA), empregando o kit de preparo de DNA Illumina em conjunto com os índices UD de DNA/RNA da Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, EUA), utilizando os reagentes NextSeq 1000/2000 P2 (300 ciclos) (Illumina Inc.) para gerar leituras *paired-end* de 150 pares de base (pb), conforme descrito em Chen *et al.*, 2024. As sequências foram depositadas em um banco de dados genético do NCBI, com acesso disponível nos BioProject PRJNA186035 e PRJNA560080.

4.7 Montagem e análises genômicas

Para a identificação das espécies, subespécies, sorovares, genes de virulência, mecanismos de resistência, SPIs e análises filogenéticas, foi necessária a montagem do genoma completo sequenciado.

Para tanto, como tratamento preliminar dos dados, foi avaliada a qualidade das sequências de leitura (*reads*) obtidas pelo sequenciamento, seguida de trimagem (exclusão de partes com baixa qualidade e adaptadores) e nova avaliação da qualidade. Com o genoma montado, as análises específicas foram realizadas no servidor do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), através de *softwares* gratuitos, os quais estão depositados pelos desenvolvedores no GitHub (<https://github.com/>) ou em sites de acesso específicos. Uma visão geral do que foi feito pode ser observada na **Figura 8** e está detalhada nos tópicos a seguir.

4.7.1 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 *software* FastQC,

versão 0.11.9 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>; Andrews, 2010), o qual sintetiza informações que dizem respeito aos 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 e duplicidade de *reads*, entre outros fatores. Em seguida, as informações geradas para todas as amostras foram visualizadas em conjunto no *software* MultiQC, versão 1.13 (acesso em <https://multiqc.info/>; Ewels *et al.*, 2016).

Genomas que apresentaram sequências com *phred score* (índice que atribui um valor de qualidade para o sequenciamento de cada nucleotídeo) abaixo de 30, assim como a presença de adaptadores utilizados no sequenciamento, indicaram a necessidade de tratamento de qualidade antes de serem utilizadas nas análises. Outros parâmetros foram: presença de ruído nos primeiros e últimos pares de base das sequências (Del Fabbro *et al.*, 2013). Para isso, foi usado o *software* Trimmomatic, versão 0.39 (acesso em <https://github.com/usadellab/Trimmomatic>; Bolger, Lohse, & Usadel, 2014).

Assim, através do Trimmomatic, foram removidos os adaptadores das sequências das amostras, baseados nos moldes dos seguintes adaptadores utilizados no sequenciamento por Illumina: NexteraPE-PE.fa; TruSeq2-PE.fa; TruSeq2-SE.fa; TruSeq3-PE- 2.fa; TruSeq3-PE.fa; TruSeq3-SE.fa. A remoção dos adaptadores foi feita com o seguinte comando: ILLUMINACLIP:adaptors.fa:2:30:10, onde “adaptors.fa” é um arquivo contendo todas as sequências nucleotídicas dos adaptadores em formato FASTA; seguido de “2”, que define o número máximo de *mismatches* entre o adaptador e a sequência para que ele seja removido; “30” indica que se houver uma sequência complementar (palindrômica) ao adaptador com qualidade maior do que 30, ela será removida; e “10” indica a correspondência mínima entre o adaptador e a sequência, para a sua remoção. Além da remoção dos adaptadores, foram aplicados três ajustes adicionais para melhorar a qualidade das sequências: “LEADING:20”, para eliminar bases de baixa qualidade no início da sequência (qualidade < 20); TRAILING:20”, para eliminar bases de baixa qualidade no final da sequência (qualidade < 20); e “MINLEN:30”, para remover sequências com menos de 30 nucleotídeos.

Após a trimagem, os dados foram novamente revisados quanto a problemas na qualidade pelos mesmos *softwares* citados acima, para então serem utilizados na montagem dos genomas como descrito a seguir

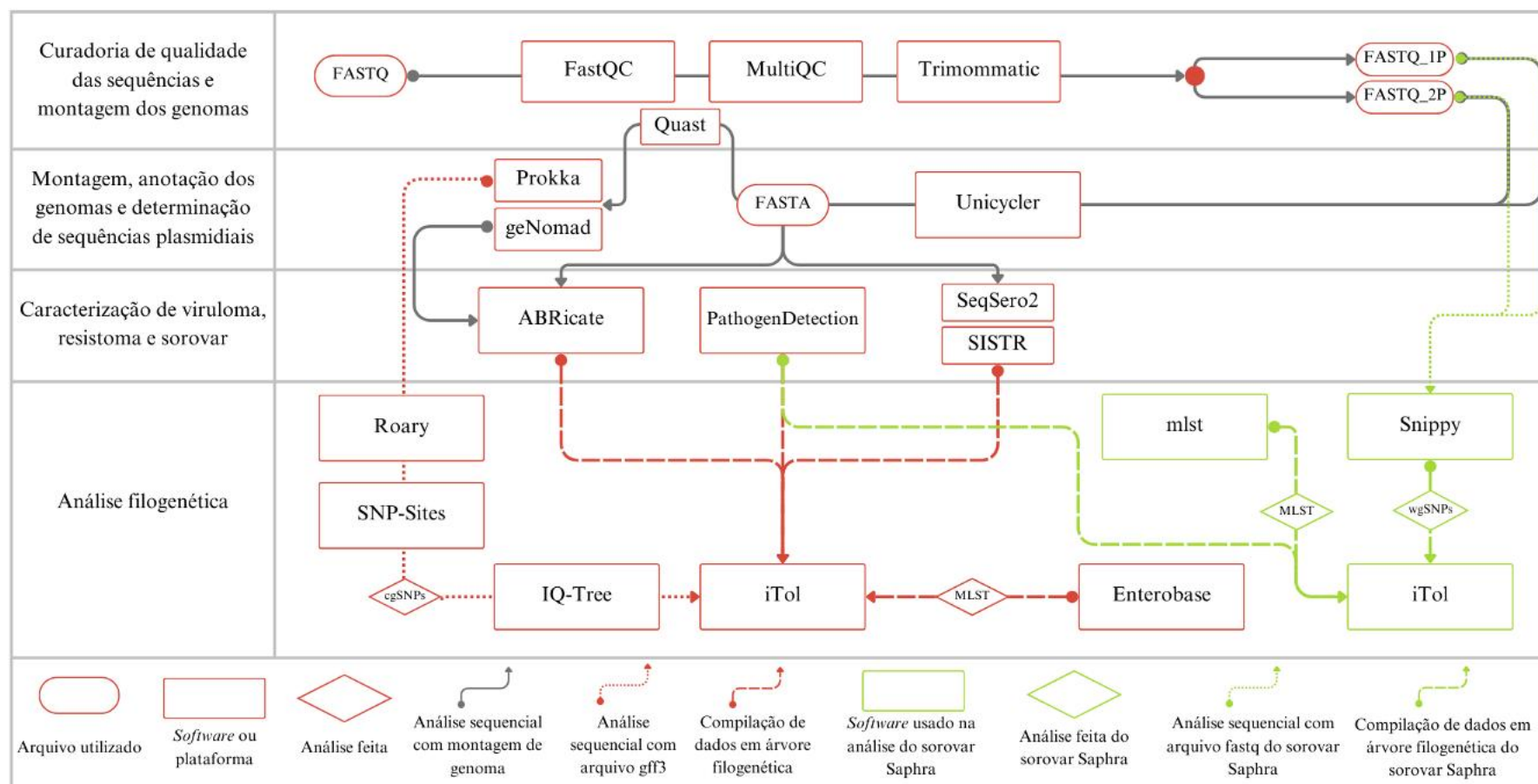


Figura 8 – Fluxograma da metodologia de bioinformática adotada neste estudo. Metodologia de bioinformática dividida em: (I) curadoria de qualidade das sequências obtidas pelo sequenciamento; (II) montagem do genoma e anotação dos genomas; (III) mapeamento de genes de virulência, resistência aos antimicrobianos e grupos Inc de sequências plasmidiais, identificação de perfis clonais e identificação dos sorovares de *Salmonella* sp.; (IVa) determinação dos core genes dos isolados e busca por SNPs nos core genes, compilação de dados e SNPs de core genes, viruloma, resistoma, isolados representantes de complexos clonais, identidade de sorovares e STs dos isolados em uma árvore filogenética de máxima verossimilhança; (IVb) identificação dos STs dos isolados de *S. Saphra* obtidos da plataforma PathogenDetection, identificação de SNPs de core genoma e compilação de dados em uma árvore filogenética de máxima verossimilhança.

4.7.2 Montagem dos genomas

A montagem do genoma em contigs foi realizada através do *software* Unicycler, versão 0.5.0 (acesso em <https://github.com/rrwick/Unicycler>; Wick *et al.*, 2017). Com os genomas montados, foi possível a tipificação das amostras e pesquisa dos genes de virulência, resistência e associados a grupos Inc, como especificado nos tópicos a seguir.

A qualidade de montagem dos genomas foi feita com o *software* Quast (Mikheenko, 2018), onde genomas com baixa taxa de GC% (abaixo da faixa de 52%), >100 contigs, baixo valor de N50 e alto valor de L50, foram investigados pela busca de uma possível contaminação na plataforma online BLASTn (acesso em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), e removidos da coleção, se necessário.

4.7.3 Identificação de sorovares *in silico*

A identificação taxonômica de *Salmonella* foi feita através do uso de dois *softwares*, SeqSero 2 versão 1.2.1 (acesso em <https://github.com/denglab/SeqSero2>; Zhang *et al.*, 2019) que permite a identificação a nível de sorovar, com base nas sequências nucleotídicas dos genes codificantes para os antígenos de superfície. A implementação do *software* SISTR (acesso em https://github.com/phac-nml/sistr_cmd; Yoshida *et al.*, 2016) foi feita para a confirmação de sorovares com identificação não estabelecida, como sorovares com perfis antigênicos parecidos, como Albany e Duesseldorf, Chincol e Emek, Molade e Wippra e Santiago e Belem. O SISTR, além de identificar a sequência nucleotídica dos genes, realiza uma análise de cgMLST para predição mais precisa. A identificação dos sorovares pelos *softwares* é feita pela análise do genoma completo de cada amostra em documento FASTA.

4.7.4 Exclusão de clones

Mesmo com o cuidado de envolver a técnica de RAPD na seleção de amostras para sequenciamento, não foi possível excluir a possibilidade de que amostras apresentando um mesmo perfil clonal tenham sido enviadas para sequenciamento. Este é um risco intrínseco na seleção de mais de uma colônia de *Salmonella* de uma mesma amostra de água. Dessa forma, para uma maior segurança de que os dados apresentados não incluíssem colônias clonais amplificadas durante o processo de recuperação para isolamento bacteriano de uma dada amostra de água, foi realizada, através de análise *in*

sílico, uma etapa de seleção. Nela, foi mantida na coleção analisada apenas uma representante de cada perfil clonal identificado por amostra de água.

Tal análise foi feita a partir de dados sobre a variação de Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs) entre *clusters* de isolados e uma mesma amostra, determinados pela plataforma *PathogenDetection*. Os isolados de uma mesma amostra de água que possuísem menos de 10 SNPs de variação no core genoma, foram considerados clonais.

4.7.5 Identificação de genes de virulência

A pesquisa de genes de virulência foi realizada através de um banco de dados disponibilizados pela plataforma *Virulence Factors Database* (VFDB; Chen *et al.*, 2016), 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, foi possível investigar nas amostras a ocorrência de genes comumente encontrados em outros microrganismos, como *Escherichia coli* e *Yersinia* sp.. Para tal análise foi utilizado o *software* Abricate, versão 1.0.0 (acesso em <https://github.com/tseemann/abricate>; Seemann, 2020), o qual utiliza o algoritmo de alinhamento entre sequências para a comparação entre as os genes providos pelo banco de dados específico que se deseja analisar (neste caso, o VFDB, com dezenas de genomas e sequências plasmidiais de cada um de 32 gêneros bacterianos) e o genoma fornecido. Nesta estratégia metodológica, quando é feita a comparação, caso a sequência seja identificada com um certo nível de identidade (possíveis mutações são levadas em consideração) e cobertura, tal genoma é identificado como portador, ou não, do gene de virulência. O Abricate possibilita a pesquisa por diversos genes de virulência em diversos genomas fornecidos concomitantemente, o que minimiza o tempo de análise.

4.7.6 Identificação de mecanismos de resistência à antimicrobianos

A identificação de mecanismos associados à resistência à antimicrobianos, como a presença de genes de resistência e mutações em genes específicos, foi feita com o uso de um banco de dados de genes de resistência disponibilizado pelo NCBI, no banco de dados do AMRFinderPlus (Feldgarden *et al.*, 2019). As mutações encontradas em genes

envolvidos em mecanismos de resistência, foram observadas através da plataforma online *PathogenDetection*, NCBI (acesso em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>).

A aquisição dos genes de resistência também foi investigada através do *software* Abricate, usando como referência o banco AMRFinderPlus.

4.7.7 Identificação de sequências plasmidiais e genes de virulência e resistência associados

A identificação de sequências plasmidiais contidas nos dados de sequenciamento dos genomas, foi feita com base na busca por sequências nucleotídicas pareáveis com sequências plasmidiais. O *software* utilizado foi o geNomad (Camargo *et al.*, 2024). Após a análise, um arquivo em formato FASTA foi gerado, contendo todas as contigs associadas a plasmídeos. Foram buscadas sequências de grupos Inc nesses arquivos FASTA, para que se pudesse rastrear contigs contendo sequências tipicamente plasmidiais. Para isso, foi utilizado o *software* Abricate com o banco de dados do PlasmidFinder (Carattoli *et al.*, 2014). As contigs que apresentaram a ocorrência de algum grupo Inc foram extraídas para busca por genes de virulência e resistência associados, seguindo a mesma metodologia de busca desses genes descrita acima (4.7.5 e 4.7.6).

4.7.8 Análise filogenética

A análise filogenética permite, além da identificação de cepas clonais, a identificação de sorovares filogeneticamente próximos dentro do gênero *Salmonella*, como por exemplo a diferenciação de sorovares pertencentes à espécie *Salmonella bongori* e dos sorovares das demais subespécies de *Salmonella enterica*, que não a subespécie *enterica*. Essa análise permite a avaliação da ocorrência 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. Além disso, pode ser abordada a perspectiva de disseminação de plasmídeos de virulência e resistência a antimicrobianos.

Para as análises filogenéticas, foram buscados nos genomas todos os genes comuns entre os isolados, ou *core genes*, chamado de pan-genoma. Neste caso, diferentemente do core genoma, não são incluídas sequências não codificantes e outras estruturas conservadas (regiões intergênicas). É uma análise mais permissiva, que

permite, ainda assim, observar divergências filogenéticas entre os sorovares, considerando as variações genômicas que esses apresentam.

Para tal análise, os genomas foram anotados quanto ao seu conteúdo gênico pelo *software* Prokka, versão 1.14.5 (acesso em <https://github.com/tseemann/prokka>; Seemann, 2014). Os arquivos de anotação foram submetidos ao *software* Roary (acesso em <https://github.com/sanger-pathogens/Roary>; Page *et al.*, 2015), para calcular e alinhar o pan-genoma dos isolados. A partir dessa análise, um arquivo multi-FASTA, com o pan-genoma de todos os 308 isolados, foi submetido ao *software* snp-sites (acesso em <https://github.com/sanger-pathogens/snp-sites>; Page *et al.*, 2016), para a busca por SNPs no arquivo de pan-genomas, o que facilita a análise.

Após a identificação dos SNPs no pan-genoma, o arquivo contendo o alinhamento dos SNPs foi utilizado para montar uma árvore filogenética de máxima verossimilhança, pelo *software* IQ-Tree (acesso em <http://www.iqtree.org/>; (Nguyen *et al.*, 2015), versão 2.3.6, no qual foi utilizado o modelo evolutivo TVM+F+ASC+R3, predito pela função *Model Finder* (MF) disponível (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). A árvore foi montada em 1000 bootstraps, pela função *UltraFast Bootstrap* (BB) disponível (Hoang *et al.*, 2018). 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 amostras analisadas, em conjunto com os metadados de STs, bacia hidrográfica de obtenção, genes de resistência e virulência.

Além da análise por SNPs, foi realizada a análise de MLST das cepas bacterianas, pela análise dos genomas da coleção através da plataforma online Enterobase (acesso em <https://enterobase.warwick.ac.uk/>). Os genomas podem ser acessados ao buscar pelos BioProjects, nos filtros de busca, em que estão inseridos. Ao acessar os genomas nessa plataforma, foi possível a montagem de uma árvore filogenética baseada nos STs de cada, utilizando o programa GrapeTree (não é possível inferir a versão do programa; acesso em <https://github.com/achtman-lab/GrapeTree>).

Ainda, foi feita uma análise de SNPs de core genoma para os isolados de *S. Saphra* e todos os genomas de *S. Saphra* disponíveis no NCBI. Para isso, os arquivos de dados brutos (FASTQ) dos genomas utilizados nessa análise, buscados na plataforma *PathogenDetection*, foram submetidos à identificação de SNPs de core genoma pelo *software* Snippy, versão 4.6.0 (acesso em <https://github.com/tseemann/snippy>), onde um genoma da nossa coleção foi utilizado como referência para a busca dos

SNPs. A construção da árvore seguiu os mesmos parâmetros da análise filogenética de core genes, porém utilizando o modelo evolutivo TVM+F+I. A análise de MLST foi feita com o *software* mlst, versão 2.23.0 (acesso em <https://github.com/tseemann/mlst>; com uso de componentes de <https://pubmlst.org/>; Jolley & Maiden, 2010). Os genes de resistência foram determinados pela plataforma *PathogenDetection*. Por fim, os dados foram compilados na plataforma iTol para a visualização da árvore filogenética.

4.8 Avaliação de associação da ocorrência de sorovares, genes de resistência e plasmídeos com bacias hidrográficas e atividade econômica das regiões

O teste estatístico de Fisher e *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95% foi utilizado para avaliar diferenças entre a ocorrência de *Salmonella* nas diferentes bacias hidrográficas. O teste de Fisher e Qui-Quadrado foram utilizados para avaliar associações de ocorrência de *Salmonella* com as diferentes atividades econômicas e níveis de urbanização. *p-valores* abaixo ($<$) de 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Análises estatísticas foram realizadas utilizando *softwares* Graphpad Prism, versão 9.5.1 e Past, versão 4.17.

5 RESULTADOS

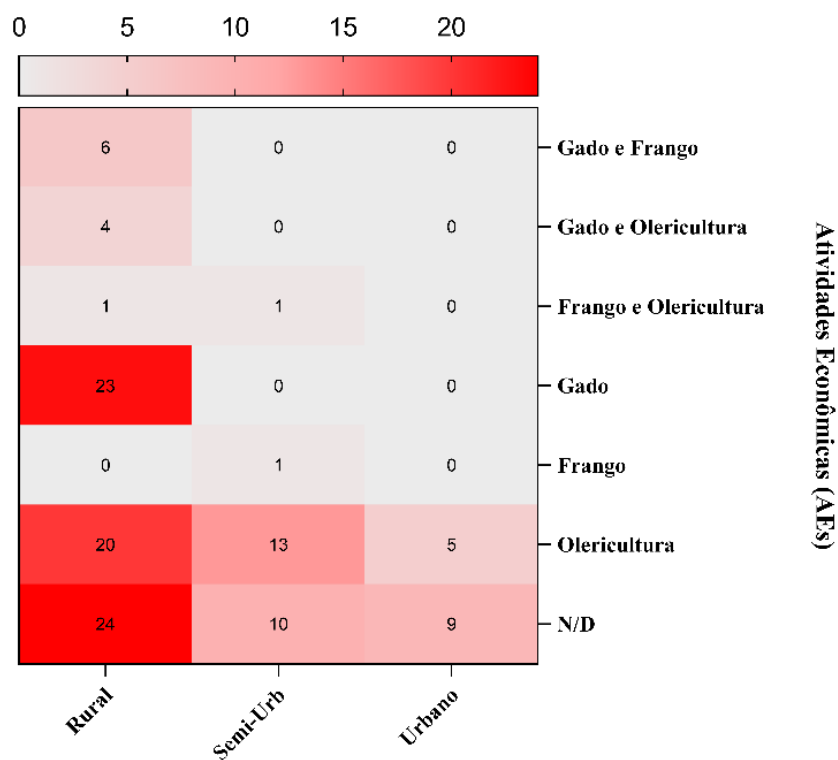
5.1 Caracterização dos pontos de coleta

De acordo com informações fornecidas pelos colaboradores da PESAGRO e observações realizadas *in loco* durante as coletas, dos 57 pontos em MPS, 28 são impactados por criação de gado, três por criação de frangos de corte e cinco por olericultura, sendo 46 deles em regiões rurais, seis em semiurbanas e cinco em urbanas. Para os 60 pontos em Pb, cinco são impactados por criação de gado, seis por frango de corte e 39 por olericultura, sendo 32 em regiões rurais, 19 semiurbanas e nove urbanas. Todos os pontos foram caracterizados de acordo com o seu NU. Entretanto, alguns pontos não aparentavam sofrer impacto de qualquer AE, enquanto em alguns casos, alguns pontos sofriam impacto de duas AE. As características e suas interseções estão representadas na **Figura 9**.

5.2 Obtenção de espécimes de água

Um total de 313 amostras de água foram coletadas e analisadas neste estudo. A maior parte dos pontos ($n = 65$) foi alvo de três coletas em momentos diferentes, mas alguns foram acessados apenas uma ($n = 16$) ou duas vezes ($n = 23$). Isso ocorreu com pontos que, em uma dada campanha de coleta, estavam inacessíveis devido a bloqueios da estrada por deslizamentos, seca do rio/riacho/córrego, não autorização para entrada na propriedade ou aumento da mata no caminho para o ponto de coleta, ou no próprio ponto de coleta. Alguns poucos pontos foram coletados quatro vezes ($n = 14$), por estarem presentes em coletas piloto do projeto. Entre as 313 amostras de água coletadas, 153 foram obtidas de MPS e 160 de Pb.

A partir do cultivo das 313 amostras coletadas foi verificada a ocorrência de *Salmonella* sp. em 181 amostras de ambas as bacias hidrográficas. A positividade foi maior entre as amostras de MPS (64%, 98/153) do que nas amostras de Pb (52%, 83/160), com uma diferença significativa na ocorrência de *Salmonella* entre as bacias hidrográficas analisadas (p -valor = 0,03). A presença de *Salmonella* foi 1,65 vezes mais associada à MPS, com um intervalo de confiança entre 1,05 e 2,60 [Odds Ratio (OR) = 1,65, IC 95%: 1,05 – 2,60] (**Figura 10**).



Níveis de Urbanização (NUs)

Figura 9 – Heatmap de caracterização dos pontos de coleta de acordo com o impacto de Atividades Econômicas (AE) e Níveis de Urbanização (NU). Caracterização dos pontos de coleta de acordo com o impacto sofrido pela NU e/ou AE próximas aos pontos de coleta. Eixo X indica os NU, enquanto o eixo Y indica as AE individuais e AE combinadas, referentes a pontos de coleta impactados por mais de uma AE. N/D indica a não descrição do impacto por AE.

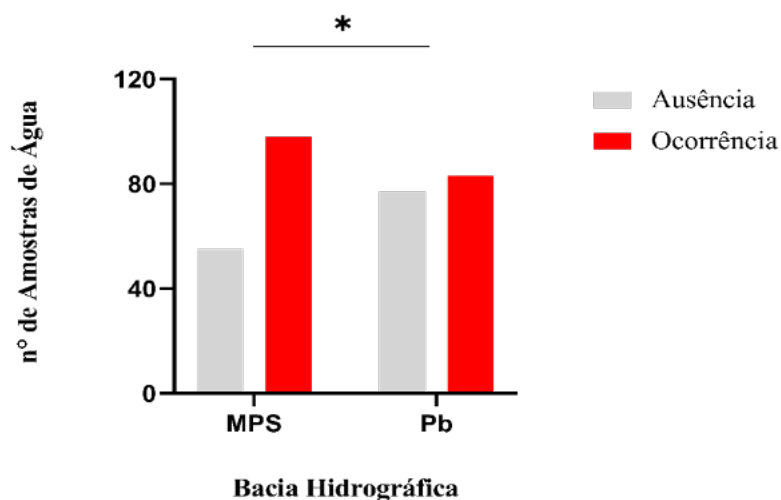


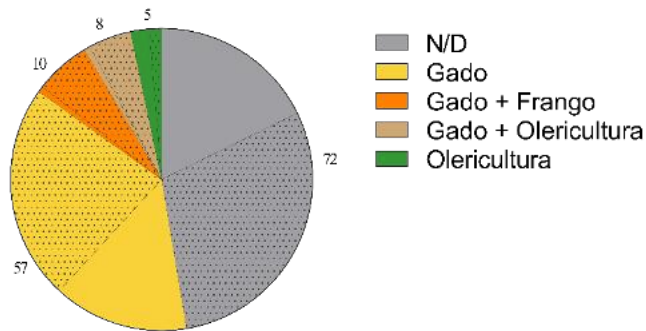
Figura 10 – Análise de ocorrência de *Salmonella* em amostras de águas superficiais (rios, riachos e córregos) em áreas próximas a propriedades agropecuárias nas bacias hidrográficas do Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb) do Rio de Janeiro. Colunas cinzas se referem às amostras onde não foi possível recuperar *Salmonella* sp., enquanto as colunas vermelhas se referem às amostras positivas para o cultivo de *Salmonella* sp.. O teste de Fisher foi utilizado; p -valor = 0,0304; OR = 1,65, IC 95%: 1,05 – 2,60.

A distribuição das amostras de água obtidas nas duas bacias hidrográficas de acordo com a AE e o NU do entorno dos pontos de coleta está apresentada na **Figura 11**. Na figura 11, o número de amostras a partir das quais foi possível obter *Salmonella* foi destacada com hachuras nas fatias representativas de cada categoria. A visualização dos dados apresentados sugere que no interior de cada bacia hidrográfica a porcentagem de amostras positivas não variou muito conforme AE ou NU.

Assim estratificada, a maior taxa de recuperação foi observada em águas impactadas por "Gado + Frango" ($n = 9/10$; 90% em MPS e $n = 7/9$; 77,7% em Pb). As amostras impactadas apenas pela criação de gado apresentaram 61,4% ($n = 35/57$) de ocorrência de *Salmonella* em MPS, mas o microrganismo não foi recuperado de nenhuma das amostras com esta característica em Pb. Vale ressaltar que poucas amostras foram coletadas em pontos impactados por essa AE em Pb. Em contraste, enquanto amostras impactadas apenas pela criação de frango não foram coletadas em MPS, das quatro coletadas em Pb sob esta influência direta, três (75%) foram positivas para *Salmonella*. Cerca de 40% das águas próximas a propriedades com atividade de olericultura estavam contaminadas com o microrganismo, mesmo considerando o diferente número de propriedades com esta característica amostrada em cada bacia (1 em 5 de MPS, 40%; e 40 entre 88 em Pb, 45,4%). As combinações de impactos "Gado + Olericultura" e "Frango + Olericultura" também estavam diferentemente representadas entre as bacias, mas sempre com um número de amostras relativamente pequeno. Com esta ressalva, foi observada uma taxa de recuperação de *Salmonella* sob o impacto da combinação "Gado + Olericultura" de 87,5% ($n = 7/8$) em MPS, e 33,3% ($n = 1/3$) em Pb. Já a combinação dos efeitos "Frango + Olericultura" foi observada apenas em Pb, com 75% ($n = 6/8$) das amostras contendo *Salmonella*. Amostras com atividade econômica não definida (ND), que refletem o conjunto das águas que circulam e se conectam em cada região tiveram taxas semelhantes em ambas as bacias ($n = 45/72$; 62,5% em MPS e $n = 26/46$; 56,5% em Pb).

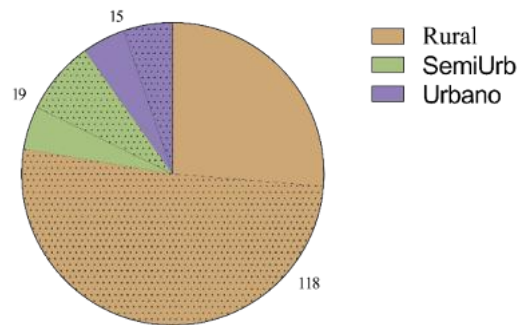
Para explorar a relação entre cada AE e a ocorrência de *Salmonella*, organizamos os dados considerando diferentes combinações de efeitos (Gado + Frango, Gado + Olericultura, e Frango + Olericultura) para ambos os critérios. A comparação dos impactos (Gado, Frango, Olericultura e ND) nas duas bacias, em associação com a ocorrência de *Salmonella*, sugeriu diferenças entre as AE ($p\text{-valor} = 0,01$; $\chi^2 = 11,15$).

a) Amostras de Água em MPS



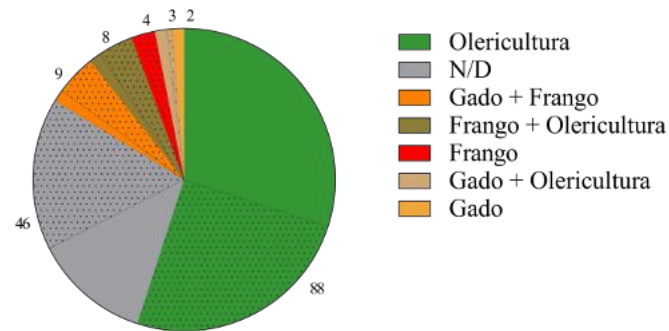
Total=152

c) Amostras de Água em MPS



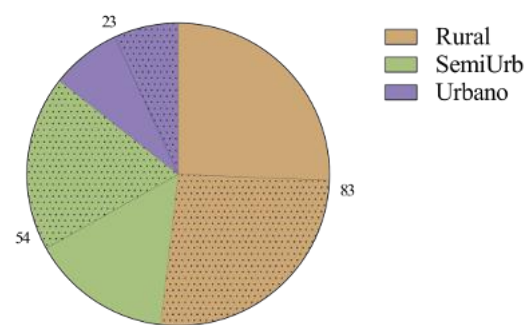
Total=152

b) Amostras de Água em Pb



Total=160

d) Amostras de Água em Pb



Total=160

Figura 11 – Distribuição de amostras de água de acordo com as Atividades Econômicas (AE) e Níveis de Urbanização (NU). (a e b) Distribuição das amostras segundo AE em Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb); (c e d) Distribuição das amostras segundo o NU em MPS e Pb. Números indicam o número de amostras contemplado em cada critério. Fatias hachuradas correspondem às amostras que foram positivas para a detecção de *Salmonella*. Números apresentados fora dos gráficos referenciam o total de amostras representantes de cada categoria. Teste do χ^2 foi utilizado nessas análises. $p\text{-valor} = 0,01$ e $\chi^2 = 11,15$. N/D, Não Descrito; SemiUrb, Semiurbano.

Em seguida, comparando a ocorrência de *Salmonella* entre as AE, foi identificada uma diferença entre o impacto de olericultura, em relação a frango (p -valor = 0,003) e gado (p -valor = 0,022). A ocorrência de *Salmonella* em pontos impactados por frango foi 4 vezes maior do que em pontos associados à olericultura (OR = 4; IC 95%: 1,52 – 10,53). Da mesma forma, a ocorrência em áreas impactadas por gado foi 2 vezes maior em comparação com a olericultura (OR = 2; IC 95%: 1,12 – 3,55). Foi visto que 50% dos pontos impactados por olericultura foram positivos para a ocorrência de *Salmonella*. Outras comparações não apresentaram diferenças consideráveis (**Figura 12a**). A mesma análise foi conduzida para investigar a associação entre a ocorrência de *Salmonella* sp. e os NU de cada bacia hidrográfica. Diferentemente das AE, não foi observada qualquer associação entre a ocorrência de *Salmonella* sp. e os NU (**Figura 12b**).

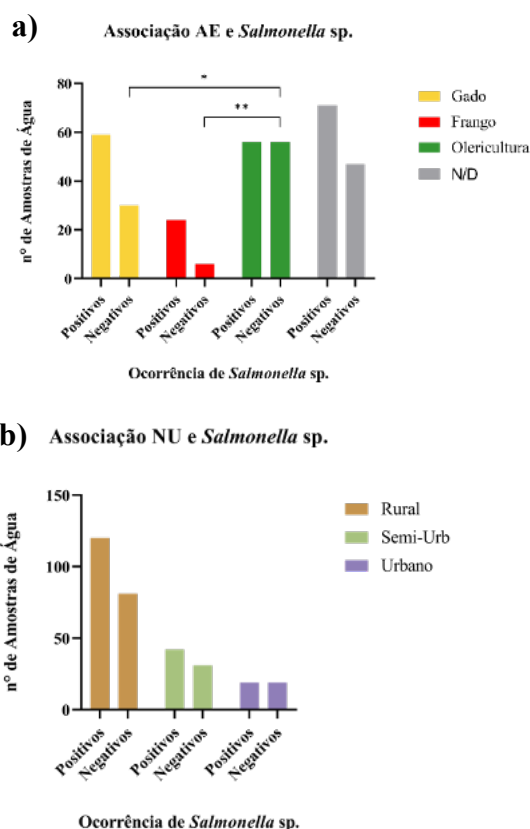


Figura 12 – Análise de associação entre a ocorrência de *Salmonella* sp. e o impacto das atividades econômicas (AE) e Níveis de Urbanização (NU). (a) Análise de associação entre a ocorrência de *Salmonella* sp. e o impacto das AE nos pontos de coleta. Colunas amarelas indicam impacto por criação de gado, colunas vermelhas indicam impacto por criação de frango, colunas verdes indicam impacto por olericultura e colunas cinza escuro indicam ausência de impacto direto, refletindo a contaminação das águas que circulam na região. (b) Análise de associação entre a ocorrência de *Salmonella* sp. e o impacto dos NU nos pontos de coleta. Colunas ocre indicam amostras de regiões rurais, colunas verde pastel indicam amostras de regiões semiurbanas e colunas roxa pastel indicam amostras de regiões urbanas. Semi-Urb: Semi-Urbano; Teste exato de Fisher foi utilizado nessas análises. **: p -valor = 0.003; *: p -valor = 0.022.

5.3 Montagem da coleção de estudo

Ao todo, 12.881 isolados bacterianos foram obtidos ao longo dos três anos de coleta e, no máximo, quatro visitas em cada bacia hidrográfica. Destes, 2.367 foram identificados como pertencentes ao gênero *Salmonella* sp. por MALDI-TOF MS. Todas as amostras selecionadas para compor a coleção a ser caracterizada neste estudo seriam sequenciadas e limitamos este número a um máximo de cinco isolados por amostra de água. Para tanto, selecionamos primariamente amostras que apresentassem diferentes perfis de bandas na técnica de RAPD, entre os isolados provenientes de cada amostra de água. Quando o conjunto dos isolados de uma amostra de água apresentavam menos de cinco perfis, a complementação do número a ser sequenciado foi alcançada pela seleção de isolados com diferentes características morfológicas de colônia, ou que eram provenientes de diferentes meios de enriquecimento seletivo (Rappaport-Vassiliadis ou Tetrationato) e foram isoladas em diferentes placas de Ágar SS ou Ágar XLT-4. Assim, 625 isolados foram selecionados e enviados para sequenciamento. No entanto, 29 genomas não foram publicados a tempo para serem processados e abordados nesse estudo (19 de MPS e 10 de Pb), resultando em 596 genomas analisados.

Após o sequenciamento dos genomas, a partir dos dados disponibilizados na plataforma www.pathogendetection.com, foram selecionados 308 isolados como representantes não clonais de suas respectivas amostras de água. A seleção levou em consideração sorovar e, para as pertencentes a um mesmo sorovar, a detecção de pelo menos 10 SNPs de diferença como marcadores de possível diversidade. Isolados com identidades genômicas semelhantes obtidos de diferentes amostras de água foram mantidos no estudo.

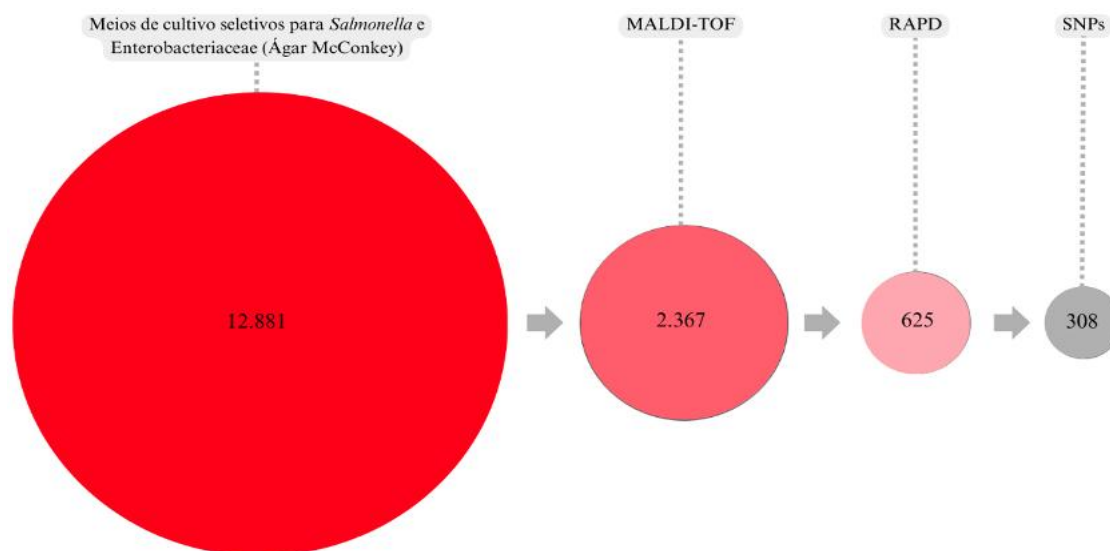


Figura 13 – Diagrama que ilustra, em valores numéricos, a representatividade da obtenção de isolados selecionada para o estudo. Cada esfera representa o contingente amostral de isolados selecionados por cada técnica até a definição dos 308 que foram analisados.

5.4 Identificação dos isolados

Todos os isolados sequenciados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Salmonella*. A análise dos genomas permitiu identificar as amostras em nível de espécie e subespécie, sendo que 273 isolados foram identificados como *S. enterica* subespécie *enterica* (I); cinco como *S. enterica* subespécie *salamae* (II); sete como *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb); 22 como *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV); e um como *S. enterica* subespécie VII. Nenhum isolado foi identificado como sendo de *S. bongori*, assim como não foram identificados isolados pertencentes às subespécies *arizonae* (IIIa) e *indica* (VI) de *S. enterica*.

Foram identificados 46 sorovares entre os 308 isolados de *Salmonella*. Desses sorovares, apenas 15 têm mais de cinco isolados representados na coleção, sendo eles: Panama ($n = 44$); Newport ($n = 43$); Typhimurium ($n = 27$); Saphra ($n = 23$); Carrau ($n = 20$); Infantis ($n = 15$); IV 43:z4,z24:- ($n = 15$); Braenderup ($n = 13$); Santiago ou Belem ($n = 9$); Sandiego ($n = 9$); Jos ($n = 8$); Oranienburg ($n = 7$); Oslo ($n = 7$); Corvallis ($n = 5$); e II 42:r:- ($n = 5$). A ocorrência de sorovares nas bacias hidrográficas do MPS e Pb estão apresentados na **Figura 14** e os dados estratificados por subespécie na Tabela Suplementar 1 dos Anexos.

5.5 Ocorrência de sorovares associada à bacia hidrográfica

A ocorrência de alguns sorovares aparenta estar associada com as bacias hidrográficas. Todos os 23 isolados do sorovar Saphra, por exemplo, foram obtidos apenas de MPS, assim como os isolados de Oslo ($n = 7$), Jos ($n = 7$) e II 42:r:- ($n = 5$). Enquanto isso, cerca de 60% dos isolados de Panama ($n = 26/44$) e Newport ($n = 28/43$) foram isolados a partir de amostras de água de Pb (Figura 14).

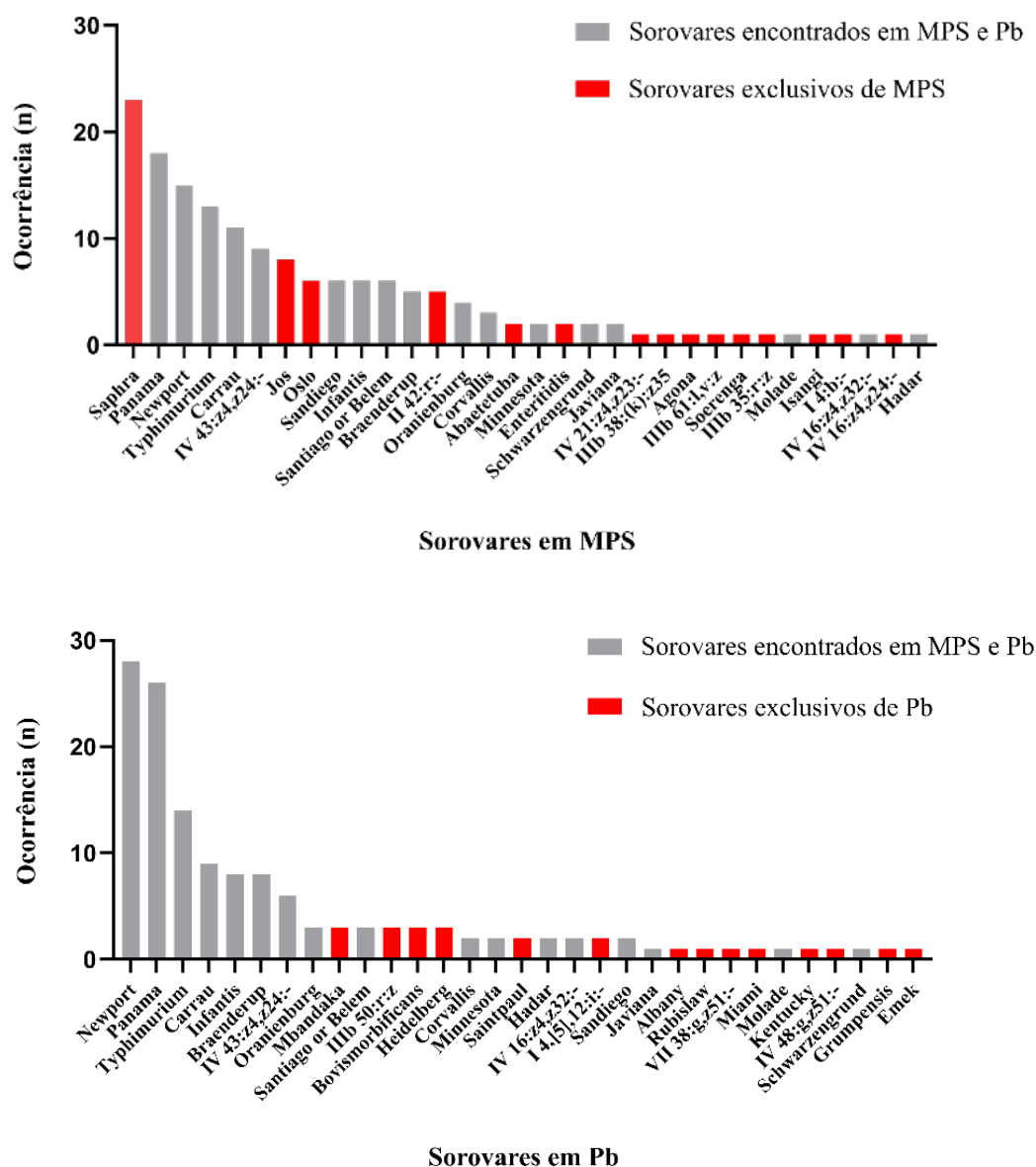


Figura 14 – Ocorrência de sorovares nas bacias hidrográficas Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb). (a) Ocorrência de sorovares em MPS, onde colunas vermelhas indicam sorovares que foram identificados apenas em MPS (b) Ocorrência de sorovares em Pb, onde colunas vermelhas indicam sorovares identificados apenas em Pb.

Para investigar a correlação dos sorovares com dados relativos à AE e NU dos pontos de coleta, foi realizada uma análise de correspondência (CA), integrando os dados das diferentes bacias hidrográficas. Nela, os sorovares que foram identificados exclusivamente ou majoritariamente em propriedades impactadas por uma dada AE aparecem graficamente próximos a ela. Em contraste, sorovares mais ao centro do gráfico indicam uma distribuição mais uniforme, sendo encontrados nas AE em diferentes proporções. Os sorovares Bovismorbificans ($n = 3$), I 4,[5],12:I:- ($n = 2$), Emek ($n = 1$) e Miami ($n = 1$) apresentaram uma maior associação com a produção de olericultura. Já os sorovares Enteritidis ($n = 2$), I 4:b:- ($n = 1$), IIIb 35:r:z ($n = 1$), IV 48:g,z51:- ($n = 1$) e IV 21:z4,z23:- ($n = 1$) apresentam uma maior correlação com as amostras impactadas pela criação de gado. Os sorovares IIIb 38:(k):z35 ($n = 2$) e Isangi ($n = 1$) apresentaram uma maior correlação com pontos impactados por frango. Sorovares como Panama ($n = 44$), Infantis ($n = 15$), IV 43:z4,z24:- ($n = 15$), Carrau ($n = 20$), Typhimurium ($n = 27$) e Heidelberg ($n = 3$) apresentam uma distribuição mais uniforme entre as AE (**Figura 15**).

A análise ilustra a aproximação entre os sorovares sobrerrepresentados (Jos, Saphra, Oranienburg e Sandiego) com pontos impactados por gado e frango, o que sugere uma possível associação entre a criação de animais com a ocorrências desses sorovares.

A mesma análise foi feita para avaliar a correspondência entre os sorovares e os NU. A maior associação foi com pontos de coleta rurais, onde cerca de 20 sorovares, como Enteritidis, Rubislaw, Abaetetuba, Jos, Isangi, Grumpensis, Saphra, Santiago ou Belém, entre outros, apresentaram maior associação. Essa maior associação pode se dar a grande representatividade de pontos de coleta rurais no desenho experimental do estudo, o que, inclusive, traz a zona de influência de “rural” para próximo do eixo central. Embora alguns sorovares com menos de cinco isolados identificados (Emek, Albany e Soerenga) foram recuperados em pontos de coleta urbanos, isolados do sorovar Corvallis ($n = 5$) tiveram a ocorrência inclinada para pontos urbanos. Já os sorovares Kenctucky e Agona (pouco representados) estiveram mais associados a pontos semiurbanos (**Figura 16**).

Os gráficos de correspondência são úteis para a identificação de tendências, mas precisam ser considerados com cuidado quando o número de amostras obtidas sob cada impacto (AE ou NU) diverge. Também, como o número de isolados representantes de cada sorovar é muito diverso, destacamos os que são mais representados na coleção em dourado. Todos os sorovares escritos em preto foram identificados apenas 1 a 4 vezes na coleção, e sua vinculação muito próxima a uma AE ou NU pode ser também um fruto do acaso.

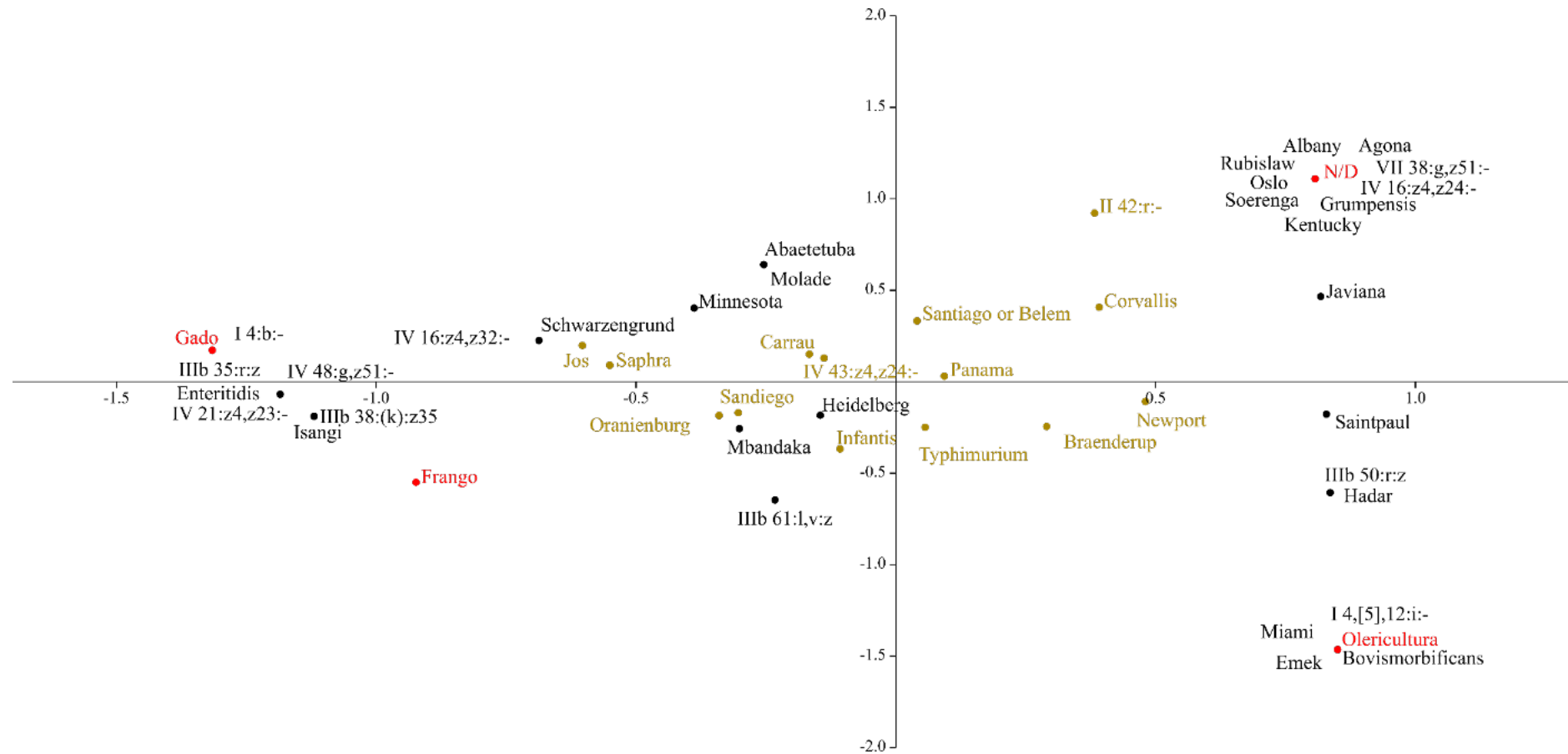


Figura 15 – Análise de correspondência (CA) entre sorovares com as diferentes atividades econômicas (AE). Análise de CA entre os sorovares com as diferentes AE que impactam os pontos de coleta onde as amostras de água são coletadas. Pontos vermelhos indicam alguma AE (olericultura, frango ou gado). Pontos pretos indicam a disposição espacial dos sorovares no mapa. Sorovares e pontos dourados indicam sorovares que representam até 81,2% da coleção de estudo (5 isolados ou mais). N/D, Não Descrito.

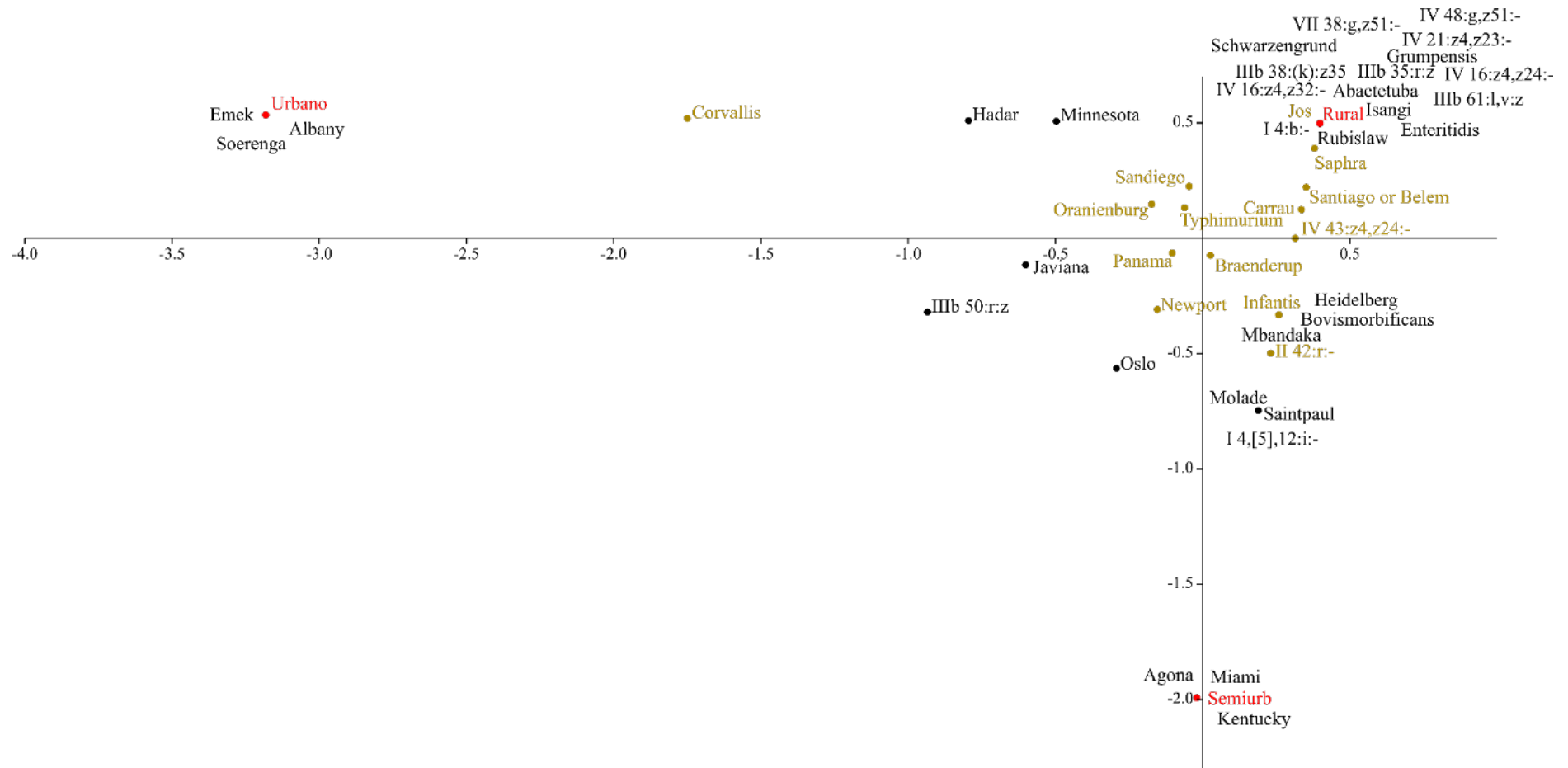


Figura 16 – Análise de correspondência (CA) entre sorovares com as diferentes Níveis de Urbanização (NUs). Análise de CA entre os sorovares com as diferentes NUs dos pontos de coleta em que as amostras de água são coletadas. Pontos vermelhos indicam os NU (rural, semiurbano e urbano). Pontos pretos indicam a disposição espacial dos sorovares no mapa. Sorovares e pontos dourados indicam sorovares que representam até 81,2% da coleção de estudo (5 isolados ou mais).

5.6 Sequence-Types de *Salmonella* sp. em MPS e Pb

Os 46 sorovares identificados nas amostras se distribuíram em 57 diferentes STs. A maioria dos sorovares são representados por apenas um ST, como o sorovar Saphra (ST1604) e Panama (ST48). Entretanto, sorovares como Newport (ST45, ST2370 e ST10982), Typhimurium (ST19 e ST313) e IV 43:z4,z24:- (ST9482, ST9483 e ST9486) apresentam mais de um ST, o que implica no maior número de STs do que sorovares (Tabela 2).

Entre os três STs vinculados ao sorovar Newport, ST45 ($n = 17$), ST2370 ($n = 25$) e ST10982 ($n = 1$), os STs 45 e 2370, mais prevalentes, não apresentaram uma distribuição proporcional entre as duas bacias hidrográficas (p valor = 0,0202), onde o ST45 ocorreu 10 vezes em MPS e sete vezes em Pb, enquanto o ST2370 ocorreu cinco vezes em MPS e 20 vezes em Pb. Para outros sorovares, como Oranienburg (ST23 e ST124), Infantis (ST32 e ST1032), Sandiego (ST20 e ST126), Javiana (ST2783 e ST4557), IIIb 50:r:z (ST2374 e ST9869), IV 16:z4,z32:- (ST9491 e ST10978), IV 42:z4,z24:- (ST9482, ST9483 e ST9486) e IV 21:z4,z23:- (ST9485 e ST9866) não foi possível inferir uma correlação de um dado ST com bacia hidrográfica específica, devido ao baixo número amostral de cada ST.

Tabela 2 – Ocorrência do Sequence Type (ST) de cada sorovar nas bacias hidrográficas do Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb)

Sorovar*	STs	MPS	Pb	Total
Abaetetuba	2041	2	-	2
Agona	13	1	-	1
Albany	292	-	1	1
Bovismorbificans	150	-	3	3
Braenderup	22	5	8	13
Carrau	226	11	9	20
Emek	76	-	1	1
Corvallis	1541	3	2	5
Enteritidis	11	2	-	2
Grumpensis	751	-	1	1
Hadar	33	1	2	3
Heidelberg	15	-	3	3
I 4:b:-	10980	1	-	1
II 42:r:-	1208	5	-	5
IIIb 35:r:z	9865	1	-	1
IIIb 38:(k):z35	4340	2	-	2
IIIb 50:r:z	2374	-	1	1
IIIb 50:r:z	9869	-	2	2

Sorovar*	STs	MPS	Pb	Total
IIIb 61:l,v;z	9868	1	-	1
Infantis	32	5	7	12
Infantis	1032	1	2	3
Isangi	216	1	-	1
IV 16:z4,z24:-	10981	1	-	1
IV 16:z4,z32:-	9491	-	2	2
IV 16:z4,z32:-	10978	1	-	1
IV 21:z4,z23:-	9485	1	-	1
IV 21:z4,z23:-	9866	1	-	1
IV 43:z4,z24:-	9482	5	5	10
IV 43:z4,z24:-	9483	-	1	1
IV 43:z4,z24:-	9486	4	-	4
IV 48:g,z51:-	10686	-	1	1
Javiana	2783	2	1	3
Javiana	4557	-	1	1
Jos	9867	8	-	8
Kentucky	198	-	1	1
Mbandaka	413	-	3	3
Miami	140	-	1	1
Minnesota	548	2	2	4
Molade	544	1	1	2
Newport	2370	5	20	25
Newport	45	10	7	17
Newport	10982	-	1	1
Oranienburg	23	-	3	3
Oranienburg	174	4	-	4
Oslo	1370	7	-	7
Panama	48	18	26	44
Rubislaw	1575	-	1	1
Saintpaul	50	-	2	2
Sandiego	20	5	2	7
Sandiego	126	2	-	2
Santiago ou Belem	9484	6	3	9
Saphra	1604	23	-	23
Schwarzengrund	96	2	1	3
Soerenga	1659	1	-	1
Typhimurium/I 4,[5],12:i:-	19	12	16	28
Typhimurium	313	1	-	1
VII 38:g,z51:-	9490	-	1	1

* Sorovares com mais de um ST estão destacados em negrito

5.7 Caracterização de grupos Inc plasmidiais identificados nos genomas dos isolados

A análise dos genomas montados permitiu encontrar sequências plasmidiais, através da identificação de grupos Inc em algumas *contigs*. Alguns isolados apresentaram dois ou três diferentes grupos Inc, sugerindo a coocorrência de mais de um plasmídeo. Ao todo, foram encontrados 17 grupos Inc entre os isolados, sendo eles: IncFIB/IncFII ($n = 34$); Col440I ($n = 25$); RepA_1_pKPC ($n = 22$); IncFII ($n = 22$); ColRNAI ($n = 12$); Col440II/ColRNAI ($n = 10$); IncA/C2 ($n = 7$); Col440I/Col440II ($n = 7$); ColpVC ($n = 6$); IncR ($n = 3$); IncFIB ($n = 2$); IncI1 ($n = 2$); IncX4 ($n = 2$); IncFIC ($n = 2$); IncI ($n = 2$); IncX1 ($n = 1$); IncFIC(FII) ($n = 1$); IncFIA ($n = 1$); Col440II ($n = 1$); Col(BS512) ($n = 1$). Alguns sorovares parecem ser mais receptivos para portar plasmídeos, como sugere a **Tabela 3**. A descrição da ocorrência de cada grupo Inc é feita na Tabela Suplementar 2 nos Anexos deste documento.

Em 113 dos 308 genomas amostrados foi possível identificar sequências contendo grupos Inc. Ao todo, 163 sequências tipicamente plasmidiais foram analisadas. Isolados pertencentes a 13 sorovares apresentaram duas ou mais sequências plasmidiais com características diferentes, codificando, ou não, algum gene de virulência ou resistência. Por exemplo, um isolado de *S. Typhimurium* (W022-37-1) apresentou duas sequências plasmidiais, uma associada a IncFIB/IncFII e outra a IncFII, mas somente na primeira foram identificados genes de virulência. Análises complementares com ênfase na identidade destas sequências indicaram baixo grau de homologia, sugerindo que se trata de sequências plasmidiais distintas. De forma parecida, foi observado em sequências de um isolado de *Corvallis* (W006-66-1), três sequências plasmidiais, sendo uma de Col440I/Col440II e duas de Col440I, mas apenas em uma sequência de Col440I foi identificado um gene de resistência. O mesmo foi observado em outro isolado de *Corvallis* (W254-21-1), que apresentava três sequências associadas a Col440I, apenas uma delas com gene de resistência.

Alguns isolados de *S. Typhimurium* apresentaram sequências associadas a IncFIB/IncFII e Col440I na amostra W022-37-1, enquanto as amostras W041-25-1 e W275-12-1 apresentavam as sequências de IncFIB/IncFII e ColRNAI, onde sequências de IncF carregavam genes de virulência e as de Col440I e ColRNAI carregavam genes de resistência. De forma parecida, isolados de *Panama*, *Minnesota* e *Schwarzengrund*

apresentaram diferentes mecanismos de resistência associados a sequências com diferentes grupos Inc numa mesma amostra.

A ocorrência de alguns tipos plasmidiais, como IncFII e ColRNAI, foi diferente nas bacias hidrográficas (**Figura 17**). Entretanto, em geral, a prevalência de grupos Inc em ambas as bacias foi similar. Ao todo 85 sequências plasmidiais ocorreram em MPS e 78 em Pb, não havendo diferença neste critério entre as bacias hidrográficas ($p\text{-valor} = 0,8573$).

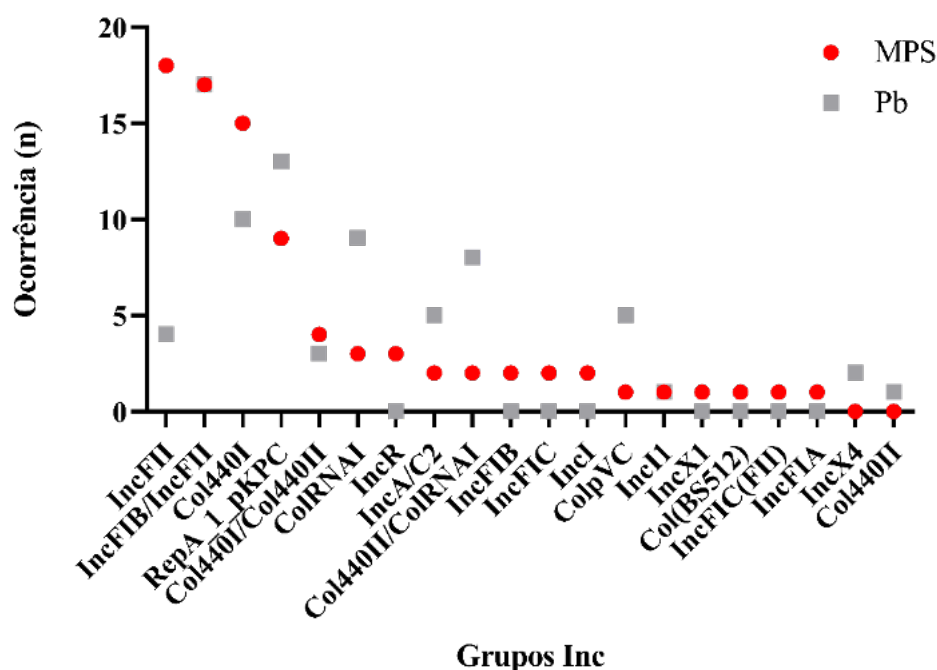


Figura 17 – Ocorrência de grupos Inc e prevalência de sequências plasmidiais nas bacias hidrográficas do Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb). n: número de vezes que cada tipo Inc foi encontrado nos isolados de cada bacia hidrográfica. Esferas vermelhas indicam a ocorrência de grupos Inc em MPS, enquanto quadrados cinzas indicam a ocorrência de grupos Inc em Pb. Teste exato de Fisher foi utilizado nessa análise. $p\text{-valor} = 0,8573$.

5.8 Caracterização molecular de genes de virulência

A análise de busca por genes de virulência e resistência foi realizada com os genomas montados, considerando tanto *contigs* pertencentes aos genomas como *contigs* identificadas como de origem plasmidial.

Tabela 3 – Ocorrência de grupos Inc nos sorovares identificados neste estudo

Isolados (n com grupo Inc/n total do sorovar)	Perfis de Grupos Inc identificados (n)
Typhimurium (27/27)	IncFIB/IncFII (27), IncFII (1), Col440I (1), ColRNAI (2), Col440I/Col440II (1)
Panama (18/44)	RepA_1_pKPC (13), Col440I (4), Col440II/ColRNAI (3), IncR (3), IncI1 (1), IncFIC (2), IncX1 (1), IncFIC(FII) (1), IncFIA (1)
Santiago ou Belem (9/9)	RepA_1_pKPC (1), IncFII (8), Col440II/ColRNAI (1)
Carrau (6/20)	RepA_1_pKPC (2), Col440I (1), IncFII (3), Col440II/ColRNAI (1),
Jos (6/8)	IncFII (6)
Corvallis (4/5)	Col440I (7), Col440I/Col440II (1)
Minnesota (4/4)	Col440I (3), IncA/C2 (4), ColpVC (1), IncI1 (1), Col(BS512) (1)
Heidelberg (3/3)	Col440I (1), ColRNAI (1), ColpVC (3), IncA/C2 (3),
Hadar (3/3)	Col440I (3),
Javiana (3/4)	IncFIB/IncFII (1), IncI (2)
Newport (3/43)	Col440I (2), Col440II/ColRNAI (1), ColRNAI (1), ColpVC (1)
Oranienburg (3/7)	Col440II/ColRNAI (3), ColRNAI (6),
IV 43:z4,z24 (2/15)	IncFIB/IncFII (1), IncFII (1)
Schwarzengrund (2/3)	Col440I (1), ColRNAI (1), ColpVC (1)
Oslo (2/7)	RepA_1_pKPC (2)
Molade (2/2)	Col440I (1), Col440I/Col440II (2), Col440II (1)
Infantis (2/15)	IncX4 (2)
Enteritidis (2/2)	IncFIB/IncFII (2)
Abaetetuba (2/2)	IncFII (3), IncFIB (2), ColRNAI (1),
Sandiego (2/9)	RepA_1_pKPC (2)
IV 21:z4,z23:- (1/2)	IncFIB/Enchi (1),
IV 48:g,z51:- (1/1)	IncFIB/IncFII (1),
I 4,[5],12:i:- (1/2)	IncFIB/IncFII (1),
Miami (1/1)	RepA_1_pKPC (1)
Rubislaw (1/1)	RepA_1_pKPC (1)
Soerenga (1/1)	Col440II/ColRNAI (1)
Mbandaka (1/3)	Col440I (1)
Isangi (1/1)	Col440I/Col440II (2)

* Foram contabilizadas as sequências Inc obtidas de diferentes isolados e sequências com identidades diferentes detectadas em um mesmo isolado

Todos os 46 sorovares de *Salmonella* foram submetidos à pesquisa de 143 genes de virulência. Alguns genes cromossômicos são canônicos em *Salmonella enterica*, geralmente inseridos em ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPIs) comuns entre os sorovares. Estes incluem os operons *invABCEFGHIJ*, *ssaCDEGHIJKLMNOPQRSTU*, *spaOPQRS*, *prgHIJK* e *sipABCD*, por exemplo. Embora sejam genes canônicos, algumas células podem perder esses genes ou as ilhas genômicas a ele associadas. Isso foi observado no isolado W039-35-1, do sorovar Heidelberg, que não apresenta qualquer gene associado a SPI-1, ilha de patogenicidade relacionada com o processo de adesão e invasão das células hospedeiras (operons *inv*, *prg*, *sic*, *spa*, *org* e *sip*) no genoma montado.

Outros genes de virulência não estão em ilhas de patogenicidade mas são mais específicos de algum sorovar, ou estão inseridos em EGMs associados a certos sorovares, como os operons de genes *spvBCR* (reponsáveis por despolimerização da actina, supressão de processos inflamatórios e regulação dos outros genes, respectivamente) e *pefABCD* (formam uma fimbria que permite a adesão às células epiteliais) inseridos em plasmídeos de virulência IncFIB/IncFII. Neste trabalho, estes foram encontrados nos isolados de *S. Enteritidis* ($n = 2/2$), *S. Typhimurium* ($n = 26/27$) e da variação monofásica de *S. Typhimurium*, I 4,[5],12:i:- ($n = 1/2$). Dois isolados, um de Typhimurium (W004-32-1) e um de I 4,[5],12:i:- (W047-28-1) tinham em seus genomas os operons *pef* e *spv*, mas nossas análises não os vincularam a sequências plasmidiais.

Por outro lado, um outro isolado de I 4,[5],12:i:- que continha uma sequência plasmidial IncFIB/IncFII, carregava, também, o gene *rck* (associado à proteção da *Salmonella* contra o *killing* do sistema complemento). Ainda, *yopJ/yopP* (um sistema de secreção do tipo III de *Yersinia* sp.) foi encontrado em sequências ligadas a IncFII, em todos os isolados de Santiago ou Belem ($n = 9$). É importante destacar que nenhum gene de virulência foi encontrado em plasmídeos que não possuam replicons de IncF.

O gene *sspHI*, tipicamente associado ao prófago Gifsy-3 e codificante de uma E3 ubiquitina ligase que suprime a resposta imunológica via ubiquitinação, foi identificado em uma sequência plasmidial de IncFIB/IncFII em IV 48:g,z51:-. um sorovar da subespécie *houtenae*. Embora esse isolado tenha apresentado esse gene em uma sequência plasmidial, ele está presente no cromossoma de outros sorovares da subespécie *enterica*, subespécie *houtenae* (IV 16:z4,z24:-, IV 16:z4,z32:- e IV 43:z4,z24:-) e subespécie VII (VII 38:g,z51:-).

Também foi observada a ocorrência do operon *spvBCR* em todos os 3 isolados de IV 16:z4,z32:-. Curiosamente, esse operon, incomum nessa subespécie, não foi associado a nenhuma *contig* claramente plasmidial nestes isolados. Contudo, considerando que a ocorrência desse gene é associada a plasmídeos em sorovares da subespécie I, não é possível inferir, com os dados que dispomos, se tal operon, nestes isolados do sorovar IV 16:z4,z32:-, e em outro casos peculiares, encontram-se no cromossomo ou em alguma sequência plasmidial não reconhecida pela estratégia metodológica adotada no projeto.

Para apresentar os genes de virulência identificados nos diferentes sorovares foi construído um *Heatmap* (**Figura 18**) no qual os genes comuns a todos os isolados não foram incluídos. Tal visualização evidencia que isolados de um mesmo sorovar em geral apresentam perfis de virulência semelhantes ou com poucas diferenças.

A associação entre os genes de virulência e os sorovares reflete a proximidade que os sorovares têm entre si. Ao analisar a influência da abundância de genes de virulência específicos entre os sorovares, é possível observar a formação de grupos que compartilham dos mesmos mecanismos de virulência, e reconhecer sorovares ou isolados que se distanciam, formando grupos diversos (**Figura 19**).

Nesta análise, por exemplo, o isolado de *S. Heidelberg* sem os genes da SPI-1 influenciou o distanciamento de Heidelberg dos demais sorovares da subespécie I. Sorovares como Typhimurium, sua variante monofásica I 4,[5],12:i:- e Enteritidis, que carregam os operons *spv* e *pef* e possuem um repertório de genes de virulência mais rico, também se distinguem das demais amostras. Da mesma forma, sorovares de subespécies não *enterica* não se associam com outros sorovares, ou se associam apenas entre si, evidenciando os diferentes rumos evolutivos refletidos na aquisição e perdas de genes de virulência entre as subespécies. Genes que ocorreram em mais de 90% dos isolados foram desconsiderados nas análises comparativas com ênfase em virulência, sendo incluídos apenas 57 (**Figura 18** e **Figura 19**). Para a análise de clusterização (**Figura 19**) foi estabelecido um ponto de corte de similaridade nos padrões de associação (75%) entre sorovar e virulência, para melhor visualização desses padrões.

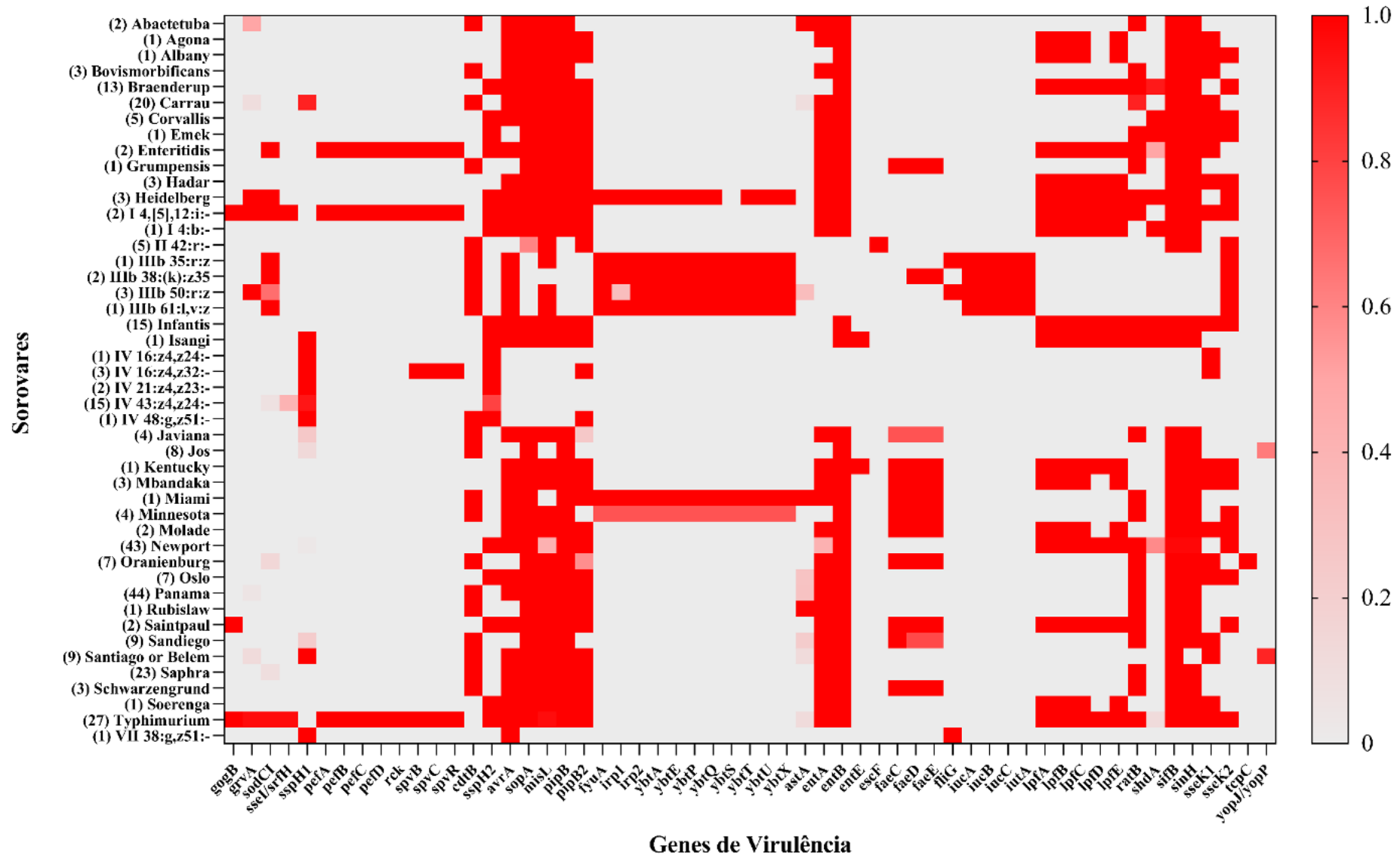


Figura 18 – Heatmap da ocorrência de genes de virulência que variam entre os sorovares. A escala de ocorrência de 57 genes de virulência varia de 0 a 1, onde 1 representa a ocorrência em todos os isolados daquele sorovar, enquanto valores abaixo de 1 representam a ocorrência não tão abundante daquele gene para com o sorovar. Para esta análise foram excluídos os genes comuns entre todos os isolados.

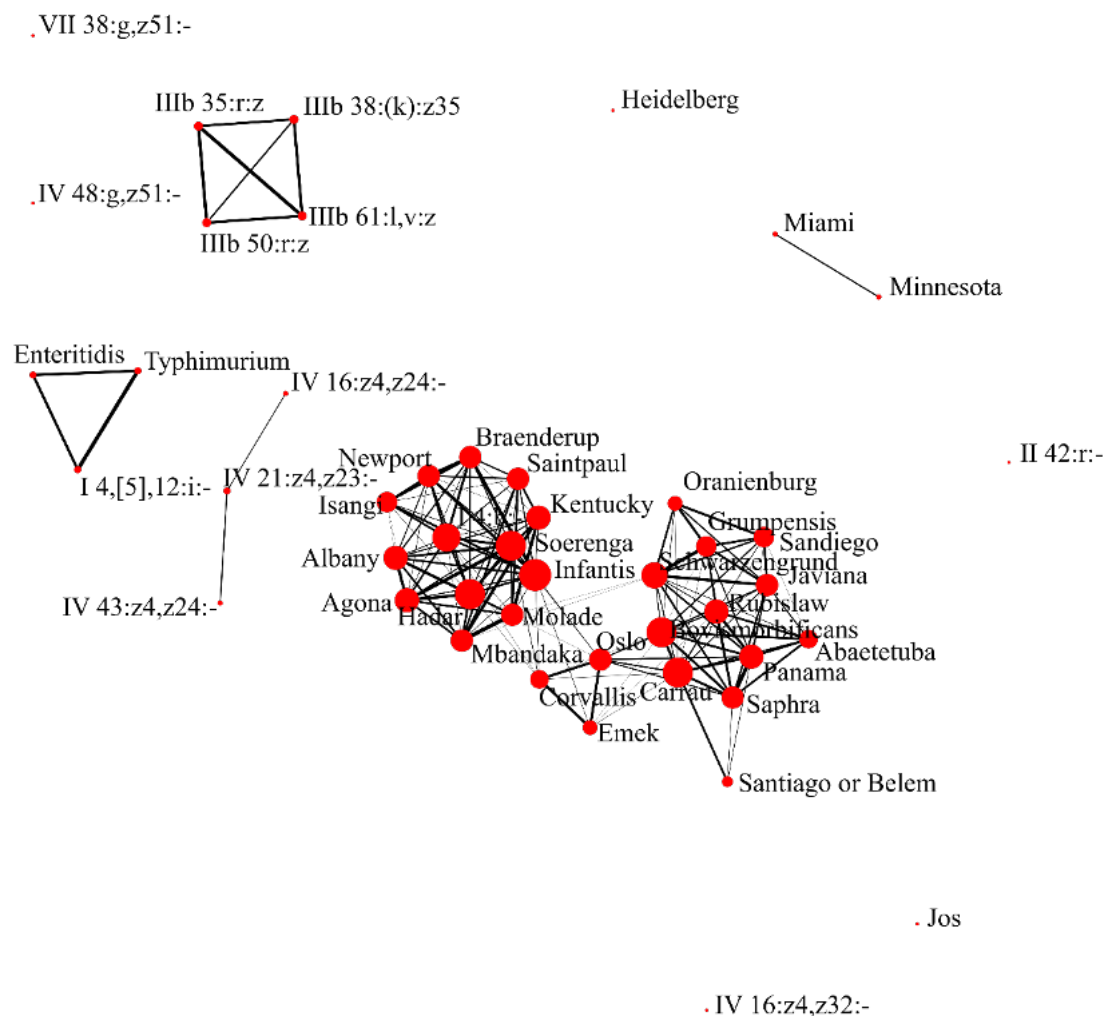


Figura 19 – Clusterização de sorovares com base nos genes de virulência, por análise de redes. Esferas vermelhas indicam a disposição dos sorovares no mapa. O tamanho das esferas é proporcional a quantidade de interações entre sorovares. As linhas representam as associações, sendo mais espessas para associações fortes e mais finas para associações mais fracas. O índice de similaridade aplicado foi Bray-Curtis, e o algoritmo de visualização utilizado foi Fruchterman-Reingold.

5.9 Caracterização molecular de genes de resistência a antimicrobianos

A ocorrência de alguns genes de resistência também está associada a EGMs. Ao todo foram identificados nas amostras 15 genes de resistência tipicamente adquiridos por transferência horizontal, associados a sete classes de antimicrobianos: aminoglicosídeos (*aadA1*, *aadA2*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*); β -lactâmicos (*bla_{CMY-2}*, *bla_{TEM-1}* e *bla_{TEM-135}*); fenicóis (*floR*); fosfomicina (*fosA7*), trimetoprim (*dfrA*); sulfonamidas (*sulI* e *sul2*); quinolonas (*qnrB19* e *qnrS1*); e tetraciclina (*tet(A)*, *tet(B)* e *tet(C)*). Além destes, foram encontradas mutações em genes intrínsecos associadas à resistência, em *gyrA*, na

posição S83F da girase, proteína alvo de quinolonas; e em *ramR*, na posição T18P do regulador transcricional RamR.). Esses mecanismos de resistência ocorreram em 18 sorovares, como ilustrado na **Figura 20**.

De maneira geral, a maior parte dos genes de resistência foi identificada em mais de um sorovar, mas em alguns casos parece haver uma correlação com os sorovares, como o gene *bla_{CMY-2}* ocorrendo em todos os isolados de Minnesota ($n = 4$) e Heidelberg ($n = 3$); e todos os isolados de Saphra ($n = 23$) apresentando o gene *fosA7*. Além disso, alguns genes como *sul2*, *tet(A)*, *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id* ocorreram de forma combinada nos sorovares Panama, Schwarzengrund e Typhimurium, o que sugere que possam estar em algum plasmídeo. De fato, em dois isolados de Typhimurium ($n = 2/27$), este conjunto de genes foi identificado vinculado a uma sequência plasmidial com marcador Inc ColRNAI. Sequências IncA/C2 foram associadas a *sul2*, *tet(A)* nos sorovares Minnesota ($n = 4/4$) e Heidelberg ($n = 3/3$); e todas as 11 ocorrências do gene *qnrB19*, mesmo em diferentes sorovares, foram associadas a Col440I. A distribuição dos genes de resistência em sequências Inc, bem como de genes sem vinculação a Inc específicos, detectada nos diferentes sorovares, está descrita na **Tabela 4**. *Contigs* com marcadores Inc ColpVC, Col440II, IncI1, RepA_1_pKPC, IncX4, Col(BS512), IncFIA e IncI não foram identificadas como carreadoras de genes de resistência a antimicrobianos neste trabalho.

No que diz respeito à ocorrência nas duas bacias hidrográficas, gene *bla_{CMY-2}* considerado crítico por conferir resistência a cefalosporinas de terceira geração, e mutações em *gyrA*, ocorreram principalmente em isolados obtidos em amostras de água de Pb. Contudo, isolados MDR foram identificados nas duas bacias: representantes dos sorovares Albany, Heidelberg, Infantis, Minnesota, Schwarzengrund e Typhimurium em Pb e dos sorovares Minnesota e Panama em MPS. A descrição dos genes de resistência identificados em isolados de diferentes sorovares, bem como as AE e NU a eles associadas, estão apresentados na **Tabela 5**.

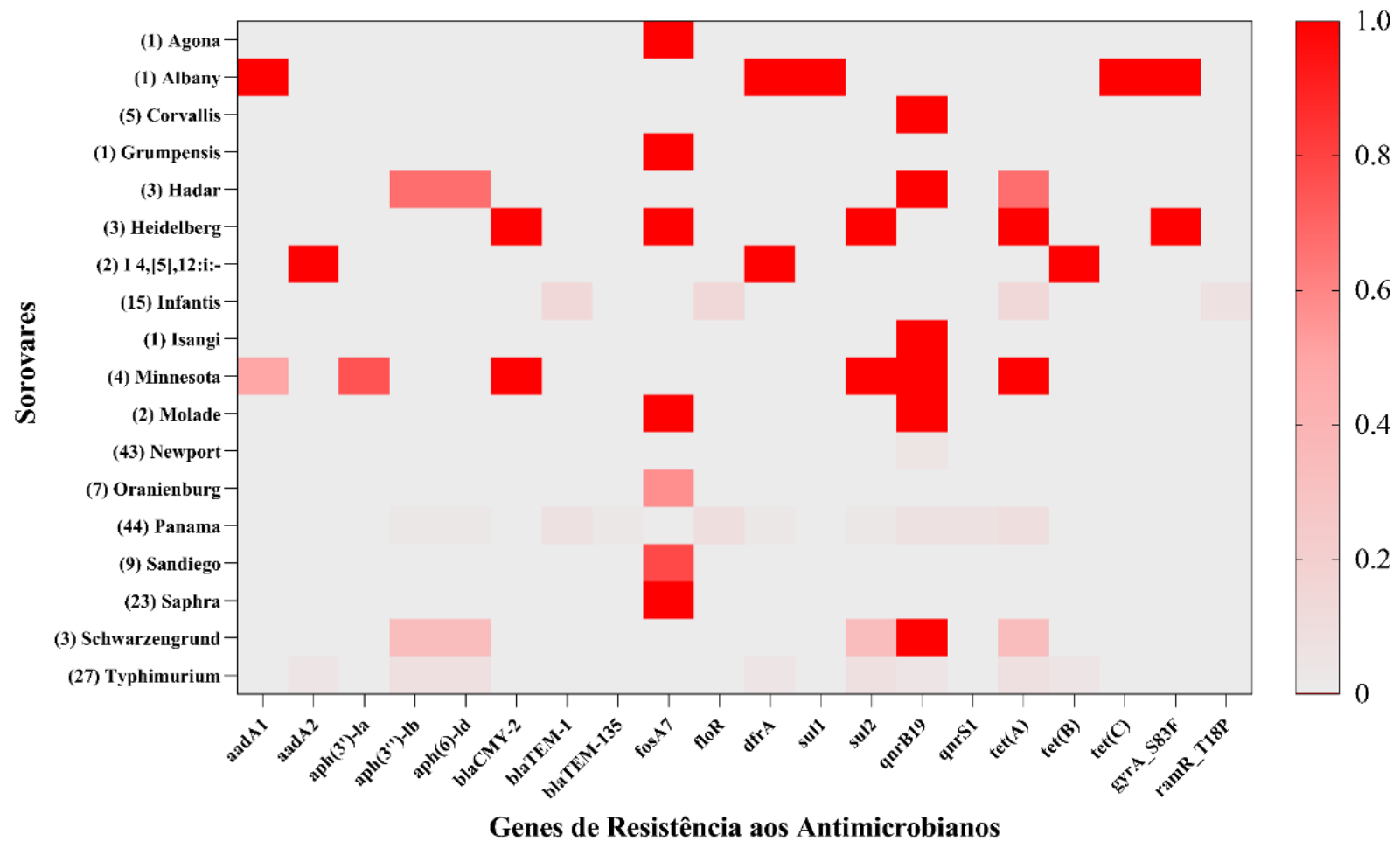


Figura 20 – Heatmap de ocorrência de genes de resistência aos antimicrobianos em cada sorovar. No eixo Y, estão listados os sorovares juntamente com o número de isolados que foram caracterizados neste estudo. A escala de ocorrência varia de 0 a 1, onde 1 indica a presença do gene em todos os isolados daquele sorovar (100%), enquanto valores inferiores a 1 representam a ocorrência proporcional do gene no respectivo sorovar.

Tabela 4 – Genes de resistência associados a sequências plasmidiais com grupo Inc e sorovares em que foram detectados*

Sorovares	Col440I	IncA/C2	ColRNAI	IncX1	IncFIC(FII)	IncR	IncFIC
Minnesota	<i>qnrB19</i>	<i>sul2, tet(A)</i>	-	-	-	-	-
Typhimurium	<i>qnrB19</i>	-	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tet(A)</i>	-	-	-	-
Panama	<i>qnrB19</i>	-	-	<i>blaTEM-135, tet(A)</i>	<i>floR, tet(A)</i>	<i>blaTEM-1</i>	<i>floR, tet(A)</i>
Heidelberg	-	<i>sul2, tet(A)</i>	-	-	-	-	-
Hadar	<i>qnrB19</i>	-	-	-	-	-	-
Corvallis	<i>qnrB19</i>	-	-	-	-	-	-
Newport	<i>qnrB19</i>	-	-	-	-	-	-
Schwarzengrund	<i>qnrB19</i>	-	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tet(A)</i>	-	-	-	-

* Todos os genes apontados relativos aos respectivos grupos Inc estavam em uma mesma *contig*.

Tabela 5 – Distribuição dos genes de resistência aos antimicrobianos nos isolados caracterizados de acordo com a bacia hidrográfica e atividade econômica

Sorovar (<i>n</i>) ¹	Genes associados ^{2,3}	Bacia Hidrográfica/NU ⁴	AE ⁵
Agona (1)	<i>fosA7</i>	MPS/Semiurb	-
Albany (1)	<i>aadA1, tet(C), dfrA, sul1, gyrA_S83F</i>	Pb/Urbano	-
Corvallis (1)	<u><i>qnrB19</i></u>	Pb/Rural	Olericultura
Corvallis (1)	<u><i>qnrB19</i></u>	Pb/Urbano	-
Corvallis (1)	<u><i>qnrB19</i></u>	MPS/Rural	Gado
Corvallis (2)	<u><i>qnrB19</i></u>	MPS/Urbano	-
Grumpensis (1)	<i>fosA7</i>	Pb/Rural	-
Hadar (1)	<u><i>qnrB19, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, tet(A)</i></u>	Pb/Rural	Olericultura
Hadar (1)	<u><i>qnrB19</i></u>	Pb/Urbano	Olericultura

Sorovar (n) ¹	Genes associados ^{2,3}	Bacia Hidrográfica/NU ⁴	AE ⁵
Hadar (1)	<u>qnrB19</u> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>aph(6)-ld</i> , <i>tet(A)</i>	MPS/Rural	-
Heidelberg (1)	<u>sul2</u> , <u>tet(A)</u> , <i>bla_{CMY-2}</i> , <i>fosA7</i> , <i>gyrA_S83F</i>	Pb/Rural	Gado, Frango
Heidelberg (1)	<u>sul2</u> , <u>tet(A)</u> , <i>bla_{CMY-2}</i> , <i>fosA7</i> , <i>gyrA_S83F</i>	Pb/Rural	Olericultura
Heidelberg (1)	<u>sul2</u> , <u>tet(A)</u> , <i>bla_{CMY-2}</i> , <i>fosA7</i> , <i>gyrA_S83F</i>	Pb/Semiurb	-
I 4,[5],12:i:- (1)	<i>tet(B)</i> , <i>aadA2</i> , <i>dfrA</i> ,	Pb/Rural	Olericultura
I 4,[5],12:i:- (1)	<i>tet(B)</i> , <i>aadA2</i> , <i>dfrA</i> ,	Pb/Semiurb	Olericultura
Infantis (1)	<i>ramR_T18P</i>	Pb/Rural	Gado, Frango
Infantis (2)	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>floR</i> , <i>tet(A)</i>	Pb/Rural	Olericultura
Isangi (1)	<u>qnrB19</u>	MPS/Rural	Gado, Frango
Minnesota (1)	<u>qnrB19</u> , <u>sul2</u> , <u>tet(A)</u> , <i>bla_{CMY-2}</i> , <i>aph(3')-la</i> ,	Pb/Rural	-
Minnesota (1)	<u>qnrB19</u> , <u>sul2</u> , <u>tet(A)</u> , <i>bla_{CMY-2}</i> , <i>aph(3')-la</i> ,, <i>aadA1</i>	MPS/Rural	Gado
Minnesota (1)	<u>qnrB19</u> , <u>sul2</u> , <u>tet(A)</u> , <i>bla_{CMY-2}</i>	Pb/Urbano	-
Minnesota (1)	<u>qnrB19</u> , <u>sul2</u> , <u>tet(A)</u> , <i>bla_{CMY-2}</i> , <i>aph(3')-la</i> ,, <i>aadA1</i>	MPS/Rural	Gado, Frango
Molade (1)	<u>qnrB19</u> , <i>fosA7</i>	MPS/Rural	Gado
Molade (1)	<u>qnrB19</u> , <i>fosA7</i>	Pb/Semiurb	-
Newport (1)	<u>qnrB19</u>	MPS/Rural	Gado
Newport (1)	<u>qnrB19</u>	MPS/Semiurb	-
Oranienburg (1)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	Gado, Frango
Oranienburg (1)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	Gado
Oranienburg (1)	<i>fosA7</i>	MPS/Urbano	-
Oranienburg (1)	<i>fosA7</i>	MPS/Semiurb	-
Panama (1)	<u>qnrB19</u> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>floR</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i>	MPS/Rural	-
Panama (1)	<u>qnrB19</u> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>floR</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> ,	MPS/Rural	Gado
Panama (1)	<u>qnrB19</u> , <i>bla_{TEM-135}</i> , <i>test(A)</i> , <i>floR</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>aph(6)-ld</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA</i>	MPS/Semiurb	-

Sorovar (n) ¹	Genes associados ^{2,3}	Bacia Hidrográfica/NU ⁴	AE ⁵
Panama (1)	<i>bla_{TEM-1}</i>, <i>floR</i>, <i>tet(A)</i>, <i>qnrS1</i>	MPS/Urbano	-
Sandiego (1)	<i>fosA7</i>	Pb/Rural	Olericultura
Sandiego (1)	<i>fosA7</i>	Pb/Semiurb	Olericultura
Sandiego (1)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	Gado, Frango
Sandiego (2)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	Gado
Sandiego (1)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	-
Sandiego (1)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	Gado, Olericultura
Saphra (11)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	Gado
Saphra (4)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	Gado, Olericultura
Saphra (2)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	Gado, Frango
Saphra (5)	<i>fosA7</i>	MPS/Rural	-
Saphra (1)	<i>fosA7</i>	MPS/Semiurb	-
Schwarzengrund (1)	<i>qnrB19</i>	Pb/Rural	-
Schwarzengrund (1)	<i>qnrB19</i>, <i>aph(3'')-lb</i>, <i>aph(6)-ld</i>, <i>sul2</i>, <i>tet(A)</i>	MPS/Rural	Gado, Frango
Schwarzengrund (1)	<i>qnrB19</i>	MPS/Rural	Gado
Typhimurium (1)	<i>qnrB19</i>	MPS/Rural	-
Typhimurium (1)	<i>aph(3'')-lb</i>, <i>aph(6)-ld</i>, <i>sul2</i>, <i>tet(A)</i>	Pb/Rural	Gado, Olericultura
Typhimurium (1)	<i>aph(3'')-lb</i>, <i>aph(6)-ld</i>, <i>sul2</i>, <i>tet(A)</i>	Pb/Semiurb	Frango, Olericultura
Typhimurium (1)	<i>aadA2</i> , <i>dfrA</i> , <i>tet(B)</i>	Pb/Rural	Olericultura

¹ Número de isolados com os marcadores e características descritos; ² Genes ou conjuntos de genes sublinhados foram identificados em uma mesma contig associada à alguma sequência plasmidial neste trabalho; ³ Genes ou conjunto de genes em negrito foram identificados em sequências Inc detectadas no respectivo sorovar; ⁴ NU: Nível de Urbanização, Rural: indica que a amostra foi coleta de uma região com ausência de população ou presença de uma propriedade agropecuária, Semiurbano: indica uma região com baixa densidade demográfica, mas que há permanência de uma pequena população, e Urbano: indica uma região com a presença de uma comunidade densa; ⁵ AE: Atividade Econômica desenvolvida na proximidade do corpo d'água de onde foi coletada a amostra; - : ausência de AE reconhecida representa a contaminação das águas que circulam na região sob influências diversas.

Também foi avaliado se os isolados resistentes a antimicrobianos, ou os portadores de genes adquiridos estariam mais relacionados a alguma AE específica. Contudo, observamos que, mesmo estratificada por AE, a taxa de recuperação de isolados resistentes a algum antimicrobiano variou entre 20 e 33%; a recuperação de isolados carreando genes adquiridos de resistência a antimicrobianos (excluímos aqui as mutações e genes *fosA7*) variou entre 10 e 12%; e a de recuperação de isolados com dois ou mais genes de resistência adquiridos, de 5 a 10%. Assim, proporcionalmente, não houve diferenças importantes observadas, indicando que a ocorrência de resistência a antimicrobianos não esteve associada a nenhuma AE específica (**Tabela 5** e **Tabela 6**). Considerando os dados em conjunto, pode-se dizer que, do total de isolados de *Salmonella* caracterizados, 24,7% carreavam algum gene de resistência; 11,6% carreavam algum gene adquirido e 7,7% carreavam dois ou mais genes adquiridos, sendo que as duas últimas categorias estão associadas a plasmídeos. Isolados com mais de dois genes adquiridos de resistência estiveram concentrados nos sorovares Albany ($n = 1/1$), Hadar ($n = 2/3$), Heidelberg ($n = 3/3$), Minnesota ($n = 4/4$), Panama ($n = 4/4$), Schwarzengrund ($n = 1/3$), e Typhimurium ($n = 3/4$) e sua variante monofásica I 4,[5],12:i:- ($n = 2/2$).

Tabela 6 – Associação da ocorrência de mecanismos de resistência com as diferentes atividades econômicas associadas às amostras de água coletadas

Atividade econômica	Número de isolados			
	Total obtido	Contendo marcadores de resistência (%)	Carreando genes adquiridos (%)	Carreando 2 ou mais genes adquiridos (%)
Gado	102	35 (33,3%)	11 (10,7%)	6 (5,8%)
Frango	45	10 (22,2%)	5 (11,1%)	4 (8,8%)
Olericultura	89	18 (20,2%)	11 (12,3%)	9 (10,1%)
N/D	124	26 (20,9%)	15 (12,1%)	9 (7,2%)
Total *	360	89 (24,7%)	42 (11,6%)	28 (7,7%)

* O total não reflete a soma dos isolados em cada categoria, pois aqueles obtidos sob impacto de mais de uma AE foram computados em cada uma das respectivas categorias.

5.10 Filogenia por Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

A fim de visualizar os dados obtidos com os isolados organizados numa perspectiva molecular detalhada, estes foram analisados de acordo com polimorfismos de

lócus únicos no core genes (cgSNPs). Para verificar a acurácia da análise em agrupar os isolados correspondendo aos seus respectivos clados de sorovares, subespécies ou espécie, foram incluídos seis genomas de referência, sendo eles: *S. bongori* NCTC12419 (GCF_000252995.1); *S. Typhimurium* LT2 (GCF_000006945.2); *S. enterica* subsp. *salamae* RSE09 (GCF_003994635.1); *S. enterica* subsp. *diarizonae* MZ0080 (GCF_002211965.1); *S. enterica* subsp. *houtenae* CVM24399 (GCF_016454305.1); e *S. enterica* subsp. VII SGSC3121 (GCA_018338515.1). Esta análise foi capaz de separar os isolados de subespécies diferentes, como é possível observar o agrupamento de isolados de cada subespécie em diferentes clados, assim como separar os isolados conforme seus sorovares. A análise foi capaz, inclusive, de identificar o perfil polifilético entre os isolados de Newport, onde os isolados do ST45, ST2370 e ST10982, foram agrupados em subclados do sorovar. Da mesma forma, a profundidade da análise permitiu elucidar o perfil parafilético de Oranienburg, esse flanqueando o sorovar Schwarzengrund.

A integração da filogenia com os dados obtidos em outras análises realizadas neste documento, permite uma visão geral da ocorrência e distribuição de genes de resistência e virulência nos sorovares e nas bacias hidrográficas analisadas. Entendemos que na versão impressa deste documento pode não ser possível identificar o nome dos sorovares ou os genes de resistência que correspondem a cada quadro; contudo, recursos de aproximação podem ser utilizados na versão digital desta dissertação para acesso a todos os metadados ali descritos (**Figura 21**).

Nesta análise, os isolados de Saphra chamaram atenção por apresentarem, sem exceções, o gene *fosA7*, pertencerem todos ao mesmo ST (ST1604) e serem todos obtidos da mesma bacia hidrográfica (MPS). Dadas estas particularidades, uma análise mais profunda foi realizada com o objetivo de responder se a ocorrência desse gene é característica desse sorovar, se ele possui diferentes STs e se a sua ocorrência está associada a amostras de água/ambientais. Para isso, foram selecionados sequenciamentos por short reads (illumina) de isolados do sorovar Saphra a partir da plataforma PathogenDetection. Foram identificados 98 sequenciamentos, onde 38 são amostras do Brasil (amostras coletadas no presente estudo), 1 do Canadá, 1 da Irlanda, 3 do México, 7 do Reino Unido (UK) e 37 dos Estados Unidos da América (USA) e 10 não tinham dados de país/região/localização de obtenção. Ao todo, 42 amostras eram ambientais (38 de água deste estudo), 1 de animal, 37 de humanos, 8 de alimentos e 9 não tinham dados de isolamento. Das 98 amostras disponíveis na plataforma PathogenDetection, 7 não

foram incluídas no estudo, pois não tinham o número de acesso (código SRR ou ERR) que permitisse o *download* dos genomas. Além dessas, 13 amostras da nossa coleção não foram incluídas, pois foram removidas na etapa de remoção de clones, restando apenas 24 amostras não clonais da própria coleção de estudo. Como não foi possível encontrar um genoma de referência para este sorovar, uma amostra do Rio de Janeiro foi definida como a de referência para a análise (**Figura 22**).

Foram identificados quatro STs (ST1604, ST2310, ST5947 e ST10885) associados ao sorovar Saphra. Isolados de STs diferentes se agruparam em clados diferentes. O gene *fosA7* foi encontrado apenas nos isolados do ST1604 (37), sem exceções. A ocorrência desse ST, entretanto, não aparentou ter qualquer relação com a localização onde foi isolado ou com a origem da amostra, o que sugere que o gene *fosA7* é característico do ST1604 e não está correlacionado com localização e origem da amostra.

Sorovares	
	Abactetaha
	Agona
	Albany
	Braenderup
	Bovismorbificans
	Carrau
	Corvallis
	Emek
	Enteritidis
	Grumpensis
	Hadar
	Heidelberg
	I 4:[5],12:-
	I 4:b:-
	II 42:-
	IIIb 35:-
	IIIb 38:(k):z35
	IIIb 50:-
	IIIb 61:l,v,z
	Infantis
	Isangi
	IV 16:z4,z24:-
	IV 16:z4,z32:-
	IV 21:z4,z23:-
	IV 43:z4,z24:-
	IV 48:g,z51:-
	Javiana
	Jos
	Kentucky
	Mbandaka
	Miami
	Minnesota
	Molade
	Newport
	Oranienburg
	Oslo
	Panama
	Rubislaw
	Saintpaul
	Sandiego
	Santiago or Belem
	Saphra
	Schwarzengrund
	Soerenga
	Typhimurium
	VII 38:g,z51:-

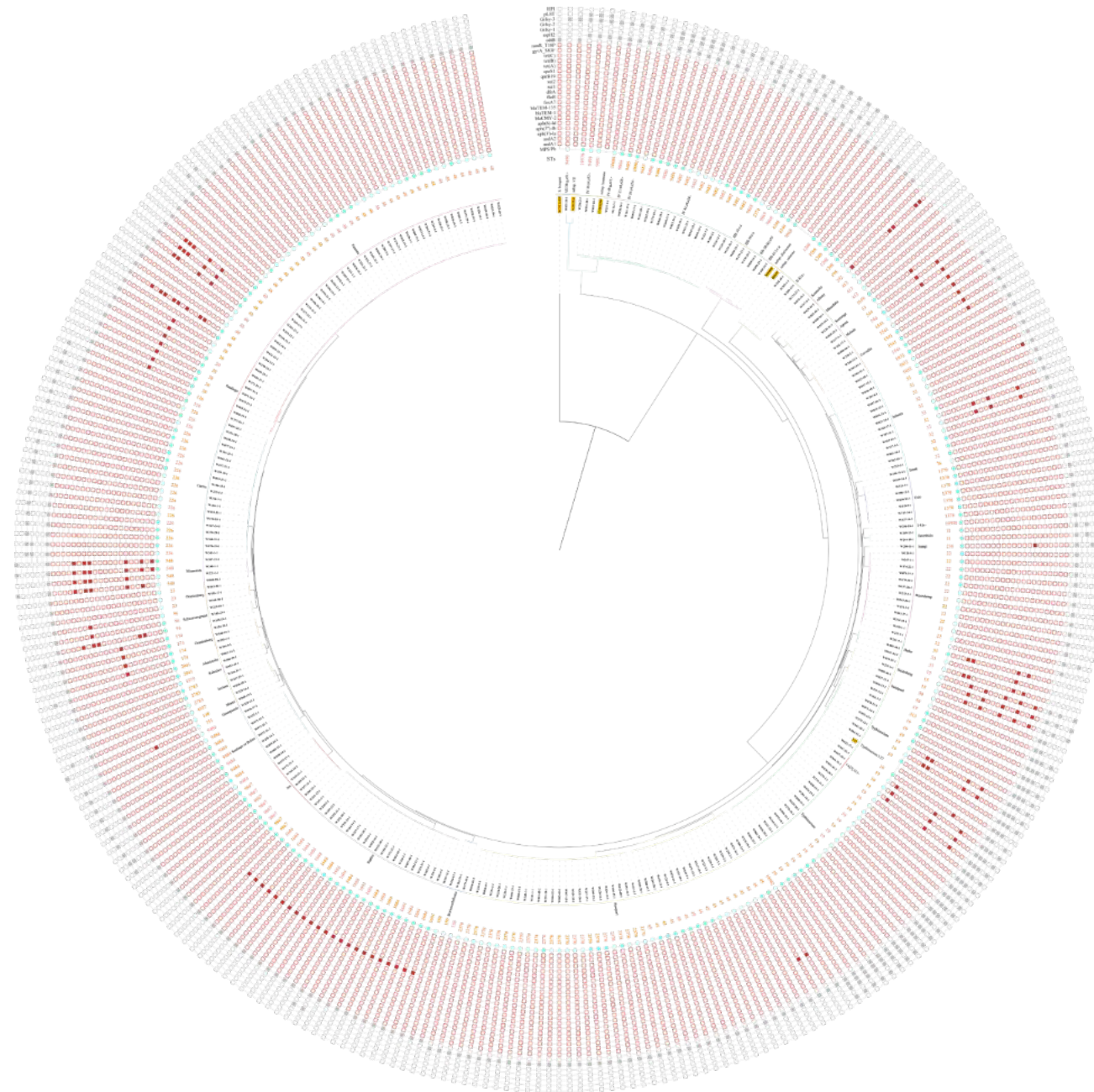


Figura 21 – Árvore filogenética de SNPs de core genes integrada a metadados. Na árvore estão representados 314 genomas (seis referências e 308 genomas da coleção de estudo). Rótulos iniciados em “W”, após os nodos da árvore indicam o nome dos isolados na coleção de estudo. Os intervalos contendo nomes de sorovares indicam quais isolados pertencem àquele sorovar. Seis cepas controles, com nomes marcados em laranja, foram inseridas na árvore (NCTC12419, SGSC3121, CVM24399, MZ0080, RSE09 e TyphimuriumLT2) para maior confiança na topologia da árvore. Números em amarelo, após a classificação dos sorovares indicam o ST do isolado. Na faixa de MPS/Pb, esferas preenchidas em turquesa indicam ocorrência em MPS, enquanto esferas vazias indicam ocorrência em Pb. A presença ou ausência dos genes de resistência está destacada nos espaços

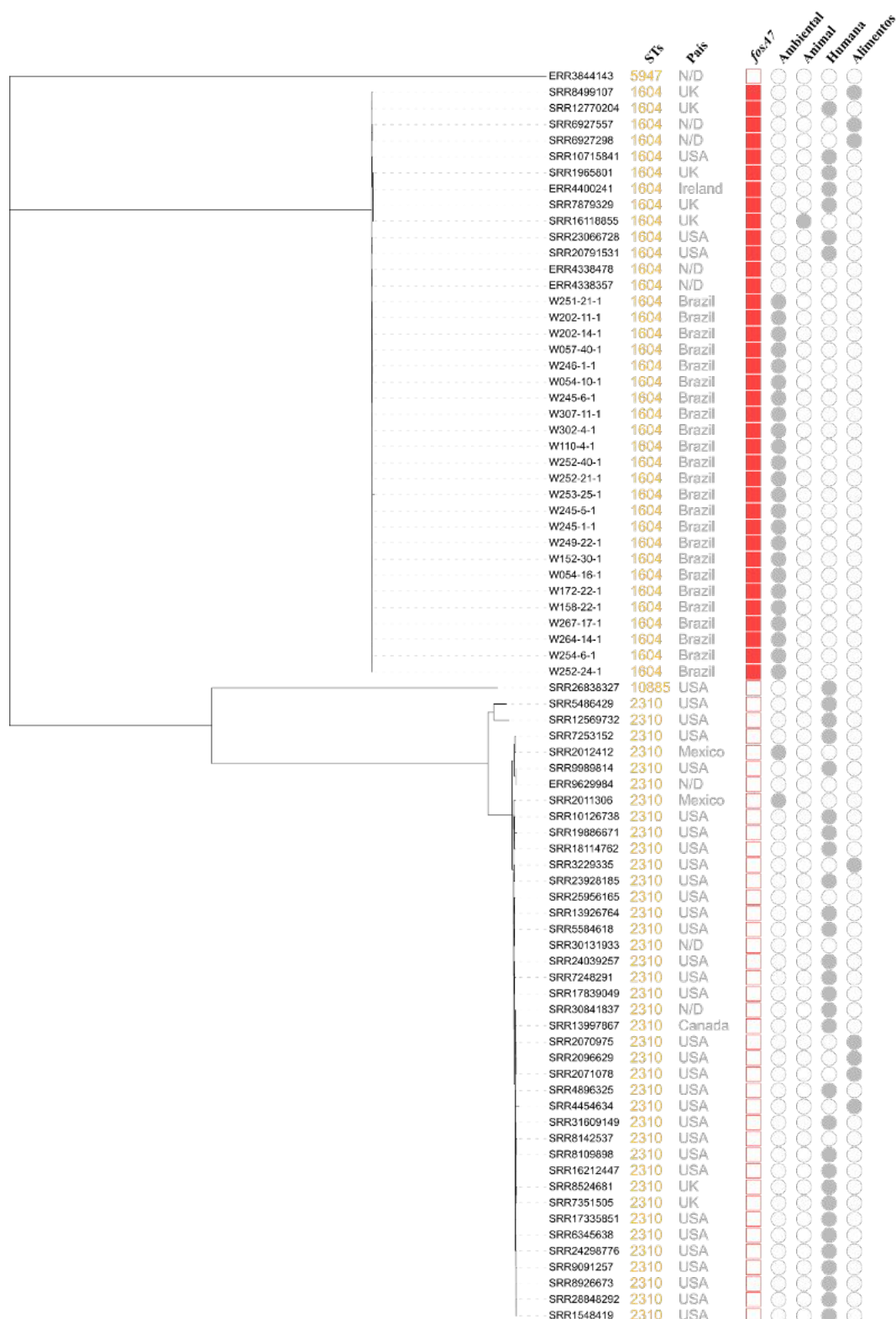


Figura 22 – Árvore filogenética de SNPs de genoma completo de isolados de *Salmonella* Saphra. Ao todo 78 isolados de sorovar Saphra foram obtidos de localizações geográficas e tipo amostral diferentes. Códigos iniciados em SRR ou ERR indicam o número de acesso aos genomas dos isolados. Códigos numéricos em laranja indicam o ST dos isolados. Siglas em cinza indicam o país de origem. Quadrados vermelhos indicam a presença (preenchido) ou ausência (vazio) do gene *fosA7* no genoma da amostra. Esferas cinzas preenchidas indicam a origem da amostra em que foi obtido o isolado de *S. Saphra*. STs: Sequence Types. N/D: Não Descrito. USA: United States of America. UK: United Kingdom.

6 DISCUSSÃO

A proposta inicial deste trabalho foi investigar a ocorrência de bactérias do gênero *Salmonella* em águas superficiais de duas regiões que produzem alimentos no Estado do Rio de Janeiro. Nos ambientes agropecuários amostrados, a ocorrência de *Salmonella* em corpos d'água se justifica tanto pela presença de animais silvestres em áreas de baixa urbanização quanto pela criação intensiva de animais, como bovinos e aves. Adicionalmente, o uso de fertilizantes orgânicos – possivelmente tendo em sua composição camas de aviários e resíduos animais – pode levar bactérias viáveis ao solo, que a irrigação e as chuvas podem arrastar para corpos hídricos. Esse percurso, do solo para a água, aumenta o risco de contaminação de fontes utilizadas para recreação, produção animal/irrigação e abastecimento, ressaltando a importância do conceito “Uma Só Saúde” e a necessidade de vigilância contínua na qualidade da água (Levantesi *et al.*, 2012; Liu, Whitehouse, & Li, 2018; Z. Chen *et al.*, 2024).

Numa comparação entre as regiões amostradas, a prevalência de *Salmonella* foi maior na região do MPS do que na do Pb. Isto, a princípio, é curioso, porque em MPS havia mais áreas sem atividade econômica visivelmente próximas aos pontos de coleta. Contudo, nesta região, muitos pontos estavam conectados com pastagens, onde animais livres podem ser a fonte de contaminação das águas. Por outro lado, na bacia do Pb havia mais produção de frango e áreas dedicadas a olericultura. De fato, nossas análises apontaram que a produção de frango, isoladamente ou combinada a outras atividades, esteve mais associada à contaminação das águas por *Salmonella*, seguida da produção de gado, do que áreas sem AE próxima visível (mesmo em águas que sabidamente passam por várias propriedades rurais ativas), ou a atividade de olericultura. Este fato pode estar relacionado a uma possível descarga de resíduos das granjas nas águas, o que ocorre menos no caso da criação de gado, uma vez que a produção costuma ser menos intensiva e espalhada em uma grande área. Vale ressaltar que, embora áreas próximas a plantações não tenham sido associadas a uma maior ocorrência de *Salmonella*, o microrganismo foi identificado em 50% das amostras de água coletadas nestas áreas.

Quanto ao nível de urbanização, observou-se a recuperação de *Salmonella* de todos os contextos avaliados (rural, semi-urbano e urbano), com um certo destaque para as áreas rurais da bacia do MPS, o que pode ser devido ao grande número de amostras próximos a áreas de pastagem nestas áreas. Quanto à variedade de sorovares obtidos, em ambas as bacias foram identificados cerca de 30 diferentes sorovares, tendo 15 sido

exclusivamente identificados em MPS. Contudo quando verificada a distribuição dos sorovares segundo o NU, observou-se que áreas rurais concentram uma maior diversidade de sorovares do que áreas urbanas e semiurbanas, ainda que grande parte dos sorovares mais representados na coleção tenham sido recuperados de todos os tipos de AE e NU. Ao todo, cerca de 80% dos isolados da coleção foram representados por apenas 15 sorovares – entre eles, Panama ($n = 44$), Newport ($n = 43$), Typhimurium ($n = 27$), Saphra ($n = 23$), Carrau ($n = 20$), Infantis ($n = 15$), IV 43:z4,z24:- ($n = 15$) e Braenderup ($n = 13$) –, um fenômeno que foi similar entre MPS e Pb.

A maior diversidade de sorovares em áreas rurais pode se justificar pela maior presença de diferentes animais, incluindo animais silvestres. Muitos sorovares detectados apenas em áreas rurais eram de outras subespécies que não *S. entérica* subsp *entérica*. Aqui, vale um destaque para a abordagem metodológica adotada neste projeto, em que se partiu de um grande número de colônias típicas, seguido de identificação e triagem por RAPD para envio ao sequenciamento. Estudos com outros desenhos, como os de Topalcengiz *et al.* (2017) e Chevez *et al.* (2024), ao utilizarem a triagem por PCR (gene *invA*) seguida de sorotipagem de um único isolado representativo por amostra, relataram baixas ocorrências de *Salmonella* em lagoas de irrigação na Florida e Georgia (EUA) (6,81% e 4,81%, respectivamente). Já Callahan e colaboradores (2019), aplicaram uma metodologia mais versátil nas 46 amostras de água coletadas de 24 pontos de coleta ao longo de 4 rios da costa de Maryland, onde trabalharam com mais de um isolado por amostra de água para identificação e caracterização, identificaram a presença de *Salmonella* em 65% das amostras avaliadas, em que 157 isolados tiveram o sorovar identificado, levando à identificação de 18 sorovares. Aplicar critérios na seleção de isolados evidencia como a metodologia pode influenciar a percepção da diversidade epidemiológica.

De fato, os resultados deste estudo demonstram como a metodologia adotada permitiu uma análise detalhada da epidemiologia dos sorovares de *Salmonella* nas respectivas regiões. A capacidade da metodologia em capturar a diversidade é evidenciada pela abundância de sorovares e representantes clonais nas amostras de água. Por exemplo, nas amostras W0038 e W0047, todos os 5 isolados obtidos pertenciam a sorovares diferentes (Panama, Typhimurium, Santiago, Belem, Carrau e IV 43:z4,z24:- na W0038; e Newport, Typhimurium, I 4,[5],12:i:-, Carrau e IV 43:z4,z24:- na W0047). Em outras amostras, diferentes isolados de um mesmo sorovar com mais de 10 SNPs de diferença no core genoma, foram mantidos nesse estudo. Foi o que ocorreu na amostra W245 (3

isolados de Saphra, 1 de Panama e 1 de Schwarzengrund) e W252 (3 isolados de Saphra, 1 de Panama e 1 de Carrau), entre outras.

A realização de estudos epidemiológicos sobre *Salmonella* é essencial devido à grande diversidade desse gênero e seu potencial de causar surtos associados a alimentos contaminados. Diversos estudos evidenciaram a relação de surtos de salmonelose causados por *S. Newport* com o consumo de produtos agrícolas irrigados com água contaminada. Por exemplo, surtos nos EUA foram associados ao consumo de tomates em 2005 (Greene *et al.*, 2008), pepinos em 2014 (Angelo *et al.*, 2015) e cebolas entre 2016 e 2019 (McCormic *et al.*, 2022). Nos casos dos tomates e cebolas, a contaminação foi diretamente ligada ao uso de água contaminada na irrigação (McCormic *et al.*, 2022). No primeiro estudo citado, uma cepa (PFGE JJPX01.0061) foi identificada como persistente em poços de irrigação de plantios de tomates na região de Delmarva, onde essa mesma cepa esteve associada a um surto pelo consumo de pepinos produzidos nessa mesma região. No caso do surto ocorrido em 2014 devido ao consumo de pepinos contaminados (Angelo *et al.*, 2015), a origem exata da contaminação não foi identificada, sugerindo possíveis falhas no manejo dos produtos.

A influência de *Salmonella* em alimentos que dispensam cozimento também foi observada em surtos relacionados ao consumo de melancias produzidas no Brasil e exportadas para seis países europeus (Inglaterra, País de Gales, Irlanda do Norte, Escócia, Irlanda e Alemanha) em 2014 (Byrne *et al.*, 2014). Esses dados reforçam o potencial do patógeno em causar surtos associados a alimentos de origem não animal, especialmente quando contaminados por água de irrigação inadequada. A contaminação da água, por sua vez, está frequentemente ligada a atividades agropecuárias, como também evidenciado no estudo de McCormic *et al.* (2022), que associou a contaminação de cebolas à proximidade de criações de bovinos. Da mesma forma, a contaminação de um rio urbano com esgoto doméstico e escoamento de resíduos agrícolas e de pastagem de bovinos, no nordeste brasileiro, foi relatada por Ceballos *et al.* (2003). Foram encontrados isolados de *Salmonella* em todos os 7 pontos de coleta nesse rio, onde a maior frequência foi em pontos impactados por esgoto doméstico e escoamento de resíduos agropecuários. Entre os 141 isolados, foram identificados os sorovares Hadar, Anatum, Newport, Florian e Saintpane (Ceballos *et al.*, 2003).

Essa conexão entre água contaminada e surtos é corroborada pelos dados de nosso estudo, que identificou *Salmonella* Newport como um dos sorovares mais frequentes em águas superficiais de regiões agropecuárias. Não é possível afirmar,

contudo, se a ocorrência de *Salmonella* nestes locais é uma consequência da atividade ali realizada ou reflete outras atividades a montante e apenas representa um risco para os vegetais irrigados com estas águas. De qualquer forma, nossos resultados sugerem que *S. Newport* é relativamente comum em águas superficiais em áreas agrícolas no estado do Rio de Janeiro, o que inspira atenção para a qualidade da água utilizada na produção de vegetais que não serão submetidos a tratamento térmico antes de seu consumo.

Entretanto, é importante ter ciência que a ocorrência de *Salmonella* em ambientes aquáticos pode não estar ligada a fontes de contaminação próximas ou facilmente rastreáveis. Essa situação é ilustrada por um surto de *Salmonella* Enteritidis na Croácia em 2014, associado ao consumo direto de água subterrânea contaminada. A fonte de água estava localizada em uma área com intensa atividade agrícola, onde resíduos animais eram usados como fertilizantes, e residências que não estavam conectadas ao sistema de esgoto central contribuía para a contaminação. O surto coincidiu com o período de fertilização e chuvas intensas ($>250 \text{ L/m}^2$), que levaram ao escoamento de resíduos agrícolas e esgoto para a fonte de água (Kovačić, Huljev, & Sušić, 2017). Esse caso reforça a importância de monitorar a qualidade da água em regiões agrícolas, especialmente considerando sorovares capazes de causar infecções em humanos (Mkangara, 2023).

Neste trabalho, em locais influenciados pela criação de frangos, foram encontrados isolados de *Salmonella* Typhimurium, Panama, Braenderup, Newport, Infantis, Oranienburg e outros 15 sorovares. Já em pontos impactados por olericultura, os sorovares mais prevalentes foram Newport, Panama, Typhimurium, Infantis e Braenderup, entre outros 19 sorovares. Somando os dois cenários, os sorovares Newport ($n = 21$), Panama ($n = 18$) e Typhimurium ($n = 17$) destacaram-se como os mais frequentes. Esses achados estão alinhados com estudos anteriores, que relatam a prevalência de Newport e Typhimurium em amostras de água de poços de irrigação e lavagem e camas de aviários (Levantesi *et al.*, 2012; Gu 2019). No entanto, uma maior ocorrência de *Salmonella* Panama não tem sido comum em estudos com esta ênfase em outras regiões, o que ressalta a singularidade dos dados aqui apresentados.

Outra característica interessante na epidemiologia dos sorovares nestas bacias hidrográficas do Rio de Janeiro, foi a frequente detecção de isolados de *Salmonella* Saphra apenas em MPS, região essa com maior impacto da criação de gado. Poucos estudos dedicados à *Salmonella* abordam o sorovar Saphra. Isso que pode ser um reflexo de sua menor prevalência ou do fato de não ter sido recentemente associado a surtos

importantes de gastroenterites em países que realizam e publicam este monitoramento. As análises genômicas desse sorovar da nossa coleção, em conjunto com os genomas obtidos no *PathogenDetection* evidenciam que, de todos os 97 genomas de Saphra publicados, 38 eram genomas da coleção de amostras do nosso grupo. A respeito dos demais genomas publicados, 36 eram dos EUA, sete eram do Reino Unido, dois do México, um do Canadá, um da Irlanda (a grande maioria dos isolados obtidos de humanos e de alimentos) e 8 não tinham dados relativos à geolocalização de obtenção dos isolados.

A análise por STs da epidemiologia de *Salmonella* facilita a compreensão da ocorrência de linhagens de sorovares geograficamente. O conhecimento sobre a endemicidade de determinado ST, em uma dada região, facilita estudos de rastreamento desse patógeno. A ocorrência do ST19 de Typhimurium neste estudo não surpreende, visto que este é o ST mais comum e recorrente deste sorovar (Achtman *et al.*, 2012; Seribelli *et al.*, 2021). Entretanto, um dos isolados de Typhimurium que caracterizamos foi identificado como do ST313, conhecido por causar infecções mais invasivas e inflamatórias em indivíduos imunocomprometidos, característico em surtos endêmicos da África sub saariana (Okoro *et al.*, 2015). O isolado no Rio de Janeiro foi obtido de uma amostra de água de uma região urbana em MPS, sem impactos por AE; mas, no que diz respeito à virulência, não identificamos nenhuma diferença neste isolado em comparação aos demais isolados de Typhimurium pertencentes ao ST19. Contudo, com foco no mesmo questionamento, Seribelli e colaboradores. (2021), verificaram, através de análises de RNAseq, uma maior expressão dos genes de virulência *sopD2*, *pipB* e *ssaS* em isolados de ST313, quando comparada à expressão dos mesmos genes em isolados do ST19.

Alguns sorovares são conhecidos pelo seu caráter polifilético, onde a sorotipagem não é sensível o suficiente para detectar diferenças genômicas entre os isolados de um mesmo sorovar, que pode apresentar diferentes perfis gênicos e, inclusive, não compartilharem de um mesmo ancestral comum. Essa característica dificulta a rastreabilidade desses isolados uma vez que podem apresentar o mesmo sorovar, mas terem hospedeiros prioritários, causar diferentes infecções e estarem associados a diferentes geolocalizações (Yin *et al.*, 2020). Sorovares como Newport, Saintpaul e Kentucky são citados como alguns dos principais sorovares polifiléticos de *Salmonella* (Worley *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2020) e foram identificados neste trabalho. Embora devido a baixa representatividade de Kentucky (apenas um isolado obtido) e Saintpaul (dois isolados pertencentes ao mesmo ST) não foi possível evidenciar um perfil polifilético, onde o sorovar Newport, com 43 isolados, esteve vinculado a três STs (1 isolado de

ST10982, 25 isolados de ST2370 e 17 isolados de ST45). Nosso estudo evidenciou uma organização dos isolados de Newport em diferentes ramos da árvore filogenética, mas ainda assim compartilhando o mesmo ancestral comum. Também é possível observar um perfil parafilético entre os isolados do sorovar Oranienburg, onde quatro isolados do ST174 se agrupam em um ramo intercalado com isolados do sorovar Schwarzengrund (3 isolados), separando os demais três isolados do ST23 de Oranienburg em outro ramo da árvore, neste caso inclusive com diferentes marcadores de resistência a antimicrobianos. Esse fenômeno de parafilia é visto por Worley *et al.* (2018) com o sorovar Saintpaul. Embora a análise realizada não tenha produzido evidências sobre a ocorrência de outros grupos polifiléticos e parafiléticos, alguns grupos apresentaram divergências substanciais nos core genes entre os isolados de diferentes STs de um mesmo sorovar, como os sorovares Javiana, Sandiego e IV 43:z4,z24:-, onde os isolados de diferentes STs ainda pertenciam ao mesmo clado, mas se distribuíam em diferentes ramos, demonstrando divergências evolutivas nos core genes. Sorovares monofiléticos, como Infantis e Typhimurium, apresentaram uma distribuição mais uniforme na árvore filogenética, mesmo tendo apresentado mais de um STs de cada sorovar. O mesmo foi observado para os isolados do sorovar Panama, que estão todos vinculados ao ST48.

Essa possibilidade de ocorrência de sorovares polifiléticos associados a diferentes geolocalizações é vista em Newport, onde entre os três STs de Newport que foram encontrados na nossa coleção; o ST10982 ocorreu uma única vez; o ST45 ocorreu em proporções similares em ambas as bacias hidrográficas, e o ST2370 ocorreu quatro vezes mais em Pb, indicando que esse ST tem uma maior correlação com essa bacia. Não houve nenhuma outra correlação de STs específicos com bacias hidrográficas, com exceção de Newport.

Outro aspecto da diversidade dos sorovares é refletido na aquisição e transferência de genes associados a plasmídeos. Diversos tipos de plasmídeos são conhecidos em gêneros da família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella* (Carattoli, 2009), o que reflete a plasticidade genotípica desses indivíduos em adquirir material genético exógeno (McMillan *et al.*, 2020). Entre os 308 isolados com genomas sequenciados, em 113 foi possível identificar, nos genomas montados, sequências nucleotídicas com identidade plasmidial associada a algum grupo de incompatibilidade (Inc). Nessas sequências havia genes de virulência e resistência aos antimicrobianos associados. Foram encontrados 17 grupos Inc nestas amostras, onde alguns ocorreram em conjunto nas mesmas *contigs*, como IncFIB/IncFII, Col440II/ColRNAI e

Col440I/Col440II. A detecção de mais um gene relacionado a diferentes sistemas de replicação em um mesmo plasmídeo não é um fenômeno comum, e sequenciamentos baseados em *long reads* serão necessários para confirmar se ocorreu um fenômeno de cointegração, ou se a detecção dos dois marcadores Inc numa mesma *contig* pode ser consequência de um artifício de montagem de plasmídeos. Sabe-se que plasmídeos tipo Col são pequenos (cerca de 10 kb) e normalmente estão em múltiplas cópias na célula bacteriana (Novick, 1987; Ares-Arroyo, Rocha & Gonzalez-Zorn, 2021). Um estudo recente propôs uma estrutura com grandes áreas de homologia entre Col440II e ColRNAI, (Miller *et al*, 2020) o que suporta a hipótese de que seriam diferentes plasmídeos e não um único plasmídeo com dois sistemas Rep.

Neste estudo também observamos que mais de 30 isolados apresentaram duas ou mais *contigs* identificadas como sequência plasmidial, o que pode ser interpretado como mais de um plasmídeo por célula. Em muitos casos estas sequências estavam vinculadas a diferentes genes de resistência ou virulência. No entanto, seguindo os dados da literatura, não foi encontrada nenhuma sequência plasmidial contendo, na mesma *contig*, genes de virulência e resistência.

Um total de 38 isolados, com representantes de cinco sorovares (Typhimurium e sua variante monofásica, Enteritidis, Santiago ou Belem e IV 48:g,z51:-) apresentaram algum replicon de IncF contendo genes de virulência (operons *spvBCR*, *pefABCD*, *rck*, *yopJ/yopP* e *sspHI*). Na literatura, replicons de IncF (IncFIB/IncFII) são frequentemente descritos como plasmídeos de virulência por sua associação com os operons *spvBCR* e *pefABCD* (Silva *et al.*, 2017; McMillan *et al.*, 2020). Neste trabalho, isolados de *S. Typhimurium* (27) e *S. Enteritidis* (2) apresentaram, quase todos, sequências plasmidiais de replicons de IncF contendo os mesmos operons. Apenas um isolado de Typhimurium (W004-32-1) apresentou a sequência plasmidial de IncFIB/IncFII sem nenhum gene associado, embora os operons mencionados tenham sido encontrados no genoma montado desse isolado. Essa falha pode ser atribuída a um erro na identificação de sequências plasmidiais. Considerando a qualidade da montagem do genoma, é possível que o *software* geNomad não tenha identificado com acurácia as sequências plasmidiais contendo os operons.

Contudo, o gene *rck* (relacionado à resistência ao *killing* do sistema complemento), foi encontrado neste trabalho em uma sequência plasmidial IncFIB/IncFII, contendo os operons *spvBCR* e *pefABCD*, apenas em *S. Typhimurium* monofásica (I 4,[5],12:i:-) (Koczerka *et al.*, 2021). Ainda, os genes *yopJ/yopP* (um

sistema de secreção do tipo III) que normalmente ocorrem em plasmídeos IncF de *Yersinia* (Villa *et al.*, 2010), foram identificados em sequências plasmidiais IncF de 8/9 isolados de Santiago ou Belem (todos isolados em locais e momentos diferentes).

Já o gene *sspH1* (relacionado à supressão da resposta imunológica via ubiquitinação), comumente associado a prófagos Gifsy-3 (Kropinski *et al.*, 2007), foi identificado em um plasmídeo de *S. IV* 48:g,z51:-. A identificação desse gene em uma sequência plasmidial pode também ser um indicativo no erro de processamento dos dados genômicos pelo *software* geNomad, assim como um indicativo de inserção desse gene de prófago na sequência plasmidial.

Além dos genes adquiridos, a presença de uma ilha de alta patogenicidade de *Yersinia* (High Pathogenicity Island, HPI), contendo os genes *fyuA*, *irp1*, *irp2* e o operon *ybtAEPQSTUX*, em todos os isolados de quatro sorovares da subespécie *diarizonae*, bem como nos sorovares Heidelberg, Miami e em três dos quatro isolados de Minnesota, sugere que essa HPI conferiu vantagens adaptativas ao longo do processo evolutivo de *Salmonella*, permitindo sua manutenção íntegra nesses sorovares. Genes associados a HPI também foram identificados em cerca de 60% dos genomas de 175 isolados de *S. Heidelberg* obtidos no Brasil entre 1968 e 2018 e disponíveis na base de dados do NCBI, caracterizados no estudo feito por dos Santos e colaboradores (2021). No trabalho, os autores relatam que entre 775 isolados pertencentes a 41 sorovares, genes típicos da HPI foram identificados apenas no sorovar Heidelberg (dos Santos *et al.*, 2021). Já no estudo de Oelschlaeger *et al.* (2003), 74 isolados de *Salmonella* foram testados para a presença de HPI, onde a ocorrência dessa ilha de patogenicidade foi vista apenas em 1/9 isolado da subespécie *arizonae*, todos os 11 isolados da subespécie *diarizonae* e 2/8 isolados da subespécie *indica* (Oelschlaeger *et al.*, 2003). A HPI também foi identificada em 80/134 isolados, em sequências plasmidiais associadas ao grupo IncA/C2, de *Salmonella* Minnesota, obtidas de diferentes fontes e geolocalizações do mundo (dos Santos *et al.*, 2024), assim como no cromossoma de 45/107 isolados, também de diferentes fontes e geolocalizações (Kipper *et al.*, 2020). Neste sentido, o presente trabalho traz novos dados, pois, além da ocorrência de HPI em *Salmonella* ter sido pouco documentada em Heidelberg, Minnesota e na subespécie *diarizonae*, não há relatos sobre a ocorrência no sorovar Miami.

Algumas SPIs são quase universais entre os sorovares, como SPI-1 e 2 (Hensel, 2004), entretanto, a ocorrência de todos os genes que as compõe não é mandatória, sendo sujeita a deleções e perdas de genes ali contidos, ou até mesmo de todos os genes da ilha

inteira, como o que possivelmente ocorreu com o isolado W039-35-1 de Heidelberg, onde a SPI-1 não está codificada no genoma montado do isolado. A perda dessa ilha poderia refletir na perda de patogênese desse isolado (Diard *et al.*, 2013), visto que genes ali contidos como os do operon *inv*, *prg*, *sipABCD* (translocases) e gene *sptP* (desfaz a remodelação da actina), essenciais para o processo de invasão da célula hospedeira, estão ausentes no genoma. De todos os genes da SPI-1 ausentes nesse isolado, apenas o gene *avrA* (inativação de vias pró inflamatórias por NF- κ B e indução da apoptose) (Lou *et al.*, 2019) foi encontrado.

É possível ver que alguns genes de ilhas canônicas de todos os sorovares não necessariamente estarão presentes em todos os isolados, como observado nos estudos de Gan *et al.* (2011), que indicaram que os genes *avrA*, *sptP* e *sifB* estão ausentes ou ocorrem em baixa frequência em sorovares de subespécies não *enterica*. A ausência desses genes pode refletir na sua baixa infecciosidade em hospedeiros humanos. Dessa forma, a evolução do viruloma dessas subespécies pode corresponder à adaptação dessas, também, à microbiota dos seus hospedeiros. Como descrito na revisão de Lamas e colaboradores (2018), há casos de infecções por subespécies não *enterica* em humanos, mas são casos isolados, onde o indivíduo acometido pela infecção apresenta, na maioria das vezes, alguma imunodepressão, doença prévia, idade avançada ou é recém-nascido.

Na perspectiva dos genes de resistência aos antimicrobianos, 16 genes adquiridos, capazes de conferir resistência a seis classes de antimicrobianos foram identificados nos isolados caracterizados: tetraciclina (*tet(A)*, *tet(B)* e *tet(C)*; 19/80, 23,7%) aminoglicosídeos (*aadA1*, *aadA2*, *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*; 16/80, 20%); β -lactâmicos (*bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-135}* e *bla_{CMY-2}*; 13/80, 16,2%), sulfonamidas (*sul1* e *sul2*; 12/80, 15%), quinolonas (*qnrB19*; 11/80, 13,7%); fenicóis (*floR*; 6/80, 7,5%) e trimetoprim (*dfrA*; 3/80, 3,7%). A maior parte deles estava codificada em sequências plasmidiais; mas *tet(B)* e *tet(C)*, *aadA1*, *aadA2*, *bla_{CMY-2}*, *qnrS1*, *fos* e *dfrA* não foram identificados em *contigs* contento marcadores de grupos Inc. Para muitos destes genes com provável ocorrência em EGMs, será possível a investigação desses casos com a realização de sequenciamentos por *long-reads*. Ainda, identificamos a presença de *fosA7* ($n = 41$), intrínseco em alguns sorovares, e mutações em genes *gyrA* ($n = 4$) e *ramR* ($n = 1$), as quais afetam a atividade de fosfomicina, fluoroquinolonas e betalactâmicos, como será discutido mais adiante.

Entre os genes de resistência mais frequentemente descritos nos isolados está *tet(A)*; que foi identificado em 6 sorovares (Panama, Minnesota, Heidelberg,

Typhimurium, Hadar e Schwarzengrud) em combinação com diferentes genes de resistência vinculados a diversos grupos Inc. O gene *tet(B)* foi identificado somente na variante monofásica de *S. Typhimurium* (I 4,[5],12:i:-). O uso de tetraciclinas por mais de 50 anos na produção animal, pode ter levado à contaminação do ambiente com estas moléculas, mantendo-as na forma original ou parcialmente degradadas no solo por longos períodos de tempo, oferecendo pressão seletiva a bactérias que ali circulam (Zhu Wang, Li, Wang, & Li, 2024). Martins e colaboradores, inclusive, evidenciaram muitos e diversos genes de resistência a tetraciclina em *Plesiomonas shigelloides* isoladas de tilápias cultivadas em pequenas propriedades no Estado do Rio de Janeiro (Martins *et al.*, 2019). De fato, genes *tet(A)* e *tet(B)* são amplamente distribuídos em elementos genéticos que circulam entre gêneros da família *Enterobacteriaceae* (Roberts, 2005) e não é surpreendente que sejam identificados em bactérias isoladas deste contexto.

Além disso, o gene *qnrB* esteve associado a plasmídeos Col440I em sete sorovares (Corvallis, Hadar, Minnesota, Newport, Panama, Schwarzengrund e Typhimurium), assim como ocorreu em contigs que não foram classificadas como plasmidiais pelo geNomad (Isangi e Molade). A presença de genes *qnrB* em isolados relacionados à agricultura no Brasil já foi relatada em diversos contextos (Rabello *et al.*, 2020). Outros estudos focados especificamente em *Salmonella* no Brasil também evidenciaram esta ocorrência no gênero (Monte *et al.*, 2019; Monte *et al.*, 2021; Braga *et al.*, 2023). Assim como a ocorrência do gene em Col440I também foi observada (Akinyemi *et al.*, 2023; Aworh *et al.*, 2024). O gene *qnrS* foi identificado somente em *S. Panama* e não foi possível estabelecer sua relação com nenhuma Inc específica ou sequência plasmidial nesse trabalho.

Quanto aos genes codificadores de β -lactamase, o gene *bla_{TEM-135}* ocorreu apenas em sequências plasmidiais de Panama, em IncX1; e *bla_{TEM-1}* esteve associado a sequências IncR em outros isolados de *S. Panama*, juntamente com genes *floR* e *tet(A)* em sequências IncFIC. Curiosamente, ainda que não tenha sido possível identificar os marcadores Inc em *S. Infantis*, estes mesmos genes da combinação IncR e IncFIC foram identificados em dois isolados deste sorovar. A este respeito, uma análise simples de hibridação entre as *contigs* contendo marcadores Inc e genes de resistência identificadas em *S. Panama* e as *contigs* contendo apenas os genes de resistência em *S. Infantis* sugere que os mesmos plasmídeos IncX e IncR podem estar em *S. infantis*. Plasmídeos IncX1 são conjugativos, mas têm esta funcionalidade normalmente reprimida, e contém entre 30 e 50 kb (Johnson *et al.*, 2012). Zhang e colaboradores, em um estudo que envolveu bancos de dados

diversos, identificou que *S. enterica* e *E. coli* são importantes carreadores de plasmídeos IncX1, muitos carreando *bla*_{TEM-1B} (X.-Z. Zhang *et al.*, 2018). Já IncR, plasmídeos, descritos originalmente em *Klebsiella* e *S. Montevideo*, não são conjugativos por não conterem genes *tra* ou uma relaxase, mas podem ser mobilizados (McMillan *et al.*, 2020). Segundo MacMillan e colaboradores, plasmídeos IncR não são comumente relatados, mas já foram descritos em *S. Newport* carreando genes de resistência a cinco classes de antimicrobianos num surto nos Estados Unidos (Plumb, 2019).

Quanto ao gene *bla*_{CMY-2}, que ocorreu nos sorovares Heidelberg e Minnesota, nossa abordagem metodológica não permitiu estabelecer uma clara vinculação desse gene com sequências plasmidiais. Contudo, isso será investigado em análises complementares utilizando estratégias como sequenciamento com *long reads*, e análises de unidades taxonômicas de plasmídeos (*plasmid taxonomic units*, PTUS) (Garcillán-Barcia, Redondo-Salvo, & de la Cruz, 2023). Uma exploração mais detalhada da identidade dos genes associados a *bla*_{CMY-2} é necessária porque é sabido que este gene ocorre em diferentes plasmídeos em *E. coli* não somente no Brasil, mas também em outros lugares do mundo (Bortolaia *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2017; Pietsch *et al.*, 2018; Botelho *et al.*, 2020).

Ainda, aminoglicosídeos normalmente não são usados no tratamento de infecções por *Salmonella*, devido à sua baixa capacidade de penetrar células do hospedeiro, o que é importante no caso de bactérias que têm parte do seu ciclo de infecção no ambiente intracelular (Maurin & Raoult, 2001). Sabe-se ainda que isolados pertencentes à espécie *S. enterica* podem carrear cópias de genes *aad* em seu cromossomo (Koskiniemi *et al.*, 2011). Mesmo assim genes de resistência a aminoglicosídeos foram identificados em isolados neste trabalho, alguns vinculados a plasmídeos ColRNAI e outros sem vinculação a Inc.

Genes *fosA* codificam uma glutatona-S-transferase, e têm sido identificados como diferentes variantes (*fosA*, *fosA2* a *fosA6*, *fosB*, *fosC*, *fosX*, entre outras) em plasmídeos que circulam entre membros da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Contudo, em 2015, Dhanani e colaboradores descreveram uma nova variante, nomeada *fosA7*, no genoma de isolados de *S. Heidelberg* obtidos de frangos de corte no Canadá (Dhanani *et al.*, 2015; Rehman *et al.*, 2017). Estudos subsequentes evidenciaram a ocorrência do gene também no genoma de *Salmonella* Derbi e Reading, isoladas de animais de criação na China, e demonstraram que a metaloenzima, produto do gene *fosA7*, é capaz de conferir resistência à fosfomicina tanto em seus hospedeiros originais quanto

em outros sorovares de *Salmonella* ou em *E. coli*, se mobilizado por plasmídeos (Rehman *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021). No presente trabalho com amostras do Estado do Rio de Janeiro, o gene *fosA7* foi identificado nos sorovares Agona, Grumpensis, Heidelberg, Molade, Oranienburg, Sandiego e Saphra, com ocorrência variada em Oranienburg (4/7) e Sandiego (7/9), e ocorrendo em todos os 23 isolados de Saphra.

Considerando que havia um número significativo de isolados do sorovar Saphra caracterizados na coleção, realizamos uma análise complementar com o objetivo de investigar se a ocorrência do gene nestes isolados seria mais provavelmente uma característica intrínseca do sorovar, ou se refletiria uma questão regional. A análise filogenética realizada em comparação com genomas de outros estudos publicados, sugeriu que o gene *fosA7* parece ser intrínseco do ST1604 de Saphra, mas não de outros STs ligados ao sorovar. Dois isolados de *S. Saphra* obtidos de contextos de produção animal no estado do Paraná caracterizados no estudo de Monte e colaboradores (2021) também pertenciam ST1604 e carregavam o gene *fosA7*.

Uma mutação na região que determina resistência a quinolonas em *gyrA* (*gyrA_S83F*) ocorreu em todos os três isolados de Heidelberg e no único isolado de Albany. Todos os isolados com essa mutação foram obtidos de MPS em pontos com diferentes NU e impactos de AE. A ocorrência dessa mutação em *gyrA* já foi detectada em ambos os sorovares em estudos prévios sobre a ocorrência de Heidelberg e Albany em carnes e fezes de frango na Coreia do Sul e Brasil, respectivamente (Saidenberg *et al.*, 2023; Hong *et al.*, 2025).

Da mesma forma, uma mutação pontual foi identificada em *ramR* (*ramR_T18P*) de um isolado de *S. Infantis*. Esse gene é um regulador negativo da bomba de efluxo AcrAB, associada a perfil de múltipla resistência aos antimicrobianos (Abouzeed, Baucheron, & Cloeckert, 2008; Trampari *et al.*, 2023). Mutações que levam à perda de funcionalidade desse gene resultam na superexpressão da bomba de efluxo e consequente aumento da concentração mínima inibitória de diferentes classes antimicrobianos para *Salmonella*, como quinolonas/fluoroquinolonas, tetraciclina, betalactâmicos e macrolídeos (Abouzeed *et al.*, 2008; Trampari *et al.*, 2023). Posteriormente, será verificada, por testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, a influência que as mutações *gyrA_S83F* e *ramR_T18P* tiveram sobre a suscetibilidade destes a diferentes antimicrobianos.

Entre as características avaliadas no gênero *Salmonella*, genes de resistência normalmente estão mais associados a EGMs, sobretudo plasmídeos, e refletem processos

adaptativos relacionados ao ambiente. Em contraste, genes de virulência estão, na maioria das vezes, localizados no cromossoma e refletem a evolução dos sorovares quanto a seus hospedeiros, influenciando, inclusive, proximidades filogenéticas (Tanner & Kingsley, 2018; Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). Nossos estudos de filogenética foram baseados em SNPs de core genes, dessa forma, muitos genes acessórios, como genes plasmidiais e de prófagos, ou genes de virulência que variavam entre os isolados, não foram considerados na montagem da topologia da árvore. Essa análise permitiu organizar os isolados quanto a aspectos evolutivos dos genes que compartilhavam, e o produto obtido evidenciou concordância com vários outros esquemas classificatórios distanciando os isolados de diferentes subespécies, aproximando isolados de um mesmo sorovar e, entre deles, os STs. A árvore filogenética construída e sua associação com metadados que divergiam entre os isolados, possibilitou a visualização de sorovares (em alguns casos, isolados) que carregam mais genes de resistência (Infantis, Heidelberg, Typhimurium, Minnesota e Panama) e sorovares que possuem genes de virulência específicos (Typhimurium e pertencentes a subespécies não *enterica*).

Contudo, a integração dos dados com as demais análises realizadas neste documento sugere que, ainda que a proximidade de pontos de coleta a regiões produtoras de frango e bovinos esteja associada a uma maior probabilidade de recuperação de *Salmonella* do que a proximidade de pontos de coleta a áreas onde ocorrem plantações, as características dos sorovares não foram afetadas por nível de urbanização e atividade econômica, tendo sorovares patogênicos sido identificados em todos os contextos ambientais, assim como isolados resistentes a antimicrobianos foram recuperados de águas sob diferentes impactos diretos. Ainda assim, estudos complementares com ênfase na amostragem direta de resíduos provenientes de propriedades agropecuárias, adubos orgânicos, microbiota de animais silvestres, animais de criação e esgoto urbano nessas regiões, poderiam aprofundar o entendimento sobre as fontes e as rotas de disseminação dos sorovares mais virulentos ou isolados mais resistentes a antimicrobianos. Tais estudos poderiam contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e mitigação de riscos associados às infecções transmitidas por água e alimentos. Ao todo, cerca de 25% dos isolados caracterizados apresentaram algum gene de resistência, em 12% foram identificados genes adquiridos e 7% carregavam dois ou mais genes de resistência.

Diante do exposto, evidencia-se que a utilização de águas superficiais para fins recreacionais, produção animal e irrigação pode ser uma rota de disseminação de

Salmonella sp., bactéria patogênica de transmissão hídrica e alimentar. A detecção de genes de resistência a antimicrobianos nestas cepas também merece atenção, pois evidencia *Salmonella* como microrganismo envolvido na rota de disseminação ambiental destes marcadores, além de potencialmente influenciar no tratamento de infecções causadas por estes microrganismos quando o uso de antimicrobianos for necessário.

Nesse contexto, a implementação de medidas que minimizem a contaminação das águas por dejetos provenientes de animais de criação reveste-se de grande importância, uma vez que contribui para a preservação da qualidade hídrica, trazendo benefícios significativos para a saúde pública e o bem-estar coletivo. Recomenda-se, adicionalmente, a integração de estratégias educativas focadas na conscientização sobre a relevância de manter a água em boas condições tanto nos ambientes de produção animal quanto vegetal, com o objetivo de reduzir os riscos de transmissão direta e indireta de patógenos. De forma complementar, é essencial que toda a comunidade tenha acesso a programas educativos sobre as boas práticas de manipulação de alimentos, além de compreender a importância do tratamento térmico de alimentos de origem animal e vegetal, assim como a cloração de alimentos não cozidos, visando a segurança dos alimentos e a prevenção de doenças. Por fim, ressalta-se a importância de abordagens de pesquisa fundamentadas no conceito de “Uma Só Saúde”, que reconheçam a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental, como elemento essencial para o controle eficaz de doenças de origem hídrica e alimentar.

7 CONCLUSÃO

- Este estudo demonstrou, de forma robusta, a ocorrência de *Salmonella* sp. em águas superficiais de regiões agropecuárias do Estado do Rio de Janeiro. Os dados indicam que a maioria dos pontos de coleta tinha a presença do microrganismo, com maior probabilidade de ocorrência em pontos próximos à produção de frango e gado em relação a pontos próximos de plantações ou sem impacto aparente. Não observamos impacto do nível de urbanização na ocorrência ou não de *Salmonella* em suas águas.
- A alta diversidade de sorovares observada sugere uma influência de múltiplas fontes ecológicas na área amostral, principalmente em áreas rurais. Ainda, sorovares patogênicos ao hospedeiro humano (como Panama, Newport, Typhimurium, Infantis, Braenderup, Corvallis, Sandiego, Santiago ou Belem, Jos, Saphra, e Carrau), os mais prevalentes na coleção, ocorreram em áreas sob o efeito de todos os níveis de urbanização e atividades econômicas contempladas no estudo.
- Sorovares Typhimurium (e sua variante monofásica), Enteritidis e Santiago ou Belem, portavam genes plasmidiais associados a mecanismos invasivos, sugerindo a possibilidade de perfis iNTS.
- Plasmídeos de de mais de 17 grupos Inc foram identificados na coleção. Alguns destes grupos Inc estavam associados a genes de resistência (IncCol440I com *qnrB*; IncA/C2 com *sul* e *tet(A)*; IncColRNAI com *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *sul2* e *tet(A)*, IncX com *bla_{TEM-135}* e *tet(A)*, IncF com *floR* e *tet(A)* e IncR com *bla_{TEM-1}*. Em geral, estes plasmídeos e genes foram associados a sorovares específicos. Cerca de 25% dos isolados caracterizados carregavam genes de resistência a algum antimicrobiano e 12% portavam genes adquiridos.
- Os resultados deste estudo demonstram o valor do monitoramento de corpos d'água em regiões agropecuárias, como ferramenta para a vigilância epidemiológica dos sorovares de *Salmonella*. Além disso, evidenciam a necessidade de atenção constante quanto à contaminação destas águas por material fecal, e tomada medidas para mantê-la em níveis mínimos aceitáveis, bem como de um uso responsável deste recurso pela população local e atores

econômicos que ali atuam, com o objetivo de minimizar os riscos à saúde humana, animal e ambiental, na perspectiva de “Uma Só Saúde”.

8 REFERÊNCIAS:

- Abouzeed, Y. M., Baucheron, S., & Cloeckaert, A. (2008). *ramR* Mutations Involved in Efflux-Mediated Multidrug Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2428–2434.
- ABPA (2024) Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2024.
- 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.
- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M. G., Hale, J. L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L. H., Brisse, S., & Group, the *S. enterica* M. study. (2012). Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLOS Pathogens*, 8(6), e1002776.
- Akinyemi, K. O., Fakorede, C. O., Linde, J., Methner, U., Wareth, G., Tomaso, H., & Neubauer, H. (2023). Whole genome sequencing of *Salmonella enterica* serovars isolated from humans, animals, and the environment in Lagos, Nigeria. *BMC Microbiology*, 23(1), 164.
- Alikhan, N.-F., Zhou, Z., Sergeant, M. J., & Achtman, M. (2018). A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLOS Genetics*, 14(4), e1007261.
- 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.
- Almeida, F., Seribelli, A. A., da Silva, P., Medeiros, M. I. C., dos Prazeres Rodrigues, D., Moreira, C. G., Allard, M. W., *et al.* (2017). Multilocus sequence typing of *Salmonella* Typhimurium reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 51, 41–44.
- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology, Antibiotics - Meeting the Challenges of 21st Century Health Care: Part I*, 133, 4–19.
- Anda, M., Ohtsubo, Y., Okubo, T., Sugawara, M., Nagata, Y., Tsuda, M., Minamisawa, K., *et al.* (2015). Bacterial clade with the ribosomal RNA operon on a small plasmid rather than the chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(46), 14343–14347.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. BabrahamBioinformatics. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Angelo, K. M., Chu, A., Anand, M., Nguyen, T., & Bottichio, L. (2015, fevereiro 20). Outbreak of *Salmonella* Newport Infections Linked to Cucumbers—United States, 2014. Acesso em <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6406a3.htm>
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., e Peixe, L. (2016) Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110–121.

- Anzai, T., Kuwamoto, Y., Hobo, S., Niwa, H., Katayama, Y., Ode, H., Abe, N., *et al.* (2005). The Importance of a 95-kb Virulence Plasmid in the Pathogenicity of *Salmonella* Abortusequi in Horses. *Journal of Equine Science*, 16(4), 111–116.
- 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.
- Ares-Arroyo, M., Rocha, E. P. C., & Gonzalez-Zorn, B. (2021). Evolution of ColE1-like plasmids across γ -Proteobacteria: From bacteriocin production to antimicrobial resistance. *PLoS genetics*, 17(11), e1009919.
- Arnold, B. J., Huang, I.-T., & Hanage, W. P. (2022). Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 20(4), 206–218.
- Aviv, G., Tsyba, K., Steck, N., Salmon-Divon, M., Cornelius, A., Rahav, G., Grassl, Guntram A., *et al.* (2014). A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environmental Microbiology*, 16(4), 977–994.
- Aworh, M. K., Nilsson, P., Egyir, B., Owusu, F. A., & Hendriksen, R. S. (2024). Rare serovars of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolated from humans, beef cattle and abattoir environments in Nigeria. *PLOS ONE*, 19(1), e0296971.
- Azimi, T., Zamirnaz, 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.
- Bakkeren, E., Gül, E., Huisman, J. S., Steiger, Y., Røcker, A., Hardt, W.-D., & Diard, M. (2022). Impact of horizontal gene transfer on emergence and stability of cooperative virulence in *Salmonella* Typhimurium. *Nature Communications*, 13(1), 1939.
- 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.
- Bañuelos-Vazquez, L. A., Torres Tejerizo, G., & Brom, S. (2017). Regulation of conjugative transfer of plasmids and integrative conjugative elements. *Plasmid*, SI: ISPB Plasmid 2016, 91, 82–89.
- 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.
- Bearson, B. L., Allen, H. K., Brunelle, B. W., Lee, I. S., Casjens, S. R., & Stanton, T. B. (2014). The agricultural antibiotic carbadox induces phage-mediated gene transfer in *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, 5.

Beheshti, M., Ardebili, A., Beheshti, F., Lari, A. R., Siyadatpanah, A., Pournajaf, A., Gautam, D., *et al.* (2020). Tetracycline resistance mediated by tet efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 62, e88.

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.

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.

Borges, K. A., Furian, T. Q., de Souza, S. N., Menezes, R., Salle, C. T. P., de Souza Moraes, H. L., Tondo, E. C., & do Nascimento, V. P. (2017). Phenotypic and Molecular Characterization of *Salmonella* Enteritidis SE86 Isolated from Poultry and Salmonellosis Outbreaks. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(12), 742–754.

Bortolaia, V., Hansen, K. H., Nielsen, C. A., Fritsche, T. R., & Guardabassi, L. (2014). High diversity of plasmids harbouring blaCMY-2 among clinical *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(6), 1492–1496.

Botelho, L. A. B., Kraychete, G. B., Rocha, P. B., da-Silva, A. P. de S., Picão, R. C., Moreira, B. M., & Bonelli, R. R. (2020). CTX-M- and pAmpC-Encoding Genes Are Associated with Similar Mobile Genetic Elements in *Escherichia coli* Isolated from Different Brands of Brazilian Chicken Meat. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 26(1), 14–20.

Boto, L. (2009). Horizontal gene transfer in evolution: Facts and challenges. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1683), 819–827.

Braga, P. R. C., dos Santos, C. A., Bertani, A. M. de J., Vieira, T., Amarante, A. F., Reis, A. D., Sacchi, C. T., *et al.* (2023). Detection and genomic characterization of a multidrug-resistant *Salmonella* Newport co-harboring blaCMY-2, qnrB19 and mcr-9 from the diarrheic faeces of a foal. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 35, 198–201.

BRASIL. (2011) Manual técnico de diagnóstico laboratorial da *Salmonella* spp. Acesso em: 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, A. C., Chen, J. C., Watkins, L. K. F., Campbell, D., Folster, J. P., Tate, H., Wasilenko, J., *et al.* (2018). CTX-M-65 Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Salmonella* enterica Serotype Infantis, United States1

- 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.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247.
- Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules*, 25(23), 5662.
- Byrne, L., Fisher, I., Peters, T., Mather, A., Thomson, N., Rosner, B., Bernard, H., *et al.* (2014). A multi-country outbreak of *Salmonella* Newport gastroenteritis in Europe associated with watermelon from Brazil, confirmed by whole genome sequencing: October 2011 to January 2012. *Eurosurveillance*, 19(31), 20866.
- Calarga, A. P., Gontijo, M. T. P., de Almeida, L. G. P., de Vasconcelos, A. T. R., Nascimento, L. C., de Moraes Barbosa, T. M. C., de Carvalho Perri, T. M., dos Santos, S. R., Tiba-Casas, M. R., Marques, E. G. L., Ferreira, C. M., & Brocchi, M. (2022). Antimicrobial resistance and genetic background of non-typhoidal *Salmonella* enterica strains isolated from human infections in São Paulo, Brazil (2000–2019). *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(3), 1249–1262.
- Callahan, M. T., Van Kessel, J. A., & Micallef, S. A. (2019). *Salmonella* enterica recovery from river waters of the Maryland Eastern Shore reveals high serotype diversity and some multidrug resistance. *Environmental Research*, 168, 7–13.
- Camargo, A. P., Roux, S., Schulz, F., Babinski, M., Xu, Y., Hu, B., Chain, P. S. G., *et al.* (2024). Identification of mobile genetic elements with geNomad. *Nature Biotechnology*, 42(8), 1303–1312.
- 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.
- Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–2238.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., *et al.* (2014). In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895–3903.
- Cardoso, M. (2019). Antimicrobial use, resistance and economic benefits and costs to livestock producers in Brazil. Paris: OECD.
- 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.
- Carrillo-Muñoz, A. J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A., & Quindós, G. (2006). Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter*, 130–139.
- Carroll, L. M., Wiedmann, M., den Bakker, H., Siler, J., Warchocki, S., Kent, D., Lyalina, S., *et al.* (2017). Whole-Genome Sequencing of Drug-Resistant *Salmonella* enterica Isolates from Dairy Cattle and Humans in New York and Washington States Reveals Source and Geographic Associations. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(12), e00140-17.

- CDC. (2019a) Snapshots of *Salmonella* Serotypes. Acesso 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. Acesso em: <https://www.cdc.gov/Salmonella/carrau-04-19/index.html>
- CDC. (2019c). A multistate outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Infections has been linked to raw chicken products. Acesso em https://archive.cdc.gov/www_cdc.gov/Salmonella/infantis-10-18/index.html.
- CDC. (2022) *Salmonella*. Acesso em: <https://www.cdc.gov/Salmonella/index.html>
- Ceballos, B. S. O., Soares, N. E., Moraes, M. R., Catão, R. M. R., & König, A. (2003). Microbiological aspects of an urban river used for unrestricted irrigation in the semi-arid region of north-east Brazil. *Water Science and Technology*, 47(3), 51–57.
- 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.
- Chen, Z., Toro, M., Moreno-Switt, A. I., Adell, A. D., Delgado-Suárez, E. J., Bonelli, R. R., Oliveira, C. J. B., *et al.* (2024). Unveiling the genomic landscape of *Salmonella* enterica serotypes Typhimurium, Newport, and Infantis in Latin American surface waters: A comparative analysis. *Microbiology Spectrum*, -(), e00047-24.
- Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., & Jin, Q. (2016). VFDB 2016: Hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D694–D697.
- Chevez, Z. R., Dunn, L. L., da Silva, A. L. B. R., & Rodrigues, C. (2024). Prevalence of STEC virulence markers and *Salmonella* as a function of abiotic factors in agricultural water in the southeastern United States. *Frontiers in Microbiology*, 15.
- Chimalizeni, Y., Kawaza, K., & Molyneux, E. (2010). The Epidemiology and Management of Non Typhoidal *Salmonella* Infections. Em A. Finn, N. Curtis, & A. J. Pollard (Orgs.), *Hot Topics in Infection and Immunity in Children VI* (p. 33–46).
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40.
- Cohen, E., Kriger, O., Amit, S., Davidovich, M., Rahav, G., & Gal-Mor, O. (2022). The emergence of a multidrug resistant *Salmonella* Muenchen in Israel is associated with horizontal acquisition of the epidemic pESI plasmid. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(11), 1499.e7-1499.e14.

Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., & Goodridge, L. D. (2017). Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family – A Review. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Collier-Hyams, L. S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A. D., Bao, Z. Q., Chen, H., Madara, J. L., Orth, K., & 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.

Colombo, M. M., Leori, G., Rubino, S., Barbato, A., & Cappuccinelli, P. (1992). Phenotypic features and molecular characterization of plasmids in *Salmonella* abortusovis. *Journal of General Microbiology*, 138(4), 725–731.

Coluzzi, C., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F., & Rocha, E. P. C. (2022). Evolution of Plasmid Mobility: Origin and Fate of Conjugative and Nonconjugative Plasmids. *Molecular Biology and Evolution*, 39(6), msac115.

Cook, M., Delbecq, S. P., Schweppe, T. P., Guttman, M., Klevit, R. E., & Brzovic, P. S. (2019). The ubiquitin ligase SspH1 from *Salmonella* uses a modular and dynamic E3 domain to catalyze substrate ubiquitylation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(3), 783–793.

Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L., & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: Where do we stand? *Journal of Medical Microbiology*, 66(5), 551–559.

Cossi, M. V. C., Burin, R. C. K., Lopes, D. A., Dias, M. R., de CASTILHO, N. P. A., de ARRUDA PINTO, P. S., & Nero, L. A. (2013). Antimicrobial Resistance and Virulence Profiles of *Salmonella* Isolated from Butcher Shops in Minas Gerais, Brazil. *Journal of Food Protection*, 76(9), 1633–1637.

Crits-Christoph, A., Hallowell, H. A., Koutouvalis, K., & Suez, J. (2022). Good microbes, bad genes? The dissemination of antimicrobial resistance in the human microbiome. *Gut Microbes*, 14(1), 2055944.

Crosa, J. H., Brenner, D. J., & Ewing, W. H. (1973) Molecular Relationships Among the Salmonellae. *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., & 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., & 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.

Crits-Christoph, A., Hallowell, H. A., Koutouvalis, K., & Suez, J. (2022). Good microbes, bad genes? The dissemination of antimicrobial resistance in the human microbiome. *Gut Microbes*, 14(1), 2055944.

Cunha-Neto, A., Carvalho, L. A., Castro, V. S., Barcelos, F. G., Carvalho, R. C. T., Rodrigues, D. dos P., Conte- Junior, C. A., & 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 Brummell, J. H. (2015) *Salmonella* Disrupts Host Endocytic Trafficking by SopD2-Mediated Inhibition of Rab7. *Cell Reports*, 12(9), 1508–1518.
- Dhanani, A. S., Block, G., Dewar, K., Forgetta, V., Topp, E., Beiko, R. G., & Diarra, M. S. (2015). Genomic Comparison of Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky Isolates from Broiler Chickens. *PloS One*, 10(6), e0128773.
- Darwin, C. (1859) *On the origin of species by means of natural selection*. London: Murray.
- 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.
- 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.
- Diard, M., Bakkeren, E., Cornuault, J. K., Moor, K., Hausmann, A., Sellin, M. E., Loverdo, C., *et al.* (2017). Inflammation boosts bacteriophage transfer between *Salmonella* spp. *Science*, 355(6330), 1211–1215.
- Diard, M., Sellin, M. E., Dolowschiak, T., Arnoldini, M., Ackermann, M., & Hardt, W.-D. (2014). Antibiotic Treatment Selects for Cooperative Virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Current Biology*, 24(17), 2000–2005.
- Diard, M., Garcia, V., Maier, L., Remus-Emsermann, M. N. P., Regoes, R. R., Ackermann, M., & Hardt, W.-D. (2013). Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature*, 494(7437), 353–356.
- Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, 174(18), 2967–2983.
- 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 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.
- dos Santos, A. M. P., Panzenhagen, P., Ferrari, R. G., Rodrigues, G. L., & Conte-Junior, C. A. (2021). The pESI megaplasmid conferring virulence and multiple-drug resistance is detected in a *Salmonella* Infantis genome from Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 95, 104934.

dos Santos, A. M. P., Ferrari, R. G., Panzenhagen, P., Rodrigues, G. L., & 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, A. M. P., Panzenhagen, P., Ferrari, R. G., & Conte-Junior, C. A. (2022). Large-scale genomic analysis reveals the pESI-like megaplasmid presence in *Salmonella* Agona, Muenchen, Schwarzengrund, and Senftenberg. *Food Microbiology*, 108, 104112.

dos Santos, A. M. P., Panzenhagen, P., Ferrari, R. G., Portes, A. B., de Jesus, A. C., Ochioni, A., Rodrigues, D., *et al.* (2024). Genomic characterization of a clonal emergent *Salmonella* Minnesota lineage in Brazil reveals the presence of a novel megaplasmid of resistance and virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(11), e01579-24.

Eberth, C. J. (1880). Die Organismen in den Organen bei Typhus abdominalis. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 81(1), 58–74.

Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). *Salmonella*, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods*, 10(5), 907.

EMBRAPA. (2021) Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudo. Disponível em: <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.

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048.

Fang, G.-Y., Liu, X.-Q., Jiang, Y.-J., Mu, X.-J., & Huang, B.-W. (2024). Horizontal gene transfer in activated sludge enhances microbial antimicrobial resistance and virulence. *Science of The Total Environment*, 912, 168908.

Farhat, M., Khayi, S., Berrada, J., Mouahid, M., Ameur, N., El-Adawy, H., & Fellahi, S. (2024). *Salmonella* enterica Serovar Gallinarum Biovars Pullorum and Gallinarum in Poultry: Review of Pathogenesis, Antibiotic Resistance, Diagnosis and Control in the Genomic Era. *Antibiotics*, 13(1), 23.

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.

Feasey, N. A., Cain, A. K., Msefula, C. L., Pickard, D., Alaerts, M., Aslett, M....Kingsley, R. A. (2014). Drug Resistance in *Salmonella* enterica ser. Typhimurium Bloodstream Infection, Malawi. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1957-1959.

Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D. H., Prasad, A. B., Slotta, D. J., Tolstoy, I., Tyson, G. H., *et al.* (2019). Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial

Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11), e00483-19.

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.

Ferreira, J. C., Penha Filho, R. A. C., Andrade, L. N., Berchieri Junior, A., & Darini, A. L. C. (2017). Diversity of plasmids harboring blaCMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(4), 361–364.

Foley, S. L., Nayak, R., Hanning, I. B., Johnson, T. J., Han, J., & Ricke, S. C. (2011). Population Dynamics of *Salmonella* enterica Serotypes in Commercial Egg and Poultry Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4273–4279.

Food Safety Brasil. (2019) Perfil Epidemiológico das Doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA). Portal e-food | Tudo sobre Segurança de Alimentos. Acesso em: <https://portalefood.com.br/haccp/perfil-epidemiologico-das-doencas-transmitidas-por-alimentos-DTHA/>

Fookes, M., Schroeder, G. N., Langridge, G. C., Blondel, C. J., Mammina, C., Connor, T. R., Seth-Smith, H., Vernikos, G. S., Robinson, K. S., Sanders, M., Petty, N. K., Kingsley, R. A., Bäuml, 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.

Fyfe, C., Grossman, T. H., Kerstein, K., & Sutcliffe, J. (2016). Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), a025395.

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.

Gan, E., Baird, F. J., Coloe, P. J., & Smooker, P. M. (2011). Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* enterica serovar Sofia, an avirulent species in Australian poultry. *Microbiology*, 157(4), 1056–1065.

García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., & Carattoli, A. (2009). Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 274–281.

Garcillán-Barcia, M. P., Redondo-Salvo, S., & de la Cruz, F. (2023). Plasmid classifications. *Plasmid*, 126, 102684.

Gordon, M. A., Graham, S. M., Walsh, A. L., Wilson, L., Phiri, A., Molyneux, E., Zijlstra, E. E., *et al.* (2008). Epidemics of Invasive *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis and *S. enterica* Serovar Typhimurium Infection Associated with Multidrug Resistance among Adults and Children in Malawi. *Clinical Infectious Diseases*, 46(7), 963–969.

Greene, S. K., Daly, E. R., Talbot, E. A., Demma, L. J., Holzbauer, S., Patel, N. J., Hill, T. A., *et al.* (2008). Recurrent multistate outbreak of *Salmonella* Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005. *Epidemiology & Infection*, 136(2), 157–165.

Grimont, P., & 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., & Ochman, H. (1996) Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps. *Cell*, 87(5), 791–794.

Grossman, T. H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), a025387.

Gu, G., Strawn, L. K., Zheng, J., Reed, E. A., & Rideout, S. L. (2019). Diversity and Dynamics of *Salmonella* enterica in Water Sources, Poultry Litters, and Field Soils Amended With Poultry Litter in a Major Agricultural Area of Virginia. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Guardatti, R. G. M., Kraychete, G. B., & Picão, R. C. (2024). Analysis of distinct blaKPC-encoding plasmids in an Enterobacter kobei strain recovered from recreational coastal water. *Science of The Total Environment*, 915, 169945.

Guimarães, D. O., Momesso, L. da S., & Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33, 667–679.

Guljamow, A., Jenke-Kodama, H., Saumweber, H., Quillardet, P., Frangeul, L., Castets, A. M., Bouchier, C., *et al.* (2007). Horizontal gene transfer of two cytoskeletal elements from a eukaryote to a cyanobacterium. *Current Biology*, 17(17), R757–R759.

Gutiérrez, S., Fischer, J., Ganesan, R., Hos, N. J., Cildir, G., Wolke, M., Pessia, A., Frommolt, P., Desiderio, V., Velagapudi, V., & Robinson, N. (2021) *Salmonella* Typhimurium impairs glycolysis-mediated acidification of phagosomes to evade macrophage defense. *PLOS Pathogens*, 17(9), e1009943.

Han, J., Lynne, A. M., David, D. E., Tang, H., Xu, J., Nayak, R., Kaldhone, P., *et al.* (2012). DNA Sequence Analysis of Plasmids from Multidrug Resistant *Salmonella* enterica Serotype Heidelberg Isolates. *PLOS ONE*, 7(12), e51160.

Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008) *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53–66.

He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., & Alvarez, P. J. J. (2020). Antibiotic resistance genes from livestock waste: Occurrence, dissemination, and treatment. *Npj Clean Water*, 3(1), 1–11.

- Helinski, D. R. (2022). A Brief History of Plasmids. *EcoSal Plus*, 10(1), eESP-0028-2021.
- 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.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522.
- 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.
- Hong, H., Kang, M., Haymowicz, A., Le, H. N. M., Kim, E., Yang, S. M., Ha, S.-D., *et al.* (2025). Genetic characterization and in silico serotyping of 62 *Salmonella enterica* isolated from Korean poultry operations. *BMC Genomics*, 26, 166.
- Hopkins, K. L., Wootton, L., Day, M. R., & Threlfall, E. J. (2007). Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS1 found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1071–1075.
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., e Dinh, A. (2021) Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: Potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance*, 7, 167–176.
- 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.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology, Antimicrobials*, 51, 72–80.
- IBGE. (2023). Panorama do censo 2022. Censo2022. Disponível em: <https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/>
- 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., & 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., & Hentia, 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., & Aarestrup, 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.
- Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., *et al.* (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology*, 61(12), 1049–1070.
- Johnson, T. J., Bielak, E. M., Fortini, D., Hansen, L. H., Hasman, H., Debroy, C., Nolan, L. K., *et al.* (2012). Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid*, 68(1), 43–50.
- Johnson, T. J., Thorsness, J. L., Anderson, C. P., Lynne, A. M., Foley, S. L., Han, J., Fricke, W. F., *et al.* (2010). Horizontal Gene Transfer of a ColV Plasmid Has Resulted in a Dominant Avian Clonal Type of *Salmonella* enterica Serovar Kentucky. *PLOS ONE*, 5(12), e15524.
- Jolley, K. A., & Maiden, M. C. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 595.
- Kalyanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. Nature Publishing Group.
- Kich, J. D., Coldebella, A., Morés, N., Nogueira, M. G., Cardoso, M., Fratamico, P. M., Call, J. E., Fedorka-Cray, P., & Luchansky, J. B. (2011). Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 307–313.
- Kipper, D., Carroll, L. M., Mascitti, A. K., Streck, A. F., Fonseca, A. S. K., Ikuta, N., & Lunge, V. R. (2020). Genomic Characterization of *Salmonella* Minnesota Clonal Lineages Associated with Poultry Production in Brazil. *Animals*, 10(11), 2043. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Koczerka, M., Douarre, P.-E., Kempf, F., Holbert, S., Mistou, M.-Y., Grépinet, O., & Virlogeux-Payant, I. (2021). The Invasin and Complement-Resistance Protein Rck of *Salmonella* is More Widely Distributed than Previously Expected. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e01457-21.
- Kondo, K., Kawano, M., & Sugai, M. (2021). Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes within the Prophage-Associated Regions in Nosocomial Pathogens. *mSphere*, 6(4), 10.1128/msphere.00452-21.

- 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.
- Koerich, P. K. V., Fonseca, B. B., Balestrin, E., Tagliari, V., Hoepers, P. G., Ueira-Vieira, C., Oldoni, I., Rauber, R. H., Ruschel, L., & Nascimento, V. P. (2018). *Salmonella* Gallinarum field isolates and its relationship to vaccine strain SG9R. *British Poultry Science*, 59(2), 154–159.
- Koskiniemi, S., Pr nting, M., Gullberg, E., N svall, J., & Andersson, D. I. (2011). Activation of cryptic aminoglycoside resistance in *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 80(6), 1464–1478.
- Kova   , A., Huljev,  ., & Su   , E. (2017). Ground water as the source of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 7(3), 181–184.
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a027029.
- Kropinski, A. M., Sulakvelidze, A., Konczy, P., & Poppe, C. (2007). *Salmonella* Phages and Prophages—Genomics and Practical Aspects. Em H. Schatten & A. Eisenstark (Orgs.), *Salmonella: Methods and Protocols* (p. 133–175).
- 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.
- Langenegger, C. H., & Langenegger, J. (1975). Surtos de salmonelose, por *Salmonella typhisuis*, em suínos no Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 10(8), 111–114.
- 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.
- Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., & Tandoi, V. (2012). *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*, *Salmonella* in Foods: Evolution, Strategies and Challenges, 45(2), 587–602.
- Li, X., Bleumink-Pluym, N. M. C., Luijkx, 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.
- Lin, J., Nishino, K., Roberts, M. C., Tolmasky, M., Aminov, R. I., & Zhang, L. (2015). Mechanisms of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6.

- Lobato-Márquez, D., Moreno-Córdoba, I., Figueroa, V., Díaz-Orejas, R., & García-del Portillo, F. (2015). Distinct type I and type II toxin-antitoxin modules control *Salmonella* lifestyle inside eukaryotic cells. *Scientific Reports*, 5(1), 9374.
- Longo, A., Losasso, C., Vitulano, F., Mastorilli, E., Turchetto, S., Petrin, S., Mantovani, C., *et al.* (2019). Insight into an outbreak of *Salmonella* Choleraesuis var. Kunzendorf in wild boars. *Veterinary Microbiology*, 238, 108423.
- Lou, L., Zhang, P., Piao, R., & Wang, Y. (2019). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9.
- 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., & 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.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Bender, K. S. (2016). *Microbiologia de Brock* (14^o). Artmed.
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., Hoekstra, R. M., & 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., & 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., Pecuária e Abastecimento. (2003) INSTRUÇÃO NORMATIVA No 78, DE 3 DE NOVEMBRO DE 2003. Acesso em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saudeanimal/programas-de-saude-animal/pnsa/imagens/INSTRUONORMATIVAN78DE3DENOVEMBRODE2003.pdf/view>
- MAPA. (2023). Proibições de antimicrobianos em insumos pecuários. Ministério da Agricultura e Pecuária. Acesso em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/legislacao/proibicoes-de-aditivos-na-alimentacao-animal>
- Markley, J. L., & Wencewicz, T. A. (2018). Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Martins, A. F. M., Pinheiro, T. L., Imperatori, A., Freire, S. M., Sá-Freire, L., Moreira, B. M., & Bonelli, R. R. (2019). *Plesiomonas shigelloides*: A notable carrier of acquired antimicrobial resistance in small aquaculture farms. *Aquaculture*, 500, 514–520.
- Marwaha, R., Arya, S. B., Jagga, D., Kaur, H., Tuli, A., & 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.

Maurin, M., & Raoult, D. (2001). Use of Aminoglycosides in Treatment of Infections Due to Intracellular Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), 2977–2986.

McCormic, Z. D., Patel, K., Higa, J., Bancroft, J., Donovan, D., Edwards, L., Cheng, J., *et al.* (2022). Bi-national outbreak of *Salmonella* Newport infections linked to onions: The United States experience. *Epidemiology & Infection*, 150, e199.

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.

McMillan, E. A., Gupta, S. K., Williams, L. E., Jové, T., Hiott, L. M., Woodley, T. A., Barrett, J. B., *et al.* (2019). Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella* enterica Associated With United States Food Animals. *Frontiers in Microbiology*, 10.

McMillan, E. A., Jackson, C. R., & Frye, J. G. (2020). Transferable Plasmids of *Salmonella* enterica Associated With Antibiotic Resistance Genes. *Frontiers in Microbiology*, 11.

Medeiros, M. A. N., Oliveira, D. C. N. de, Rodrigues, D. dos P., & Freitas, D. R. C. de. (2011). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, 30(6), 555–560.

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.

Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., & Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*, 34(13), i142–i150.

Miller, E. A., Elnekave, E., Flores-Figueroa, C., Johnson, A., Kearney, A., Munoz-Aguayo, J., Tagg, K. A., *et al.* (2020). Emergence of a Novel *Salmonella* enterica Serotype Reading Clonal Group Is Linked to Its Expansion in Commercial Turkey Production, Resulting in Unanticipated Human Illness in North America. *mSphere*, 5(2), 10.1128/msphere.00056-20.

Mirolid, S., Rabsch, W., Rohde, M., Stender, S., Tschäpe, H., Rüssmann, H., Igwe, E., *et al.* (1999). Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella* typhimurium strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), 9845–9850.

- Mkangara, M. (2023). Prevention and Control of Human *Salmonella* enterica Infections: An Implication in Food Safety. *International Journal of Food Science*, 2023(1), 8899596.
- Monte, D. F., Lincopan, N., Berman, H., Cerdeira, L., Keelara, S., Thakur, S., Fedorka-Cray, P. J., *et al.* (2019). Genomic Features of High-Priority *Salmonella* enterica Serovars Circulating in the Food Production Chain, Brazil, 2000–2016. *Scientific Reports*, 9(1), 11058. Nature Publishing Group.
- Monte, D. F. M., Nethery, M. A., Barrangou, R., Landgraf, M., & Fedorka-Cray, P. J. (2021). Whole-genome sequencing analysis and CRISPR genotyping of rare antibiotic-resistant *Salmonella* enterica serovars isolated from food and related sources. *Food Microbiology*, 93, 103601.
- Mottawea, W., Duceppe, M.-O., Dupras, A. A., Usongo, V., Jeukens, J., Freschi, L., Emond-Rheault, J.-G., *et al.* (2018). *Salmonella* enterica Prophage Sequence Profiles Reflect Genome Diversity and Can Be Used for High Discrimination Subtyping. *Frontiers in Microbiology*, 9. Frontiers.
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655.
- Nelson-Sathi, S., Sousa, F. L., Roettger, M., Lozada-Chávez, N., Thiergart, T., Janssen, A., Bryant, D., *et al.* (2015). Origins of major archaeal clades correspond to gene acquisitions from bacteria. *Nature*, 517(7532), 77–80.
- Nepal, R., Houtak, G., Wormald, P.-J., Psaltis, A. J., & Vreugde, S. (2022). Prophage: A crucial catalyst in infectious disease modulation. *The Lancet Microbe*, 3(3), e162–e163.
- Newson, J. P., Gaissmaier, M. S., McHugh, S. C., & Hardt, W.-D. (2022). Studying antibiotic persistence in vivo using the model organism *Salmonella* Typhimurium. *Current Opinion in Microbiology*, 70, 102224.
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.
- 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., & 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.
- Nogrado, K., Unno, T., Hur, H.-G., & Lee, J.-H. (2021). Tetracycline-resistant bacteria and ribosomal protection protein genes in soils from selected agricultural fields and livestock farms. *Applied Biological Chemistry*, 64(1), 42.
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews*, 51(4), 381–395.
- Ochman, H., & 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.

- Oelschlaeger, T. A., Zhang, D., Schubert, S., Carniel, E., Rabsch, W., Karch, H., & Hacker, J. (2003). The High-Pathogenicity Island Is Absent in Human Pathogens of *Salmonella enterica* Subspecies I but Present in Isolates of Subspecies III and VI. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 1107–1111.
- Okoro, C. K., Kingsley, R. A., Connor, T. R., Harris, S. R., Parry, C. M., Al-Mashhadani, M. N., Kariuki, S., *et al.* (2012). Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nature Genetics*, 44(11), 1215–1221.
- Okoro, C. K., Barquist, L., Connor, T. R., Harris, S. R., Clare, S., Stevens, M. P., Arends, M. J., *et al.* (2015). Signatures of Adaptation in Human Invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 Populations from Sub-Saharan Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), e0003611.
- Oladeinde, A., Abdo, Z., Press, M. O., Cook, K., Cox, N. A., Zwirzitz, B., Woyda, R., *et al.* (2021). Horizontal Gene Transfer Is the Main Driver of Antimicrobial Resistance in Broiler Chicks Infected with *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg. *mSystems*, 6(4), 10.1128/msystems.00729-21.
- Oludairo, O. O., Kwaga, J. K. P., Dzikwi, A. A., & Kabir, J. (2013). The Genus *Salmonella*, Isolation and Occurrence in Wildlife. *International Journal of Microbiology and Immunology Research*.
- Olsen, S. J., Bleasdale, S. C., Magnano, A. R., Landrigan, C., Holland, B. H., Tauxe, R. V., Mintz, E. D., & Luby, S. (2003) Outbreaks of typhoid fever in the United States, 1960-99. *Epidemiology and Infection*, 130(1), 13–21.
- O'Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. HM Government.
- Ovung, A., & Bhattacharyya, J. (2021). Sulfonamide drugs: Structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*, 13(2), 259–272.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., *et al.* (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693.
- Page, A. J., Taylor, B., Delaney, A. J., Soares, J., Seemann, T., Keane, J. A., & Harris, S. R. (2016). SNP-sites: Rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. *Microbial Genomics*, 2(4), e000056.
- Palmer, A. D., & Slauch, J. M. (2017) Mechanisms of *Salmonella* pathogenesis in animal models. Human and ecological risk assessment: HERA, 23(8), 1877–1892.
- Palmeira, A., Santos, L. R. dos, Borsoi, A., Rodrigues, L. B., Calasans, M., & Nascimento, V. P. do. (2016). SEROVARS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Salmonella* spp. ISOLATED FROM TURKEY AND BROILER CARCASSES IN SOUTHERN BRAZIL BETWEEN 2004 AND 2006. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 58(-).
- Panzenhagen, P. H. N., Paul, N. C., Conte, C. A., Costa, R. G., Rodrigues, D. P., & Shah, D. H. (2018). Genetically distinct lineages of *Salmonella* Typhimurium ST313 and ST19 are present in Brazil. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(2), 306–316.
- Parry, C. M., Hien, T. T., Dougan, G., White, N. J., & 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.
- Pearce, M. E., Alikhan, N.-F., Dallman, T. J., Zhou, Z., Grant, K., & Maiden, M. C. J. (2018). Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European *Salmonella* serovar Enteritidis outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 274, 1–11.
- Pearce, M. E., Langridge, G. C., Lauer, A. C., Grant, K., Maiden, M. C. J., & Chattaway, M. A. (2021). An evaluation of the species and subspecies of the genus *Salmonella* with whole genome sequence data: Proposal of type strains and epithets for novel *S. enterica* subspecies VII, VIII, IX, X and XI. *Genomics*, 113(5), 3152–3162.
- Penha Filho, R. A. C., Ferreira, J. C., Kanashiro, A. M. I., Darini, A. L. da C., & Berchieri Junior, A. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum isolated from ill poultry in Brazil. *Ciência Rural*, 46, 513–518.
- Penha Filho, R. A. C., Ferreira, J. C., Kanashiro, A. M. I., Berchieri Junior, A., & Darini, A. L. da C. (2019). Emergent multidrug-resistant nontyphoidal *Salmonella* serovars isolated from poultry in Brazil coharboring blaCTX-M-2 and qnrB or blaCMY-2 in large plasmids. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 95(1), 93–98.
- Perin, A. P., Martins, B. T. F., Barreiros, M. A. B., Yamatogi, R. S., Nero, L. A., & Dos Santos Bersot, L. (2019). Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* sp. isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 335–345.
- Pietsch, M., Irrgang, A., Roschanski, N., Brenner Michael, G., Hamprecht, A., Rieber, H., Käsbohrer, A., *et al.* (2018). Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. *BMC Genomics*, 19(1), 601.
- Pilla, G., & Tang, C. M. (2018). Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 484–495.
- Plumb, I. D. (2019). Outbreak of *Salmonella* Newport Infections with Decreased Susceptibility to Azithromycin Linked to Beef Obtained in the United States and Soft Cheese Obtained in Mexico—United States, 2018–2019. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68.
- 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.
- Prensky, H., Gomez-Simmonds, A., Uhlemann, A., & Lopatkin, A. J. (2021). Conjugation dynamics depend on both the plasmid acquisition cost and the fitness cost. *Molecular Systems Biology*, 17(3), e9913.
- 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., & Adeniran, J. O. (2001) Typhoid ileal perforation in Nigerian children: an analysis of 106 operative cases. *Pediatric Surgery International*, 17(8), 628–630.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171.
- Rabello, R. F., Bonelli, R. R., Penna, B. A., Albuquerque, J. P., Souza, R. M., & Cerqueira, A. M. F. (2020). Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. *Animals*, 10(4), 552.
- Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., & Farmer, J. J. (1989). Clonal nature of *Salmonella* typhi and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(2), 313–320.
- Rehman, M. A., Yin, X., Persaud-Lachhman, M. G., & Diarra, M. S. (2017). First Detection of a Fosfomycin Resistance Gene, *fosA7*, in *Salmonella* enterica Serovar Heidelberg Isolated from Broiler Chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8), 10.1128/aac.00410-17.
- Rehman, T., Yin, L., Latif, M. B., Chen, J., Wang, K., Geng, Y., Huang, X., Abaidullah, M., Guo, H., & Ouyang, P. (2019) Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103748.
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245(2), 195–203.
- Roberts, M. C., & Schwarz, S. (2016). Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 576–592.
- Rohilla, R., Bhatia, M., Gupta, P., Singh, A., Shankar, R., & Omar, B. J. (2019) *Salmonella* osteomyelitis: A rare extraintestinal manifestation of an endemic pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*, 11(02), 164–170.
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., *et al.* (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137.
- Rukambile, E., Sintchenko, V., Muscatello, G., Kock, R., & 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., & Adley, C. C. (2017) Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International*, 2017, 3782182.
- Rychlik, I., Gregorova, D., & Hradecka, H. (2006). Distribution and function of plasmids in *Salmonella* enterica. *Veterinary Microbiology*, 112(1), 1–10.
- Saidenberg, A. B. S., Franco, L. S., Reple, J. N., Hounmanou, Y. M. G., Casas, M. R. T., Cardoso, B., Esposito, F., *et al.* (2023). *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in Brazilian broilers:

Genomic characterization of third-generation cephalosporin and fluoroquinolone-resistant strains. *Environmental Microbiology Reports*, 15(2), 119–128.

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.

Schmieger, H., & Schicklmaier, P. (1999). Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella* enterica serovar typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 251–256.

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.

Seribelli, A. Ap., da Silva, P., da Cruz, M. F., de Almeida, F., Frazão, M. R., Medeiros, M. I. C., Rodrigues, D. dos P., *et al.* (2021). Insights about the epidemiology of *Salmonella* Typhimurium isolates from different sources in Brazil using comparative genomics. *Gut Pathogens*, 13(1), 27.

Seribelli, A. A., Ribeiro, T. R. M., da Silva, P., Martins, I. M., Vilela, F. P., Medeiros, M. I. C., Peronni, K. C., *et al.* (2021). *Salmonella* Typhimurium ST313 isolated in Brazil revealed to be more invasive and inflammatory in murine colon compared to ST19 strains. *Journal of Microbiology*, 59(9), 861–870.

Seemann, T. (2020). ABRicate: Mass screening of contigs for antimicrobial resistance or virulence genes [Software]. GitHub. (acesso em <https://github.com/tseemann/abricate>)

Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069.

Silva, C., Puente, J. L., & Calva, E. (2017). *Salmonella* virulence plasmid: Pathogenesis and ecology. *Pathogens and Disease*, 75(6), ftx070.

Singh, V. (2013). *Salmonella* Serovars and Their Host Specificity. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 1(3), 1.

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

Sköld, O. E., & Swedberg, G. (2017). Sulfonamides and Trimethoprim. Em D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, & D. Marchaim (Orgs.), *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*, Volume 1 (p. 345–358).

Snyder, L., Peters, J. E., Henkin, T. M., & Champness, W. (2014). *Molecular Genetics of Bacteria* (4th ed). ASM Press.

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.

Tanner, J. R., & Kingsley, R. A. (2018). Evolution of *Salmonella* within Hosts. *Trends in Microbiology*, 26(12), 986–998.

Topalcengiz, Z., Strawn, L. K., & Danyluk, M. D. (2017). Microbial quality of agricultural water in Central Florida. *PLOS ONE*, 12(4), e0174889.

Touchon, M., Sousa, J. A. M. de, & Rocha, E. P. C. (2017). Embracing the enemy: The diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 66.

Trabulsi. (2015) *Microbiologia Trabulsi - Alterthum*. (6th Edição.). Atheneu, 351-360.

Trampari, E., Prischi, F., Vargiu, A. V., Abi-Assaf, J., Bavro, V. N., & Webber, M. A. (2023). Functionally distinct mutations within AcrB underpin antibiotic resistance in different lifestyles. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 1(1), 1–13.

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.

Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., *et al.* (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health, Special Issue on Antimicrobial Resistance*, 14(12), 1750–1766.

Vaz, C. S. L., Streck, A. F., Michael, G. B., Marks, F. S., Rodrigues, D. dos P., Reis, E. M. F. dos, Cardoso, M. R. I., & Canal, C. W. (2010). Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella* enterica subspecies enterica serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil, 89(17), 1530-1536.

Viana, C., Sereno, M. J., Pegoraro, K., Yamatogi, R. S., Call, D. R., dos Santos Bersot, L., & Nero, L. A. (2019). Distribution, diversity, virulence genotypes and antibiotic resistance for *Salmonella* isolated from a Brazilian pork production chain. *International Journal of Food Microbiology*, 310, 108310.

- 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.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2518–2529.
- 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.
- Wachino, J., & Arakawa, Y. (2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resistance Updates*, 15(3), 133–148.
- 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.
- Waksman, G. (2019). From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: A mechanistic biology perspective. *EMBO reports*, 20(2), e47012.
- Wang, J., Wang, Y., Wang, Z.-Y., Wu, H., Mei, C.-Y., Shen, P.-C., Pan, Z.-M., *et al.* (2021). Chromosomally Located *fosA7* in *Salmonella* Isolates From China. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Wang, M., Qazi, I. H., Wang, L., e Zhou, G. (2020) *Salmonella* Virulence and Immune Escape. *Microorganisms*, 8(3), 1-25.
- Wang, L.-P., Zhou, S.-X., Wang, X., Lu, Q.-B., Shi, L.-S., Ren, X., Zhang, H.-Y., *et al.* (2021). Etiological, epidemiological, and clinical features of acute diarrhea in China. *Nature Communications*, 12(1), 2464. Nature Publishing Group.
- Wang, Z., Huang, C., Liu, Y., Chen, J., Yin, R., Jia, C., Kang, X., *et al.* (2024). Salmonellosis outbreak archive in China: Data collection and assembly. *Scientific Data*, 11(1), 244. Nature Publishing Group.
- Wang, Z., Li, Y., Wang, J., & Li, S. (2024). Tetracycline antibiotics in agricultural soil: Dissipation kinetics, transformation pathways, and structure-related toxicity. *Science of The Total Environment*, 949, 175126.
- 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. Acesso em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*, 13(6), e1005595.
- Wilkins, E. G. L., & Roberts, C. (1988). Extraintestinal salmonellosis. *Epidemiology and Infection*, 100(3), 361–368.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & 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., & 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., & 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.
- Yan, S., Zhang, W., Li, C., Liu, X., Zhu, L., Chen, L., & Yang, B. (2021). Serotyping, MLST, and Core Genome MLST Analysis of *Salmonella* enterica From Different Sources in China During 2004–2019. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Yang, X., Dong, N., Chan, E. W.-C., Zhang, R., & Chen, S. (2021). Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in Microbiology*, 29(1), 65–83.
- Yin, Z., Liu, J., Du, B., Ruan, H.-H., Huo, Y.-X., Du, Y., & Qiao, J. (2020). Whole-Genome-Based Survey for Polyphyletic Serovars of *Salmonella* enterica subsp. Enterica Provides New Insights into Public Health Surveillance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5226.
- Yoshida, C. E., Kruczkiewicz, P., Laing, C. R., Lingohr, E. J., Gannon, V. P. J., Nash, J. H. E., & Taboada, E. N. (2016). The *Salmonella* In Silico Typing Resource (SISTR): An Open Web-Accessible Tool for Rapidly Typing and Subtyping Draft *Salmonella* Genome Assemblies. *PLOS ONE*, 11(1), e0147101.
- Yuan, Y., Wang, D., Cai, H., Li, D., Xu, X., Guo, Q., He, T., *et al.* (2022). High-level ertapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is due to RamA downregulation of ompK35 through micF. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 60(4), 106653.
- Zainab, S. M., Junaid, M., Xu, N., & Malik, R. N. (2020). Antibiotics and antibiotic resistant genes (ARGs) in groundwater: A global review on dissemination, sources, interactions, environmental and human health risks. *Water Research*, 187, 116455.
- Zhang, S., den Bakker, H. C., Li, S., Chen, J., Dinsmore, B. A., Lane, C., Lauer, A. C., *et al.* (2019). SeqSero2: Rapid and Improved *Salmonella* Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(23), e01746-19.

Zhang, X.-Z., Lei, C.-W., Zeng, J.-X., Chen, Y.-P., Kang, Z.-Z., Wang, Y.-L., Ye, X.-L., *et al.* (2018). An IncX1 plasmid isolated from *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Pullorum carrying blaTEM-1B, sul2, arsenic resistant operons. *Plasmid*, 100, 14–21.

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 ANEXOS

Tabela Suplementar 1 – Ocorrência de sorovares nas bacias hidrográficas do Médio Paraíba do Sul (MPS) e Piabanha (Pb) e sua distribuição conforme a subespécie a que pertencem

Sorovar	Número de Isolados	MPS					Pb				
		<i>S. enterica subs.</i>					<i>S. enterica subsp.</i>				
		<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	Subspecie VII	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	Subspecie VII
Panama	44	18	-	-	-	-	26	-	-	-	-
Newport	43	15	-	-	-	-	28	-	-	-	-
Typhimurium	27	13	-	-	-	-	14	-	-	-	-
Saphra	23	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carrau	20	11	-	-	-	-	9	-	-	-	-
Infantis	15	6	-	-	-	-	9	-	-	-	-
IV 43:z4,z24:-	15	-	-	-	9	-	-	-	-	6	-
Braenderup	13	5	-	-	-	-	8	-	-	-	-
Santiago or Belem	9	6	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Sandiego	9	7	-	-	-	-	2	-	-	-	-
Jos	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oranienburg	7	4	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Oslo	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Corvallis	5	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-
II 42:r:-	5	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
Minnesota	4	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-
Javiana	4	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-
Mbandaka	3	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Hadar	3	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-
IV 16:z4,z32:-	3	0	-	-	1	-	-	-	-	2	-

Sorovar	Número de Isolados	MPS					Pb				
		<i>S. enterica</i> subs.					<i>S. enterica</i> subsp.				
		<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	Subspecie VII	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	Subspecie VII
IIIb 50:r:z	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-
Bovismorbificans	3	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Schwarzengrund	3	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Heidelberg	3	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Saintpaul	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
I 4,[5],12:i:-	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
IV 21:z4,z23:-	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
IIIb 38:(k):z35	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Abaetetuba	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enteritidis	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Molade	2	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Agona	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rubislaw	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
VII 38:g,z51:-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Miami	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
IIIb 61:l,v:z	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Soerenga	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IIIb 35:r:z	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kentucky	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
IV 48:g,z51:-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Grumpensis	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Isangi	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I 4:b:-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV 16:z4,z24:-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Albany	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Emek	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-

Sorovar	Número de Isolados	MPS					Pb				
		<i>S. enterica subs.</i>					<i>S. enterica subsp.</i>				
		<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	Subspecie VII	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	Subspecie VII
Total	308	143	5	3	13	0	131	0	3	9	1

Tabela Suplementar 2 – Grupos Inc nos diferentes sorovares de *Salmonella*

[illegible]

Oslo	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mbandaka	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rubislaw	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I 4,[5],12:i:-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Miami	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soerenga IV	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21:z4,z23:- IV	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48:g,z51:-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isangi	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	113	34	22	21	21	10	9	7	6	5	3	2	2	2	2	2	1	1	1	1