

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Relatório final do Estágio Curricular em Prática Veterinária, realizado junto ao
Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias
de Importância Clínica - FCFRP/USP**

**Assunto de interesse: Caracterização genômica de estirpes de *Salmonella*
enterica sorovar Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum**

Isabella Cardeal Campos

JABOTICABAL – SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Relatório final do Estágio Curricular em Prática Veterinária, realizado junto ao
Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias
de Importância Clínica - FCFRP/USP**

**Assunto de interesse: Caracterização genômica de estirpes de *Salmonella*
enterica sorovar Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum**

Isabella Cardeal Campos

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Relatório do Estágio Curricular em Prática Veterinária apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Unesp, para graduação em Medicina Veterinária.

JABOTICABAL – SP

2º SEMESTRE DE 2022

C198r	<p>Campos, Isabella Cardeal</p> <p>Relatório final do estágio curricular em prática veterinária, realizado junto ao laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica - FCFRP/USP : assunto de interesse: caracterização genômica de estirpes de Salmonella enterica sorovar Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum / Isabella Cardeal Campos. -- Jaboticabal, 2023</p> <p>62 p. : il., tabs., fotos</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Angelo Berchieri Junior</p> <p>1. Salmonella. 2. Bioinformática. 3. Fatores de virulência. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL



CERTIFICADO

Certifico que o Relatório de Estágio Curricular em Prática Veterinária foi apresentado à Banca Examinadora e aprovado, conforme especificações abaixo

TÍTULO: Relatório final do Estágio Curricular em Prática Veterinária, realizado junto ao Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica - FCFRP/USP – Assunto de Interesse: Caracterização genômica de estirpes de *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum

ACADÊMICA: Isabella Cardeal Campos

CURSO: Medicina Veterinária

ORIENTADOR: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

SUPERVISORA: Profª. Dra. Juliana Pfrimer Falcão

LOCAL: Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP

(PERÍODO) Semestre: 2º Ano: 2022


Jaboticabal, 18 de janeiro de 2023

BANCA EXAMINADORA

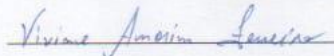
Presidente Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Membro Ma. Camila de Fátima Nascimento

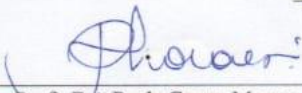
Membro M.V. Viviane Amorim Ferreira



Camila de Fátima Nascimento



Viviane Amorim Ferreira



Profª. Drª. Paola Castro Moraes
- Coordenadora da CEGRA -

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que com sua infinita bondade e sabedoria, me guiou, conferiu saúde e perseverança durante minha trajetória acadêmica.

Aos meus pais, Claudia e Demerval, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Agradeço por todo amor, incentivo e por sempre estarem presentes.

Aos meus avós, Dioni, Maria e Galdino, que sempre me acompanharam e torceram por mim. Agradeço por todo carinho.

Aos meus amigos, por todo apoio e companheirismo durante esses 5 anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, pela oportunidade, pelos ensinamentos e por me aceitar como orientada.

A toda equipe do Laboratório de Ornitopatologia – Unesp/FCAV, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas. Obrigada por auxiliarem no meu crescimento profissional e pessoal.

À minha supervisora de estágio, Prof^a. Dr^a. Juliana Pfrimer Falcão, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela atenção. Agradeço a toda equipe do laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica (FCFRP / USP) pelos ensinamentos.

À banca avaliadora, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, Ma. Camila de Fátima Nascimento e M.V. Viviane Amorim Ferreira. Obrigada pela disponibilidade e orientação nesta etapa de finalização de um ciclo tão importante em minha vida.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, que tornou possível a minha formação como Médica Veterinária, minha gratidão aos docentes por todo aprendizado durante a minha graduação. Agradeço também a todos os funcionários.

SUMÁRIO

I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR.....	6
1. INTRODUÇÃO	6
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL	6
2.1. Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica	6
3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DO ESTÁGIO	6
3.1. Métodos de Tipagem Molecular Bacteriana.....	6
3.2. Sobrevivência aos estresses ácido e oxidativo.....	13
3.3. Células Caco-2	14
3.4. Ensaio Biofilme	18
4. DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	19
5. CONCLUSÃO.....	20
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	20
II. ASSUNTO DE INTERESSE	29
Caracterização genômica de estirpes de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum	29
1. INTRODUÇÃO	29
2. REVISÃO DE LITERATURA	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Genomas bacterianos.....	31
3.2. Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos	36
3.3. Pesquisa de elementos genéticos móveis	36
3.4. Pesquisa de determinantes genéticos de virulência	36
3.5. Análise filogenética	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Genes de resistência a antimicrobianos e de estresse.....	37
4.2. Elementos genéticos móveis	39
4.3. Determinantes genéticos de virulência	41
4.4. Análise filogenética	46
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	52

I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

1. INTRODUÇÃO

O estágio curricular obrigatório ocorreu no período de 01 de setembro a 23 de dezembro de 2022, totalizando 600 horas, como parte dos requisitos para conclusão do curso de Medicina Veterinária da FCAV/UNESP. O trabalho foi desenvolvido sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, no laboratório de pesquisa de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Juliana Pfrimer Falcão.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL

2.1. Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica

O laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Juliana Pfrimer Falcão, está localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Durante o período do estágio, a equipe era composta por uma aluna de iniciação científica, uma aluna mestrado, um aluno de doutorado, uma pós-doutoranda e uma responsável técnica. A linha de pesquisa do grupo é voltada para estudos sobre a epidemiologia molecular, virulência, genômica e transcriptômica de bactérias enteropatogênicas Gram-negativas, tais como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp.

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DO ESTÁGIO

3.1. Métodos de Tipagem Molecular Bacteriana

3.1.1. *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE)

O PFGE é um método de tipagem molecular (NEOH et al., 2019) que, a partir de uma suspensão de células do microrganismo alvo, são confeccionados blocos (*plugs*) de agarose, os quais são digeridos por detergentes enzimáticos a fim de liberar o DNA bacteriano (HERSCHLEB; ANANIEV; SCHWARTZ, 2007), no qual irá atuar uma enzima de restrição, levando à formação de diversos fragmentos de material genético, os quais são separados em uma câmara de eletroforese de campo pulsado (FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2009). Após a análise do gel, obtém-se uma impressão

digital de DNA (DNA *fingerprint*), a qual configura a sequência do DNA do genoma bacteriano (KANG; MENG; PAN, 2021), tornando, possível a realização de estudos filogenéticos e investigações epidemiológicas como monitoramentos de segurança alimentar (MAZENGLIA et al., 2021; NEOH et al., 2019; POSSEBON et al., 2020).

No laboratório, a técnica de PFGE foi realizada para tipagem de *Salmonella* Infantis isolada de alimentos de acordo com o protocolo do PulseNet (RIBOT et al., 2006). Inicialmente, as estirpes foram cultivadas em 3 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), incubados a 37°C por 18-24 horas. Em seguida, os cultivos foram semeados em placas de ágar triptona de soja (TSA), também a 37°C por 18 horas. A seguir, com o auxílio de um suabe, algumas colônias foram selecionadas e suspensas em um tampão de suspensão de células (100mM Tris, 100mM EDTA, pH 8,0), seguido do ajuste de concentração em uma densidade óptica entre 0,8 e 1 com um comprimento de onda de 610 nm.

Foram transferidos 200 µL da suspensão ajustada para tubos estéreis de 2 mL, que eram armazenados em gelo a fim de interromper o crescimento bacteriano até completar o ajuste de todas as amostras. Depois, os tubos eram incubados em banho-seco a 60°C e adicionados 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 200 µL de agarose fundida 1% do tipo *Seakem® Gold* (Lonza). Desta mistura, aproximadamente 80 µL foram distribuídos em moldes dos *plugs*, os quais foram confeccionados e armazenados a 4°C por aproximadamente 5 minutos até atingirem sua solidificação.

A seguir, os *plugs* foram transferidos para tubos falcon de 15 mL com 25 µL de proteinase K (20mg/mL) mais 5 mL de tampão de lise celular (50mM Tris, 50mM EDTA, pH 8,0 e 1% de Sarcosil) e incubados em banho-maria a 54°C por 2 horas e, em seguida, submetidos a agitação orbital por 30 minutos. Posteriormente, o tampão foi retirado e foram realizadas duas lavagens com água MilliQ e quatro lavagens com o tampão de lavagem TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0); ambos pré-aquecidos a 54°C por 30 minutos e sob leve agitação. Após as lavagens, os *plugs* foram armazenados em tubos contendo 1 mL do tampão TE a 4°C até o momento de seu uso.

Em seguida, para realização da digestão enzimática, cada *plug* foi colocado em um microtubo de 2 mL. Foram empregadas três lavagens com 1 mL do tampão TE pré-aquecido a 54°C por 15 minutos sob leve agitação. O tampão TE foi removido e o

plug foi submetido a uma lavagem com 300 µL do tampão comercial da enzima Anza XbaI (*Thermo Fisher Scientific*[®]) a temperatura ambiente durante 30 minutos sob leve agitação. Finalmente, o DNA genômico contido nos *plugs* foi digerido com um tampão contendo 40 unidades da enzima Anza XbaI (*Thermo Fisher Scientific*[®]) em banho-maria a 37°C por 2 horas.

Para realização da eletroforese em campo pulsado, foram preparados 2,5 L de tampão de corrida TBE 0.5X (45mM Tris; 45mM ácido bórico e 1mM EDTA, pH 8,0), sendo que 150 mL foram destinados ao preparo do gel de agarose tipo *Seakem*[®] *Gold* (Lonza) a 1% e o restante, foi adicionado na cuba de eletroforese onde foi executada a corrida até que atingisse a temperatura de 14°C. Em três poços do gel de agarose foram inseridos *plugs* do marcador de peso molecular *Lambda Ladder PFG Marker* (*New England BioLabs*[®]), de 50 a 1000kb.

Após a transferência dos *plugs* para o gel, este foi posicionado na cuba de eletroforese em campo pulsado do modelo CHEF-DR III (*Bio-Rad*[®]) sendo submetido as seguintes condições: tempo total de corrida de 19 horas, voltagem de 6V/cm, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e pulso inicial de 2,2 segundos e final de 63,8 segundos (RIBOT et al., 2006).

Após a corrida, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo (*Thermo Fisher Scientific*[®]) 0,5mg/mL por 30 minutos, descorado em água MilliQ por 90 minutos, observado em um transluminador ultravioleta Gel Doc XR (*Bio-Rad*[®]) e fotografado utilizando-se o programa *Quantity One 4.6.1* (*Bio-Rad*[®]).

A análise do padrão de bandas gerado através da eletroforese em campo pulsado foi realizada por meio do programa *Bionumerics 7.6* (*Biomérieux*[®]). Apenas bandas acima de 48,5kb foram incluídas na análise. O marcador de peso molecular *Lambda Ladder PFG Marker* (*New England BioLabs*) foi empregado para normalizar as imagens e permitir a comparação entre os géis obtidos na análise. Os dendrogramas de similaridade genotípica foram gerados pelo algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

3.1.2. *Multilocus sequence typing (MLST)*

O advento do sistema de classificação microbiana baseado em sequências do gene 16S rRNA (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990) permitiu a identificação de microrganismos bem como a pesquisa de relações taxonômicas (CHRISTENSEN; NORDENTOFT; OLSEN, 1998; JANDA & ABBOTT, 2007), visto que se trata de uma região conservada presente em praticamente todas as bactérias (JANDA & ABBOTT, 2007). Entretanto, esse método apresenta limitações quanto a microrganismos de maior proximidade genética, impossibilitando a diferenciação (MAIDEN et al., 2013). Conseqüentemente, houve uma busca por métodos de tipagem molecular que fornecessem uma maior precisão, dentre essas técnicas, destaca-se o MLST (SABAT et al., 2013).

O MLST é um método de tipagem molecular mundialmente utilizado em vigilância epidemiológica, surtos e análises filogenéticas de diferentes espécies (MEUNSENE et al.; 2021 RILEY, 2014), tendo como vantagens sua alta reprodutibilidade e facilidade em disponibilizar e acessar informações em bancos de dados públicos (PÉREZ-LOSADA et al., 2013). Além disso, o método apresenta como vantagem, a utilização de alelos durante as análises de comparação, independentemente do número de polimorfismos de nucleotídeos envolvidos (MAIDEN et al., 2013)

Em bactérias, a aquisição de um novo alelo pode ser decorrente de mutações pontuais, que resultam na alteração de apenas um nucleotídeo, ou por meio da transferência horizontal de genes (processos como transdução, transformação ou conjugação), que leva a alterações de nucleotídeos em vários sítios (MAIDEN, 2006; URWIN & MAIDEN, 2003). Caso a análise fosse realizada de acordo com a quantidade de polimorfismos de nucleotídeos entre alelos, erroneamente, seria considerado mais de um evento genético ao invés de apenas um (DIDELOT & MAIDEN, 2010; MAIDEN et al., 2013).

O método baseia-se na amplificação e sequenciamento de sete genes de manutenção ou essenciais (*housekeeping genes*) (ACHTMAN et al., 2012; DIDELOT & MAIDEN, 2010), os quais por serem conservados, são considerados ótimos marcadores para obtenção de dados referentes a tipagem e filogenia (PÉREZ-LOSADA et al., 2013). Após o sequenciamento, as sequências de nucleotídeos

obtidas para cada um dos genes, denominadas como alelo, são depositadas em bancos de dados, os quais fornecem um número específico (PÉREZ-LOSADA et al., 2013). Posteriormente, a combinação desses números leva a obtenção de um perfil alélico, que receberá um número denominado *sequence type* (ST) que será utilizado durante as análises (MAIDEN, 2006).

Durante o período do estágio, estirpes de *Salmonella* Typhimurium monofásica isoladas de animais e de seres humanos foram caracterizadas por MLST. A partir de uma cultura da bactéria em caldo BHI incubada a 37°C *overnight*, procedeu-se a extração do material genético com o *kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Lot: 000532946). A integridade do DNA genômico extraído foi confirmada, ao submetê-lo a eletroforese em gel de agarose, adicionando-se 3 µL do mesmo a 2 µL de solução de azul de bromofenol (40% sacarose e 0,25% de azul de bromofenol), em um gel de agarose 1,0% preparado com tampão Tris Acetato EDTA (TAE) 1X. A corrida foi conduzida a 80 Volts por 90 minutos. Depois de finalizada, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo (*Thermo Fisher Scientific®*) 0,5 µg/mL durante 20 minutos.

A leitura do resultado foi por meio de transluminador ultravioleta (*Gel Doc XR, Bio-Rad®*), no qual o gel foi fotografado utilizando o programa *Quantity One 4.6.1* (Bio-Rad®). A verificação da pureza e determinação da concentração do DNA genômico extraído foram determinadas em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific®*). As extrações com pureza $\geq 1,6$ e $\leq 1,9$ nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm respectivamente foram consideradas boas, ou seja, apresentam valores que sugerem um baixo teor de impurezas (RUSSELL & SAMBROOK, 2001).

Prosseguindo, aplicou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos sete genes de manutenção de *Salmonella* spp. (*aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA, thrA*). As informações sobre os *primers* utilizados estão disponibilizados no banco de dados de MLST para *Salmonella enterica* (<https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/mLst/mLst-legacy-info-senterica.html>) (Tabela 1). As reações de amplificação foram conduzidas em volume final de 50µL. Os reagentes e concentrações utilizados estão descritos na Tabela 2.

Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e, em seguida, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20

minutos, observados em transluminador ultravioleta (*Gel Doc XR, Bio-Rad®*) e registrados em programa fotográfico (*Quantity One 4.6.1, Bio-Rad®*).

No passo seguinte, foi feita a purificação dos *amplicons* com o *Kit PureLink™ Quick PCR Purification (Life Technologies®)* e, posteriormente, o sequenciamento de cada gene *housekeeping* no Laboratório de Genética Molecular, localizado na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em sequenciador automático de DNA ABI 3500xL *Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystems – Life Technologies®)*.

As sequências dos genes foram analisadas no programa *ChromasPro* versão 1.41 (*Technelysuym PtY LTD*), sendo geradas sequências sobrepostas com a finalidade de obter-se a sequência consenso para cada gene de cada bactéria sequenciada. Foram utilizadas sequências padrões dos genes *housekeeping* disponíveis no banco de dados de *Salmonella enterica* do Enterobase (https://enterobase.warwick.ac.uk/species/senterica/search_strains?query=st_search).

Com a finalidade de comparar os STs obtidos com dados globais, foi construído um diagrama com auxílio do programa *PHYLOViZ* (RIBEIRO-GONÇALVES et al., 2016) utilizando-se os STs e respectivos números dos alelos dos sete genes *housekeeping* do sorovar Typhimurium disponíveis para acesso público na plataforma Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>).

Tabela 1. *Primers* utilizados para a metodologia de MLST na tipagem de *Salmonella enterica*.

Genes	Sequências dos primers (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>thrA</i>	F - GTCACGGTGATCGATCCGGT R - CACGATATTGATATTAGCCCG	852
<i>purE</i>	F - GACACCTCAAAAGCAGCGT R - AGACGGCGATACCCAGCGG	510
<i>sucA</i>	F - CGCGCTCAAACAGACCTAC R - GACGTGGAAAATCGGCGCC	643
<i>hisD</i>	F - GAAACGTTCCATTCCGCGC R - GCGGATTCCGGCGACCAG	894

<i>aroC</i>	F - CCTGGCACCTCGCGCTATAC	826
	R - CCACACACGGATCGTGGCG	
<i>hemD</i>	F - GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG	666
	R - ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA	
<i>dnaN</i>	F - AATTTCTCATTTCGAGAGGATTGC	833
	R - CCGCGGAATTTCTCATTTCGAG	

F – forward; R – reverse

Tabela 2. Reagentes e concentrações para a amplificação dos sete genes *housekeeping* da técnica de MLST.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
10X Tampão "PCR Buffer"	5	1X
10mM "dNTP Mixture"	1	0,2 mM de cada dNTP
<i>Primer forward</i>	2,5	25 pmol
<i>Primer reverse</i>	2,5	25 pmol
50mM MgSO ⁴	2	2mM
DNA genômico (10 ng/µL)	5	50ng
Taq DNA Polimerase " <i>High Fidelity</i> " (1 U/µL)	1	1U
H ₂ O destilada ultra pura livre de Dnase e Rnase	q.s.p. 50	-

3.1.3. Análises de *Whole Genome Sequencing* (WGS)

O sequenciamento do genoma completo (WGS) tem se tornando uma técnica mais acessível financeiramente e caracteriza-se por maior resolução quando comparada a outras para tipagem molecular (ONICIUC et al., 2018). Constitui-se em uma maneira mais eficiente de análises epidemiológicas como o monitoramento de doenças transmitidas por alimentos (GERNER-SMIDT et al., 2019) e a ocorrência de surtos (INNS et al., 2017). Os dados gerados pelo WGS possibilitam a realização de análises filogenéticas, identificação de genes de resistência, plasmídios, perfis de virulência bem como polimorfismos de nucleotídeo único (PORNUSUKAROM; VAN VLIET; THAKUR, 2018). Durante o período do estágio, foram conduzidas diversas

análises baseadas em WGS para caracterização genômica de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum.

A pesquisa de genes de resistência adquiridos e mutações pontuais que conferem resistência a antimicrobianos foi conduzida no programa *AMRFinderPlus* (FELDGARDEN et al., 2019, 2021, 2022) e dos genes de estresse através do filtro de busca “*Stress genotypes*” (WEE et al., 2021). Ambos integrados ao banco de dados da plataforma *NCBI Pathogen Detection*, onde a pesquisa desses, é feita por meio da busca do número de acesso das sequências depositadas.

Na plataforma *Center for Genomic Epidemiology* (CGE), foram conduzidas pesquisas de plasmídios e seus respectivos grupos de incompatibilidade pelo *PlasmidFinder* 2.1 (CAMACHO et al., 2009; CARATTOLI et al., 2014); pesquisa do *sequence type* pelo MLST 2.0 (BARTUAL et al., 2005; CAMACHO et al., 2009; GRIFFITHS et al., 2010; JAUREGUY et al., 2008; LARSEN et al., 2012; LEMEE et al., 2004; WIRTH et al., 2006); ilhas de patogenicidade de *Salmonella* pelo *SPIFinder* 2.0 (ROER et al., 2016); e análises de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) pelo *CSI Phylogeny* 1.4 (KAAS et al., 2014).

Para pesquisa de genes de virulência em *Salmonella* spp. foi utilizada a plataforma *VFAnalyzer*, integrada ao *Virulence Factors Database* (VFDB) (CHEN et al., 2005; CHEN et al., 2012; CHEN et al., 2016; LIU et al., 2019; YANG et al., 2008). Além disso, houve a busca de sequências de profagos na plataforma *PHASTER* (ARNDT et al., 2016; ZHOU et al., 2011).

Para determinação da correlação filogenética das linhagens analisadas, foi empregado o programa *Gegenees*, que se baseia no alinhamento de genomas fragmentados para inferência de distância filogenética.

3.2. Sobrevivência aos estresses ácido e oxidativo

Em casos de infecção por *Salmonella* spp., a bactéria deve sobreviver ao pH ácido do estômago para alcançar o intestino, onde atravessa o epitélio por meio da expressão do sistema de secreção do tipo III (T3SS) (KENNEY, 2019) e é fagocitada por macrófagos (CAMPIONI et al., 2021), os quais a submetem a um estresse oxidativo através da produção de peróxido de hidrogênio (IMLAY, 2019). Geralmente,

a capacidade de sobrevivência do microrganismo a essas condições apresenta variações de acordo com o sorovar (SHAH et al., 2012).

No laboratório, a sobrevivência ao estresse ácido foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Shah et al. (2012). Estirpes de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos foram cultivadas em caldo LB (Luria Bertani) a 37°C sob agitação orbital por 16 horas (início da fase estacionária de crescimento bacteriano). Posteriormente, ajustou-se a densidade óptica (D.O.) da cultura para 0,2 em um comprimento de onda de 600 nm, o que equivale a aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Em seguida, foram retiradas alíquotas de 1 mL e centrifugadas a 8000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de citrato de sódio/NaOH 100mM pH 7,0 (controle) e tampão citrato de sódio/NaOH 100mM pH 4,5 (estresse). Foram colhidas alíquotas, após 10 minutos e 1 hora de incubação, seguido de diluição seriada em placas de ágar LB, incubadas a 37°C por 24h a fim de determinar a contagem bacteriana. O experimento foi desenvolvido em triplicatas biológicas.

As mesmas linhagens também foram submetidas ao teste de sobrevivência ao estresse oxidativo, segundo o protocolo descrito por Shah et al. (2012). Inicialmente, foram cultivadas como descrito acima. Após centrifugação, o sedimento, foi ressuspensionado em 1 mL de solução salina 0,8% (controle) e em 1 mL de solução salina 0,8% suplementada com H₂O₂ [15mM], seguido de incubação a 42 °C (temperatura corporal das aves). Foram colhidas alíquotas, após 10 minutos e 1 hora de incubação, seguido de diluição seriada em placas de ágar LB, incubadas a 37°C por 24h a fim de obter a contagem bacteriana. O experimento também foi executado em triplicatas biológicas.

3.3. Células Caco-2

Em relação à patogênese, *Salmonella* spp. deve sobreviver ao muco intestinal, aderir e invadir o epitélio, que no caso de seres humanos, se dá via células M (HARAGA et al., 2008). As principais células encontradas no epitélio intestinal humano são os enterócitos, que possuem função absorptiva e células caliciformes, as quais secretam glicoproteínas que constituem o muco (PELASEYED et al., 2014). Após a invasão, a bactéria é fagocitada por macrófagos e se instala dentro de um vacúolo

(JENNINGS; THURSTON; HOLDEN, 2017), onde é capaz de reprogramar essas células de defesa (JIANG et al., 2021), se multiplicar e migrar para outros órgãos como fígado e baço, levando ao desenvolvimento de uma infecção sistêmica (KURTZ; GOGGINS; MCLACHLAN, 2017).

Geralmente, para estudos *in vitro* para avaliar a capacidade de *Salmonella* spp. em invadir o epitélio intestinal de seres humanos, a linhagem de células Caco-2, provenientes de adenocarcinoma de cólon humano, é a de escolha, (GAGNON et al., 2013; GIOVAGNONI et al., 2020; OSTOVAN et al., 2021), visto que na cultura celular são formadas monocamadas polarizadas as quais se diferenciam em células muito semelhantes aos enterócitos (LEA, 2015).

3.3.1. Descongelamento celular

Em relação ao descongelamento celular, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados rapidamente em banho-maria a 37°C. Em seguida, o conteúdo do criotubo foi transferido para um falcon de 15 mL e completado o volume para 10 mL do meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies™*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Gibco™*) mais 1% de antimicrobiano-antimicótico (*Gibco™*) composto por penicilina, estreptomicina e anfotericina B (DMEM-10), seguido de centrifugação a 1500 g por 10 minutos. Posteriormente, o sedimento foi ressuspensionado em 15 mL do meio DMEM-10 e transferido para a garrafa de cultivo celular, incubada em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS, seguido de troca do meio DMEM-10.

3.3.2. Cultivo celular e Montagem da Placa

As células foram cultivadas em garrafas com meio DMEM-10 e mantidas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. Após 20 dias com trocas periódicas de meio, as células atingiram um estado de confluência de aproximadamente 80% (Figura 01). Foram removidas do meio, submetidas a duas lavagens com PBS 1X, seguido da tripsinização com a adição de 10 mL de tripsina 0,25% (*Gibco™*) previamente aquecida a 37°C. As células foram incubadas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C por 10 minutos.

Em seguida, a cada tubo falcon de 15 mL foram adicionados 5 mL da suspensão de células tripsinizadas mais 10 mL do meio DMEM-10 com a finalidade de inativar a tripsina, centrifugação a 1500 g por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 5 mL meio DMEM-10 para contagem celular em câmara de Neubauer, a concentração celular foi ajustada para de 1×10^5 células/mL, sendo adicionado 1 mL dessa suspensão em placas de cultivo celular de 12 poços.

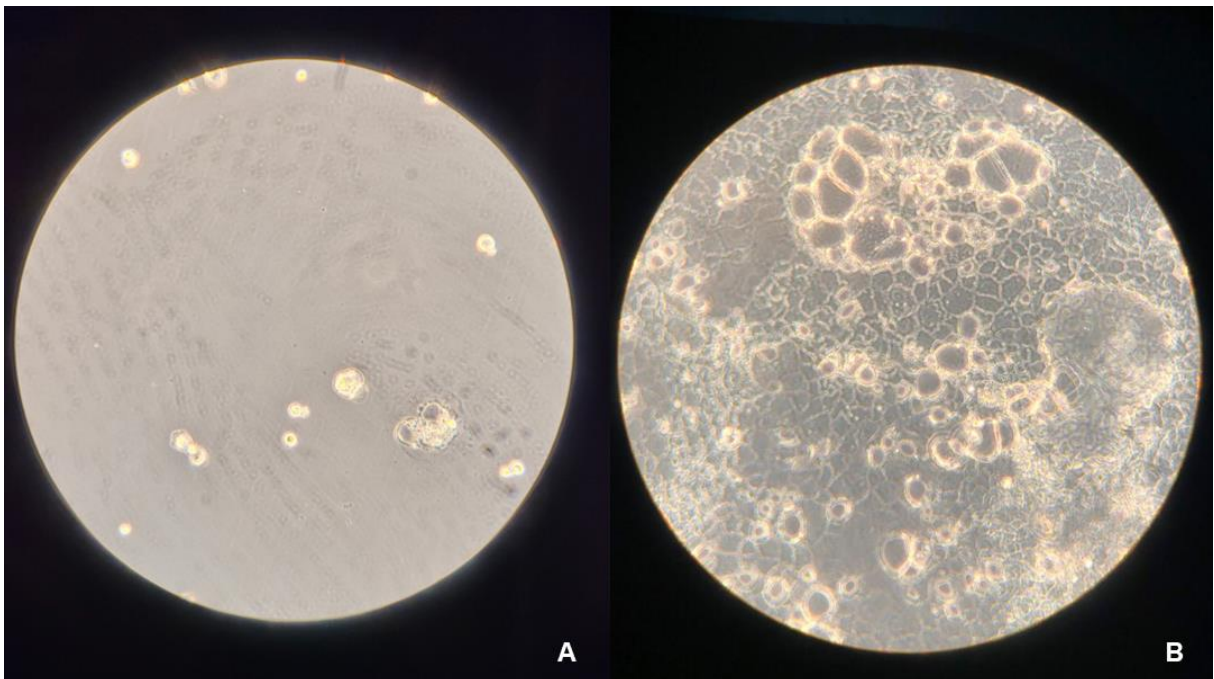


Figura 01. Visualização em microscópio invertido de células Caco-2 após 7 dias (A) e 20 dias (B) de cultivo celular. Fonte: Arquivo pessoal.

3.3.3. Ensaio de invasão

A capacidade de invasão das células epiteliais Caco-2 foi verificada como descrito por Gomes et al. (2021) com modificações. O ensaio foi iniciado após 12 dias de incubação das placas de cultivo celular com trocas periódicas do meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (*Gibco*[™]) mais 1% de antimicrobiano-antimicótico (*Gibco*[™]) (DMEM-5), tempo necessário para que os estados de confluência e diferenciação celular fossem alcançados, com ocorrência de polarização celular, junções apertadas, formação de cúpulas, microvilosidades e aumento atividades enzimáticas da membrana da borda em escova (JUMARIE & MALO, 1991).

O experimento foi executado em triplicatas e a Multiplicidade de Infecção (MOI) foi de 100:1 (SUN et al., 2020).

Inicialmente, as estirpes de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos foram cultivadas em caldo LB a 37°C por 16 horas. Após esse período, o crescimento foi ajustado para uma D.O., no comprimento de onda de 600nm, igual a 0,2 o que corresponde a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL (SHAH et al., 2013). Em seguida, parte dessa suspensão foi transferida para dois microtubos estéreis (1 mL cada), os quais foram centrifugados a 8000 g por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante. Em seguida, o sedimento de um dos tubos foi ressuspensionado em 1 mL de caldo LB com o intuito de determinar a contagem bacteriana do inóculo, enquanto que o do outro microtubo foi ressuspensionado em 1 mL do meio DMEM sem soro fetal bovino e antimicrobiano-antimicótico (DMEM incompleto).

No momento do ensaio, as placas de 12 poços foram retiradas da estufa de 5% de CO₂ e realizou-se a lavagem dos poços com PBS. A seguir, foram adicionados 900 µL do meio DMEM incompleto, seguido da adição de 100 µL da suspensão previamente ajustada, de maneira que a concentração bacteriana final em cada poço foi de 1×10^7 UFC/mL. As placas foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos e incubadas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C durante 90 minutos para que ocorresse a interação célula-bactéria (DETWEILER et al., 2003; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010).

Seguidamente, foi retirado o meio de cultura, lavagem com PBS a 37°C e foi adicionado 1 mL do meio DMEM incompleto suplementado com 30 µL/mL de gentamicina e as placas foram incubadas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C durante 90 minutos a fim de ocorrer a eliminação das bactérias extracelulares. Em seguida, foi retirado o meio de cultura, lavagem com PBS e adição do meio DMEM incompleto, as placas foram incubadas em estufa de 5% de CO₂ por 3 horas a fim de avaliar a capacidade da bactéria de se manter viável dentro da célula.

Posteriormente, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e lisadas com uma solução de Triton X-100 a 1% por 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, foram realizadas diluições seriadas seguido de contagem bacteriana em placas de ágar LB, incubadas a 37°C por 24 horas.

3.3.4. Congelamento celular

Em relação ao processo de congelamento, as células foram tripsinizadas e transferidas para tubos falcon de 15 mL, os quais foram centrifugados a 1500 g por 10 minutos. Em seguida, o sedimento foi resuspenso no meio de congelamento (70% do meio DMEM incompleto, 20% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido) e distribuído 1 mL em criotubos previamente identificados os quais foram armazenados a -80°C em um *Freezing Container (Mr. Frosty™, Thermo Scientific™)* por 24 horas. No dia seguinte, os criotubos foram colocados em estantes e acondicionados em nitrogênio líquido.

3.4. Ensaio Biofilme

Os biofilmes podem ser encontrados tanto no ambiente hospitalar, em materiais como implantes, cateteres e próteses (PERCIVAL et al., 2015), quanto na indústria de alimentos favorecendo a persistência de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (LAMAS et al., 2018). Sua formação consiste em um agregado de microrganismos o qual geralmente está envolvido na produção de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), onde é estabelecido um contato célula-célula (FLEMMING et al., 2016).

Em relação às vantagens dessa formação, os biofilmes conferem uma maior sobrevivência microbiana como resistência a radiação ultravioleta (UV), pH e temperatura extremos e baixa disponibilidade de nutrientes (YIN et al., 2019). Além disso, favorecem a disseminação de resistência antimicrobiana devido à dificuldade em agir o fármaco (SINGH et al., 2017) bem como a ocorrência de conjugação (SHI et al., 2018).

Durante o estágio, estirpes de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Infantis foram testadas quanto a capacidade de formação de biofilmes. As bactérias foram cultivadas em caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*) sob agitação orbital a 37°C por 16h e, posteriormente, as culturas foram ajustadas a 1×10^8 UFC/mL. Em uma microplaca de poliestireno de 96 poços, foram adicionados 180 µL de TSB estéril, seguido de 20 µL da suspensão bacteriana, foram utilizados três poços para cada estirpe. O controle negativo consistiu em três poços contendo apenas 200 µL de caldo TSB estéril mais três poços com 200 µL PBS 1X. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e,

posteriormente, o conteúdo dos poços foi aspirado, seguido de três lavagens com 200 µL de PBS 1X para remoção de células não-aderidas.

Sem demora, as células aderidas foram fixadas com 200 µL de metanol 99% por 15 minutos, e depois, os poços foram aspirados e secos ao ar por 20 minutos. A coloração dos poços foi feita com 200 µL de corante cristal violeta (2%) por 5 minutos. O conteúdo foi posteriormente aspirado, lavado três vezes com 200 µL de PBS 1X para remoção de corante em excesso, enquanto que aquele aderido às células foi ressolubilizado com 200 µL de ácido acético glacial 33% (v/v).

Em seguida, a D.O. de cada poço foi determinada a 570 nm, com o auxílio de um leitor de placas de microtitulação automatizado (*Epoch Biotek*[®]). Todos os ensaios foram desenvolvidos em triplicata biológica. Finalmente, a capacidade de formação de biofilmes foi determinada a partir dos valores de D.O. obtidos para estas em comparação com a D.O. do controle de caldo TSB (D.O.C.) por meio da seguinte fórmula: $D.O. \leq D.O.C.$ = não aderente; $D.O.C. < D.O. \leq (2 \times D.O.C.)$ = fracamente aderente; $(2 \times D.O.C.) < D.O. \leq (4 \times D.O.C.)$ = moderadamente aderente; e $(4 \times D.O.C.) < D.O.$ = fortemente aderente.

4. DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

A realização de métodos de tipagem molecular vem demonstrando sua grande relevância como ferramenta de vigilância epidemiológica nas áreas de saúde pública e segurança alimentar através da identificação de patógenos de relevância mapeamento de surtos, caracterização genética e monitoramento da presença de genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência. Deste modo, deve-se ressaltar o importante papel da ciência da Universidade dentro das esferas públicas, além do papel do laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica no desenvolvimento de projetos relevantes no estudo de patógenos de grande relevância para a saúde humana, animal e ambiental, como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. Durante o período de estágio, tive a oportunidade de acompanhar e entender a aplicação prática de tipos diversos de técnicas moleculares, além de ensaios fenotípicos variados, visando a caracterização de sorovares de *Salmonella* spp., que puderam contribuir para minha formação acadêmico-científica como médica veterinária.

5. CONCLUSÃO

Em suma, o estágio curricular permitiu complementar e aprimorar minha formação acadêmica e científica, contribuindo como aprendizado de novas técnicas e protocolos laboratoriais, o que colaborou para o aperfeiçoamento de minhas habilidades profissionais e interpessoais.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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.; S. Enterica MLST Study Group. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002776, 2012.

ARNDT, D.; GRANT, J. R.; MARCU, A.; SAJED, T.; PON, A.; LIANG, Y.; WISHART, D. S. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W16-W21, 2016.

BARTUAL, S.G.; SEIFERT, H.; HIPPLER, C.; LUZON, M.A.; WISPLINGHOFF, H.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4382-4390, 2005.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2009.

CAMPIONI, F.; GOMES, C.N.; RODRIGUES, D.D.P.; BERGAMINI, A.M.M.; FALCÃO, J.P. Phenotypic analyses of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains isolated in the pre- and post-epidemic period in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 173-183, 2021.

CARATTOLI, A.; ZANKARI, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; VOLDBY LARSEN, M.; LUND, O.; VILLA, L.; MØLLER AARESTRUP, F.; HASMAN, H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895-3903, 2014.

CHEN, L.; YANG, J.; YU, J.; YAO, Z.; SUN, L.; SHEN, Y.; JIN, Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl_1, p. D325-D328, 2005.

CHEN, L.; XIONG, Z.; SUN, L.; YANG, J.; JIN, Q. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D641-D645, 2012.

CHEN, L.; ZHENG, D.; LIU, B.; YANG, J.; JIN, Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D694-D697, 2016.

CHRISTENSEN, H.; NORDENTOFT, S.; OLSEN, J.E. Phylogenetic relationships of Salmonella based on rRNA sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 605-610, 1998.

DETWEILER, C.S.; MONACK D. M.; BRODSKY, I. E.; MATHEW, H.; FALKOW, S. virK, somA and rcsC are important for systemic Salmonella enterica serovar Typhimurium infection and cationic peptide resistance. **Molecular Microbiology**, 48, p.385–400, 2003.

DIDELOT, X.; MAIDEN, M.C.J. Impact of recombination on bacterial evolution. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 7, p. 315-322, 2010.

FELDGARDEN, M.; BROVER, V.; HAFT, D.H.; PRASAD, A.B.; SLOTTA, D.J.; TOLSTOY, I.; TYSON, G.H.; ZHAO, S.; HSU, C.H.; MCDERMOTT, P.F.; TADESSE, D.A.; MORALES, C.; SIMMONS, M.; TILLMAN, G.; WASILENKO, J.; FOLSTER, J.P.; KLIMKE, W. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 11, p. e00483-19, 2019.

FELDGARDEN, M.; BROVER, V.; GONZALEZ-ESCALONA, N.; FRYE, J.G.; HAENDIGES, J.; HAFT, D.H.; HOFFMANN, M.; PETTENGILL, J.B.; PRASAD, A.B.; TILLMAN, G.E.; TYSON, G.H.; KLIMKE, W. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

FELDGARDEN, M.; BROVER, V.; FEDOROV, B.; HAFT, D.H.; PRASAD, A.B.; KLIMKE, W. Curation of the AMRFinderPlus databases: applications, functionality and impact. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 6, p. 000832, 2022.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 430-440, 2009.

GAGNON, M.; BERNER, A. Z.; CHERVET, N.; CHASSARD, C.; LACROIX, C. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. **Journal of microbiological methods**, v. 94, n. 3, p. 274-279, 2013.

GERNER-SMIDT, P.; BESSER, J.; CONCEPCIÓN-ACEVEDO, J.; FOLSTER, J.P.; HUFFMAN, J.; JOSEPH, L.A.; KUCEROVA, Z.; NICHOLS, M.C.; SCHWENSOHN, C.A.; TOLAR B. Whole genome sequencing: bridging one-health surveillance of foodborne diseases. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 172, 2019.

GIOVAGNONI, G.; ROSSI, B.; TUGNOLI, B.; GHISELLI, F.; BONETTI, A.; PIVA, A.; GRILLI, E. Thymol and carvacrol downregulate the expression of Salmonella typhimurium virulence genes during an in vitro infection on caco-2 cells. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 862, 2020.

GOMES, C.N.; CAMPIONI, F.; VILELA, F.P.; DUQUE, S.S.; FALCÃO, J.P. Campylobacter coli strains from Brazil can invade phagocytic and epithelial cells and induce IL-8 secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 859-867, 2021.

GRIFFITHS, D.; FAWLEY, W.; KACHRIMANIDOU, M.; BOWDEN, R.; CROOK, D.W.; FUNG, R.; GOLUBCHIK, T.; HARDING, R.M.; JEFFERY, K.J.; JOLLEY, K.A.; KIRTON, R.; PETO, T.E.; REES, G.; STOESESSER, N.; VAUGHAN, A.; WALKER, A.S.; YOUNG, B.C.; WILCOX, M.; DINGLE, K.E. Multilocus sequence typing of Clostridium difficile. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 3, p. 770-778, 2010.

HARAGA, A.; OHLSON, M.B.; MILLER, S.I. Salmonellae interplay with host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 53-66, 2008.

HERSCHLEB, J.; ANANIEV, G.; SCHWARTZ, D.C. Pulsed-field gel electrophoresis. **Nature protocols**, v. 2, n. 3, p. 677-684, 2007.

IMLAY, J.A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress?. **Environmental microbiology**, v. 21, n. 2, p. 521-530, 2019.

INNS, T.; ASHTON, P.M.; HERRERA-LEON, S.; LIGHTHILL, J.; FOULKES, S.; JOMBART, T.; REHMAN, Y.; FOX, A.; DALLMAN, T.; DE PINNA, E.; BROWNING, L.; COIA, J.E.; EDEGHERE, O.; VIVANCOS, R. Prospective use of whole genome sequencing (WGS) detected a multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 2, p. 289-298, 2017.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.

JAUREGUY, F.; LANDRAUD, L.; PASSET, V.; DIANCOURT, L.; FRAPY, E.; GUIGON, G.; CARBONNELLE, E.; LORTHOLARY, O.; CLERMONT, O.; DENAMUR, E.; PICARD, B.; NASSIF, X.; BRISSE, S. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic Escherichia coli strains. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2008.

JENNINGS, E.; THURSTON, T.L.M.; HOLDEN, D.W. Salmonella SPI-2 type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences. **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 2, p. 217-231, 2017.

JIANG, L.; WANG, P.; SONG, X.; ZHANG, H.; MA, S.; WANG, J.; LI, W.; LV, R.; LIU, X.; MA, S.; YAN, J.; ZHOU, H.; HUANG, D.; CHENG, Z.; YANG, C.; FENG, L.; WANG, L. Salmonella Typhimurium reprograms macrophage metabolism via T3SS effector SopE2 to promote intracellular replication and virulence. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2021.

JUMARIE, C.; MALO, C. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. **Journal of cellular physiology**, v. 149, n. 1, p. 24-33, 1991.

KAAS, R.S.; LEEKITCHAROENPHON, P.; AARESTRUP, F.M.; LUND, O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104984, 2014.

KANG, X.; MENG, C.; PAN, Z. Molecular Typing of Salmonella by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Methods in molecular biology**, v. 2182, p. 187-196, 2021

KENNEY, L.J. The role of acid stress in Salmonella pathogenesis. **Current opinion in microbiology**, v. 47, p. 45-51, 2019.

KURTZ, J.R.; GOGGINS, J.A.; MCLACHLAN, J.B. Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system. **Immunology letters**, v. 190, p. 42-50, 2017.

LAMAS, A.; REGAL, P.; VÁZQUEZ, B.; MIRANDA, J.M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M. Salmonella and Campylobacter biofilm formation: A comparative assessment from farm to fork. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 11, p. 4014-4032, 2018.

LARSEN, M.V.; COSENTINO, S.; RASMUSSEN, S.; FRIIS, C.; HASMAN, H.; MARVIG, R.L.; JELSBÄK, L.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; USSERY, D.W.; AARESTRUP, F.M.; LUND, O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355-1361, 2012.

LEA, T. Caco-2 cell line. **The impact of food bioactives on health**, p. 103-111, 2015.

LEMEE, L.; DHALLUIN, A.; PESTEL-CARON, M.; LEMELAND, J. F.; PONS, J.L. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2609-2617, 2004.

LIU, B.; ZHENG, D.; JIN, Q.; CHEN, L.; YANG, J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D687-D692, 2019.

MAIDEN, M.C.J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual review of microbiology**, v. 60, p. 561-588, 2006.

MAIDEN, M.C.; JANSEN VAN RENSBURG, M.J.; BRAY, J.E.; EARLE, S.G.; FORD, S.A.; JOLLEY, K.A., MCCARTHY, N.D. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728-736, 2013.

MAZENGLIA, E.; MESCHKE, J.; GREESON, K.; ZHAO, S.; ABBOTT, J.; ECKMANN, K.; TATE, H.; HUANG, X.; SAMADPOUR, M. Determining the DNA Fingerprinting Profiles of Salmonella Isolates from Raw Poultry Meats and Human Clinical Samples from the Same Geographic Area Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 7, p. 1265-1274, 2021.

MEUNSENE, D.; EIAMSAM-ANG, T.; PATCHANEE, P.; PASCOE, B.; TADEE, P.; TADEE, P. Molecular evidence for cross boundary spread of Salmonella spp. in meat sold at retail markets in the middle Mekong basin area. **PeerJ**, v. 9, p. e11255, 2021.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates Salmonella enterica serovar Typhimurium virulence in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 914-926, 2010.

NEOH, H.M.; TAN, X.E.; SAPRI, H.F.; TAN, T.L. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 74, p. 103935, 2019.

ONICIUC, E.A.; LIKOTRAFITI, E.; ALVAREZ-MOLINA, A.; PRIETO, M.; SANTOS, J.A.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. The present and future of whole genome sequencing (WGS) and whole metagenome sequencing (WMS) for surveillance of antimicrobial resistant microorganisms and antimicrobial resistance genes across the food chain. **Genes**, v. 9, n. 5, p. 268, 2018.

OSTOVAN, R.; POURMONTASERI, M.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S.S. Interaction between the probiotic Bacillus subtilis and Salmonella Typhimurium in Caco-2 cell culture. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 91, 2021.

PERCIVAL, S.L.; SULEMAN, L.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 4, p. 323-334, 2015.

PÉREZ-LOSADA, M.; CABEZAS, P.; CASTRO-NALLAR, E.; CRANDALL, K.A. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 38-53, 2013.

PELASEYED, T.; BERGSTRÖM, J.H.; GUSTAFSSON, J.K.; ERMUND, A.; BIRCHENOUGH, G.M.; SCHÜTTE, A.; VAN DER, P.S.; SVENSSON, F.; RODRÍGUEZ-PIÑEIRO, A.M.; NYSTRÖM, E.E.; WISING, C.; JOHANSSON, M.E.; HANSSON, G.C. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. **Immunological reviews**, v. 260, n. 1, p. 8-20, 2014.

PORNSUKAROM, S.; VAN VLIET, A.H.M.; THAKUR, S. Whole genome sequencing analysis of multiple Salmonella serovars provides insights into phylogenetic relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals and agriculture environmental sources. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2018.

POSSEBON, F.S.; TIBA CASAS, M.R.; NERO, L.A.; YAMATOJI, R.S.; ARAÚJO JR, J.P.; PINTO, J.P.A.N. Prevalence, antibiotic resistance, PFGE and MLST characterization of Salmonella in swine mesenteric lymph nodes. **Preventive veterinary medicine**, v. 179, p. 105024, 2020.

RIBEIRO-GONÇALVES, B.; FRANCISCO, A.P.; VAZ, C.; RAMIREZ, M.; CARRIÇO, J.A. PHYLOViZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W246-W251, 2016.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N. HUNTER, S.B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T.J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 380-390, 2014.

ROER, L.; HENDRIKSEN, R.S.; LEEKITCHAROENPHON, P.; LUKJANCENKO, O.; KAAS, R.S.; HASMAN, H.; AARESTRUP, F.M. Is the evolution of Salmonella enterica subsp. enterica linked to restriction-modification systems?. **Msystems**, v. 1, n. 3, p. e00009-16, 2016.

RUSSELL, D.W.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SABAT, A.J.; BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J.M; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A.W.; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 4, p. 20380, 2013.

SHAH, D.H.; CASAVANT, C.; HAWLEY, Q.; ADDWEBI, T.; CALL, D.R.; GUARD, J. Salmonella Enteritidis strains from poultry exhibit differential responses to acid stress, oxidative stress, and survival in the egg albumen. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 3, p. 258-264, 2012.

SHAH, J.; DESAI, P. T.; CHEN, D.; STEVENS, J. R.; WEIMER, B. C. Preadaptation to cold stress in Salmonella enterica Serovar Typhimurium increases survival during subsequent acid stress exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 79(23), p. 7281–7289, 2013.

SHI, H.; ZHOU, X.; ZOU, W.; WANG, Y.; LEI, C.; XIANG, R.; ZHOU, L.; LIU, B.; ZHANG, A.; WANG, H. Co-occurrence of biofilm formation and quinolone resistance in Salmonella enterica serotype typhimurium carrying an IncHI2-type oqxAB-positive plasmid. **Microbial pathogenesis**, v. 123, p. 68-73, 2018.

SINGH, S.; SINGH, S.K.; CHOWDHURY, I.; SINGH, R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. **The open microbiology journal**, v. 11, p. 53, 2017.

SUN, L.; YANG, S.; DENG, Q.; DONG, K.; LI, Y.; WU, S.; HUANG, R. Salmonella effector SpvB disrupts intestinal epithelial barrier integrity for bacterial translocation. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 606541, 2020.

URWIN, R.; MAIDEN, M.C.J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

WEE, S.K.; CHAN, S.C.M.; GUAN, X.L.; YAP, E.P.H. Draft Genome Sequence of Enterobacter hormaechei subsp. steigerwaltii Strain BEI01. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 28, p. e00406-21, 2021.

WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L.H.; KARCH, H.; REEVES, P.R.; MAIDEN, M.C.; OCHMAN, H.; ACHTMAN, M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Molecular microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1136-1151, 2006.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

YANG, J.; CHEN, L.; SUN, L.; YU, J.; JIN, Q. VFDB 2008 release: an enhanced web-based resource for comparative pathogenomics. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_1, p. D539-D542, 2008.

YIN, W.; WANG, Y.; LIU, L.; HE, J. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 14, p. 3423, 2019.

ZHOU, Y.; LIANG, Y.; LYNCH, K.H.; DENNIS, J.J.; WISHART, D. S. PHAST: a fast phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_2, p. W347-W352, 2011.

II. ASSUNTO DE INTERESSE

Caracterização genômica de estirpes de *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* possui mais de 2600 sorovares, sendo constituído por duas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *diarizonae*, *arizonae*, *houtenae* e *indica* (ISSENHUTH-JEANJEAN, 2014). Nas aves, existem três enfermidades distintas causadas por *Salmonella enterica*: o tifo aviário, causado por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG); a pulorose, causada por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum (SP); e o paratifo aviário, cujo agente etiológico seria qualquer outro sorovar (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JUNIOR, 2020).

O tifo aviário é uma enfermidade sistêmica causada por SG, que acomete principalmente aves adultas semi-pesadas e pesadas (FREITAS NETO et al., 2007; OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005). Geralmente, os animais apresentam anorexia, apatia, asas caídas e fezes amarelo-esverdeadas, caracteriza-se por uma alta morbidade seguido de mortalidade (FREITAS NETO et al., 2007; OJIMA et al., 2022).

A pulorose, embora seja causada por uma bactéria muito similar ao agente etiológico do tifo aviário, possui uma relação hospedeiro-parasita diferente, afeta especialmente aves jovens as quais apresentam sinais clínicos semelhantes ao tifo aviário, porém com diarreia fluida e esbranquiçada (BARROW & FREITAS NETO, 2011). Assim, SG e SP estão classificadas dentro do mesmo sorovar, pertencem ao sorogrupo D (antígeno O 1, 9 e 12) e não possuem flagelo (WANG et al., 2020), porém, causam doenças distintas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Existem algumas lacunas sobre a relação genética e patogenia de ambas enfermidades (BATISTA et al., 2018). Segundo estudos realizados, ambos biovars possuem como ancestral comum uma linhagem de *S. Enteritidis* denominada “*second clade*”, sendo identificado um grande número de pseudogenes conservados entre os genomas de SG e SP (BATISTA et al., 2018; LANGRIDGE et al., 2015). Trata-se de genes muito presentes em patógenos adaptados a hospedeiros específicos, que por meio de deleções, inserções e substituições de nucleotídeos sofrem uma inativação (FOLEY et al., 2013). Quando se compara biovars, SP apresenta uma maior quantidade de pseudogenes, o que pode ser a razão, da mesma ser mais adaptada ao hospedeiro (FOSTER et al., 2021).

A ocorrência de infecções persistentes é um fator associado a adaptação de patógenos a uma população específica (FOSTER et al., 2021). Sabe-se que a invasão do epitélio intestinal por *Salmonella* desencadeia uma resposta inflamatória caracterizada pelo recrutamento, principalmente, de monócitos, macrófagos e neutrófilos (ROGERS; TSOLIS; BÄUMLER, 2021). Segundo Huang et. (2019), SP e SG desencadeiam uma resposta inflamatória menos intensa quando comparadas a outros sorovares. SP, por sua vez, caracteriza-se por apresentar uma infecção mais persistente, sendo capaz de modular o sistema imunológico, promovendo uma resposta Th2 (TANG et al., 2018), que está associada à redução do processo inflamatório e, provavelmente, a mudança de macrófagos M1 para M2, estes possuem função anti-inflamatória (FOSTER et al., 2021).

Salmonella enterica possui diversos fatores de virulência que estão envolvidos na capacidade da bactéria em invadir, replicar e colonizar as células do hospedeiro (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017), como ilhas de patogenicidade, profagos e plasmídios (MORENO SWITT et al., 2012), que desempenham um papel importante na adaptação a diferentes nichos e hospedeiros (JANTSCH; CHIKKABALLI; HENSEL, 2011; MORENO SWITT et al., 2012). Ademais, em ambos biovars já foi relatado a ocorrência de resistência antimicrobiana (NHUNG; CHANSIRIPORNCHAI; CARRIQUE-MAS, 2017; ZHANG et al., 2021).

A realização de análises comparativas de genoma permite elucidar diferenças e semelhanças compartilhadas, principalmente, entre grupos de microrganismos patogênicos relevantes para a avicultura industrial (VAID et al., 2021). Diversas

análises genômicas comparativas permitiram elucidar fatores associados a virulência e evolução de *Salmonella* (HU et al., 2019; KIPPER et al., 2021). Assim, objetiva-se com o presente estudo reunir informações referentes aos biovares em questão, visando traçar perfis genotípicos e compará-los, servindo de base para estudos futuros sobre patogênese de SP e SG.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Genomas bacterianos

Os genomas bacterianos estudados de SG e SP foram selecionados através da plataforma *NCBI Pathogen Detection* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>), onde estavam publicamente disponíveis para acesso e *download*. A seleção dos genomas foi baseada nos filtros “*Serovar*”, onde foram selecionadas as opções “*Gallinarum*” e “*Pullorum*”, e “*Computed Types*” que considerou a opção “*Gallinarum* or *Enteritidis*”. Foram excluídos da análise genomas que não estavam disponíveis para *download* ou que não possuíam informações a respeito de região geográfica e material/fonte de isolamento. Após a seleção, foi obtido um total de 88 linhagens, sendo 49 genomas de SG e 39 genomas de SP.

Entretanto, devido a possibilidade de algum genoma ter sido identificado apenas até o sorovar, quando depositado na plataforma, realizou-se a pesquisa dos genes *stn*, *I137_08605* e *ratA* no programa *MyDbFinder* 2.0 da plataforma *Center for Genomic Epidemiology* (<https://cge.food.dtu.dk/services/MyDbFinder/>) com os parâmetros de 80% para o limite de identidade e para o comprimento mínimo. Segundo Xiong et al. (2018), por meio da identificação desses genes é possível diferenciar ambos biovares, sendo que SG possui os genes *stn*, *I137_08605* e *ratA*, enquanto que SP possui apenas *stn* e *I137_08605*. Após a análise, foi identificado que na realidade eram 26 genomas de SG (Tabela 3) e 60 genomas de SP (Tabela 4), dois genomas foram removidos, pois, não foi possível identificar a qual biovar pertencia, totalizando 86 linhagens.

Tabela 3. Dados de isolamento e número de acesso dos 26 genomas de *S. Gallinarum* estudados.

Estirpe	N° acesso no GenBank	Localização	Dados de isolamento	
			Data isolamento	Fonte de Isolamento
SG_USA_1972_Clinical	GCA_007649295.1	EUA	1972	Clínica
SG_UK_1995_Feces	GCA_000192125.1	Reino Unido	1995	Fezes
SG_SouthKorea_2007_Chicken	GCA_020023795.1	Coréia do Sul	2007	Ave
SG_Brazil_2010_Other	GCA_000009525.1	Brasil	2010	Outros
SG_Mexico_2013_Horse_intestine	GCA_007804175.1	México	2013	Intestino de equino
SG_Brazil_2014_Poultry_visceral_organs	GCA_001484835.1	Brasil	2014	Víscera de frango
SG_Brazil_2014_Poultry_flock	GCA_006522135.1	Brasil	2014	Lote de aves
SG_Brazil_2014_Breeder_chicken_viscera	GCA_006522315.1	Brasil	2014	Víscera de matriz
SG_Brazil_2014_Breeder_chicken_organ	GCA_010443095.1	Brasil	2014	Víscera de matriz
SG_Brazil_2015_Chicken_layer_bone_marrow	GCA_006522215.1	Brasil	2015	Medula óssea de aves
SG_Brazil_2015_Chicken	GCA_006522255.1	Brasil	2015	Ave
SG_Belize_2015_Chicken	GCA_011108315.1	Belize	2015	Ave
SG_UK_2016_Clinical	GCA_011139775.1	Reino Unido	2016	Clínica
SG_Colombia_2017_Liver_1	GCA_004120865.1	Colômbia	2017	Fígado
SG_Colombia_2017_Liver_2	GCA_004120875.1	Colômbia	2017	Fígado
SG_Colombia_2017_Liver_3	GCA_004120895.1	Colômbia	2017	Fígado
SG_Colombia_2017_Liver_4	GCA_004120935.1	Colômbia	2017	Fígado
SG_Brazil_2017_Layer_hen_1	GCA_004226495.1	Brasil	2017	Galinha poedeira
SG_Brazil_2017_Layer_hen_2	GCA_006522335.1	Brasil	2017	Galinha poedeira
SG_Brazil_2017_Layer_hen_3	GCA_006522365.1	Brasil	2017	Galinha poedeira
SG_Brazil_2017_Quail_viscera	GCA_006527535.1	Brasil	2017	Víscera de codorna
SG_Brazil_2017_Poultry_flock_breeder	GCA_016376085.1	Brasil	2017	Lote de matriz
SG_Tanzania_2017_Cloacal_swab	GCA_022595975.1	Tanzânia	2017	Suabe cloacal

SG_Brazil_2018_Chicken viscera_1	GCA_006526115.1	Brasil	2018	Víscera de frango
SG_Brazil_2018_Chicken viscera_2	GCA_006526195.1	Brasil	2018	Víscera de frango
SG_Mexico_2020_Backyard_bird_organ	GCA_014840155.1	México	2020	Víscera de aves de fundo de quintal

EUA: Estados Unidos da América

Tabela 4. Dados de isolamento e número de acesso dos 60 genomas de *S. Pullorum* estudados.

Estirpe	Nº acesso no GenBank	Localização	Dados de isolamento	
			Data isolamento	Fonte de Isolamento
SP_UK_1985_Liver	GCA_019839725.1	Reino Unido	1985	Fígado
SP_UK_1986_Viscera	GCA_019838185.1	Reino Unido	1986	Víscera
SP_UK_1986_Liver	GCA_019839685.1	Reino Unido	1986	Fígado
SP_UK_1987_Liver	GCA_019837525.1	Reino Unido	1987	Fígado
SP_China_1998_Liver	GCA_019843325.1	China	1998	Fígado
SP_USA_1998_Clinical	GCA_010685845.1	EUA	1998	Clínica
SP_USA_2004_Poultry	GCA_009855385.1	EUA	2004	Ave
SP_China_2007_Liver	GCA_019843305.1	China	2007	Fígado
SP_China_2008_Liver_1	GCA_019837615.1	China	2008	Fígado
SP_China_2008_Liver_2	GCA_019840015.1	China	2008	Fígado
SP_China_2008_Liver_3	GCA_019840205.1	China	2008	Fígado
SP_China_2008_Liver_4	GCA_019842145.1	China	2008	Fígado
SP_China_2008_Liver_5	GCA_019842165.1	China	2008	Fígado
SP_China_2008_Liver_6	GCA_019842945.1	China	2008	Fígado
SP_China_2008_Liver_7	GCA_019860185.1	China	2008	Fígado
SP_China_2009_Liver_1	GCA_019843265.1	China	2009	Fígado
SP_China_2009_Liver_2	GCA_019845855.1	China	2009	Fígado
SP_Belgium_2009_Clinical	GCA_022596375.1	Bélgica	2009	Clínica
SP_China_2012_Liver	GCA_019845275.1	China	2012	Fígado

SP_Brazil_2012_Chicken_litter	GCA_022213225.1	Brasil	2012	Cama de frango
SP_Belgium_2012_Clinical	GCA_022596355.1	Bélgica	2012	Clínica
SP_Sweden_2012_Chicken	GCA_022414755.1	Suécia	2012	Ave
SP_Sweden_2012_Chicken_1	GCA_022414955.1	Suécia	2012	Ave
SP_Sweden_2012_Chicken_2	GCA_022414975.1	Suécia	2012	Ave
SP_Sweden_2012_Chicken_3	GCA_022415015.1	Suécia	2012	Ave
SP_Sweden_2012_Chicken_4	GCA_022415245.1	Suécia	2012	Ave
SP_Sweden_2012_Chicken_5	GCA_022415505.1	Suécia	2012	Ave
SP_China_2013_Liver_1	GCA_019837555.1	China	2013	Fígado
SP_China_2013_Ovary	GCA_019840145.1	China	2013	Ovário
SP_China_2013_Caecum	GCA_019840235.1	China	2013	Ceco
SP_China_2013_Liver_2	GCA_019842065.1	China	2013	Fígado
SP_Germany_2013_Stool_1	GCA_015024675.1	Alemanha	2013	Fezes
SP_Germany_2013_Stool_2	GCA_015024685.1	Alemanha	2013	Fezes
SP_Germany_2013_Stool_3	GCA_015024695.1	Alemanha	2013	Fezes
SP_Germany_2013_Stool_4	GCA_015024735.1	Alemanha	2013	Fezes
SP_China_2014_Yolk_sac_1	GCA_019837965.1	China	2014	Saco vitelino
SP_China_2014_Yolk_sac_2	GCA_019838145.1	China	2014	Saco vitelino
SP_China_2014_Yolk_sac_3	GCA_019838355.1	China	2014	Saco vitelino
SP_China_2014_Wind_egg_1	GCA_019839955.1	China	2014	Ovo sem gema
SP_China_2014_Yolk_sac_4	GCA_019841975.1	China	2014	Saco vitelino
SP_China_2014_Yolk_sac_5	GCA_019842085.1	China	2014	Saco vitelino
SP_China_2014_Yolk_sac_6	GCA_019843225.1	China	2014	Saco vitelino
SP_China_2014_Wind_egg_2	GCA_019845875.1	China	2014	Ovo sem gema
SP_Brazil_2014_Poultry_flock	GCA_003874095.1	Brasil	2014	Lote de aves
SP_Brazil_2014_Breeder_chicken viscera	GCA_006519805.1	Brasil	2014	Lote de matriz
SP_USA_2015_Chicken	GCA_010645945.1	EUA	2015	Ave
SP_Brazil_2015_Chicken_liver	GCA_006522275.1	Brasil	2015	Fígado
SP_Australia_2015_Feces	GCA_013259225.1	Austrália	2015	Fezes
SP_UK_2016_Other	GCA_004260915.1	Reino Unido	2016	Outros

SP_China_2017_Chicken_tissue	GCA_003606225.1	China	2017	Tecido de ave
SP_Brazil_2017_Broiler_organs	GCA_003874035.1	Brasil	2017	Víscera
SP_Brazil_2017_Poultry_flock_breeder	GCA_006522295.1	Brasil	2017	Lote de matriz
SP_UK_2018_Other_1	GCA_007503965.1	Reino Unido	2018	Outros
SP_UK_2018_Other_2	GCA_007504225.1	Reino Unido	2018	Outros
SP_China_2020_Digestive_tract	GCA_019990585.1	China	2020	Trato digestório
SP_Germany_2021_Other	GCA_018338655.1	Alemanha	2021	Outros
SP_Belgium_2021_Clinical_1	GCA_022596395.1	Bélgica	2021	Clínica
SP_Belgium_2021_Clinical_2	GCA_022596415.1	Bélgica	2021	Clínica
SP_USA_2021_Clinical_1	GCA_021103795.1	EUA	2021	-
SP_USA_2021_Clinical_2	GCA_021103815.1	EUA	2021	Clínica

:- dado não fornecido; EUA: Estados Unidos da América

3.2. Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos

Os 86 genomas estudados quanto a presença de genes de resistência adquirida e mutações pontuais associadas à resistência antimicrobiana utilizando o *AMR Finder* (FELDGARDEN et al., 2019, 2021, 2022), integrado ao *NCBI Pathogen Detection* e genes de estresse, foram pesquisados na mesma plataforma, utilizando o filtro específico “*Stress genotype*” (WEE et al., 2021).

3.3. Pesquisa de elementos genéticos móveis

A busca de plasmídios para os 86 genomas ocorreu com o auxílio do *Plasmid Finder 2.1* (CAMACHO et al., 2009; CARATTOLI et al., 2014) do *Center for Genomic Epidemiology* (CGE). Os parâmetros selecionados consistiram em: banco de dados de *Enterobacteriales*, identidade mínima de 95% e cobertura mínima de 60%. A presença de sequências de profagos foi identificada por meio da plataforma PHASTER (ARNDT et al., 2016; ZHOU et al., 2011), onde foram consideradas apenas sequências intactas (pontuação > 90) para determinação dos resultados obtidos.

3.4. Pesquisa de determinantes genéticos de virulência

A presença de genes de virulência em *Salmonella* spp. foi verificada nos 86 genomas estudados através do programa *VF analyzer*, disponível no *Virulence Factors of Bacterial Pathogens* (CHEN et al., 2005; CHEN et al., 2012; CHEN et al., 2016; LIU et al., 2019; YANG et al., 2008). Ainda, a pesquisa de ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPIs) foi conduzida no SPIFinder 2.0, disponível no CGE (ROER et al., 2016), como parâmetros foram adotadas identidade e cobertura mínimas de 95% e 60%, respectivamente.

3.5. Análise filogenética

O ST foi detectado por meio do MLST 2.0 (BARTUAL et al., 2005; CAMACHO et al., 2009; GRIFFITHS et al., 2010; JAUREGUY et al., 2008; LARSEN et al., 2012; LEMEE et al., 2004; WIRTH et al., 2006) disponível no CGE, os parâmetros selecionados foram: *Salmonella enterica* e profundidade mínima nos alelos de 5X. Além disso, no programa cgMLSTFinder 1.2 (ALIKHAN et al., 2018; CLAUSEN;

AARESTRUP; LUND, 2018) também disponível no CGE, foram analisados os genes do core, isto é, genes comumente presentes em determinada espécie de microrganismos (MAIDEN et al., 2013), como resultado, foi obtido uma árvore filogenética a qual foi editada no programa FigTree v1.3.1.

4. RESULTADOS

4.1. Genes de resistência a antimicrobianos e de estresse

A análise dos 86 genomas demonstrou que dentre os genes de resistência a antimicrobianos (Tabela 5), o gene *mdsA*, que está relacionado a bomba de efluxo, esteve presente em todas as estirpes estudadas. Na mesma classe, o gene *mdsB* foi identificado em 100% (26/26) dos genomas de SG e em 98,3% (59/60) de SP. No que se refere aos β -lactâmicos, 11,5% (3/26) dos genomas de SG apresentaram os genes *bla_{TEM-135}* e *bla_{TEM-1}*, este esteve presente em 15% (9/60) dos isolados de SP.

Os genes *sul-1* e *sul-2* (resistência às sulfonamidas), e o gene *tet(A)* (resistência às tetraciclinas) foram encontrados em 3,8% (1/26) dos genomas de SG, enquanto que SP apresentou porcentagens maiores 6,7% (4/60), 15% (9/60) e 13,3 (8/60), respectivamente. Em relação aos aminoglicosídeos, os genes *aac(6')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *ant(2'')-Ia* foram encontrados apenas em SG (3,8%; 1/26), já em SP apenas o gene *aadA5* foi identificado (3,3%; 2/60). Finalmente, somente SG apresentou resistência a fosfomicina (*fosfA3*) em 11,5% (3/26) dos genomas, ao passo que em SP foi detectada resistência a trimetoprima 6,7% (4/60).

Tabela 5. Porcentagem de genes de resistência adquirida a antimicrobianos nos genomas de *S. Gallinarum* (n=26) e *S. Pullorum* (n=60).

Genes de Resistência Adquirida			
Classe Antimicrobiano	Genes	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
Aminoglicosídeo	<i>aac(6')-Ib</i>	3,8	-
	<i>aph(6)-Id</i>	3,8	-
	<i>aph(3'')-Ib</i>	3,8	-
	<i>ant(2'')-Ia</i>	3,8	-
	<i>aadA5</i>	-	3,3

Beta-lactâmico	<i>blaTEM-1</i>	11,5	15
	<i>blaTEM-135</i>	11,5	-
Bomba de efluxo	<i>mdsA</i>	100	100
	<i>mdsB</i>	100	98,3
Fosfomicina	<i>fosA3</i>	11,5	-
Sulfonamida	<i>sul1</i>	3,8	6,7
	<i>sul2</i>	3,8	15
Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	3,8	13,3
Trimetoprima	<i>dfrA17</i>	-	6,7

-: Gene não identificado

Em relação às mutações pontuais que conferem resistência a antimicrobianos (Tabela 6), foram identificados genes associados a resistência a quinolonas, dos quais o mais prevalente foi *gyrA* (S83F) em 38,5% (10/26) e 38,3% (23/60) dos genomas de SG e SP, respectivamente. Nota-se que SG apresentou uma maior diversidade de mutações quando comparado a SP.

Tabela 6. Porcentagem de mutações pontuais relacionadas a resistência a antimicrobianos nos genomas de *S. Gallinarum* (n=26) e *S. Pullorum* (n=60).

Classe Antimicrobiano	Mutações pontuais		
	Genes	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
Quinolona	<i>gyrA</i> (S83F)	38,5	38,3
	<i>gyrA</i> (D87G)	-	3,3
	<i>gyrA</i> (D87N)	3,8	-
	<i>gyrA</i> (D87Y)	7,7	-
	<i>gyrA</i> (S83Y)	15,4	-
	<i>parC</i> (S80R)	3,8	-
	<i>gyrB</i> (S464T)	7,7	-

-: Gene não identificado

Dentre os genes de estresse (Tabela 7), principalmente os relacionados a resistência a metais, *golS* (ouro) e *golT* (cobre/ouro), estiveram presentes nos

genomas analisados. Em segundo lugar, observou-se a presença do gene *asr*, relacionado a resistência a ácidos, tanto em SG com 96,2% (25/26) quanto em SP com 93,3% (56/60). Quanto a resistência a biocidas, em especial a amônia quaternária (*qacEdelta1*), os genomas de SP e SG apresentaram valores de 6,7% (4/60) e 3,8% (1/26), respectivamente. Por último, foram detectados genes de resistência ao mercúrio em 3,8% (1/26) dos isolados de SG.

Tabela 7. Porcentagem de genes de estresse nos genomas de *S. Gallinarum* (n=26) e *S. Pullorum* (n=60).

Genes de Estresse				
Subtipo	Classe	Gene	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
Ácido	NA	<i>asr</i>	96,2	93,3
Biocida	Amônia quaternária	<i>qacEdelta1</i>	3,8	6,7
	Ouro	<i>golS</i>	100	100
Metal	Cobre/Ouro	<i>golT</i>	100	100
		<i>merA</i>	3,8	-
		<i>merC</i>	3,8	-
		<i>merD</i>	3,8	-
	Mercúrio	<i>merE</i>	3,8	-
		<i>merP</i>	3,8	-
		<i>merR</i>	3,8	-
		<i>merT</i>	3,8	-

-: Gene não identificado; NA: não se aplica

4.2. Elementos genéticos móveis

Em relação aos plasmídios (Tabela 8), o IncFII(S) foi o mais prevalente entre os genomas analisados, presente em 100% (60/60) e 84,6% (22/26) dos genomas de SP e SG, respectivamente. Além disso, 86,7% (52/60) dos isolados de SP apresentaram o plasmídio ColpVC, este esteve ausente nos genomas de SG. Neste biovar, IncX2, IncC e IncX1 foram identificados em 3,8% dos genomas (1/26). Esses dois primeiros não foram detectados nos genomas de SP, enquanto que o terceiro esteve presente em 15% (9/60). Finalmente, IncN apresentou valores maiores em SG (11,5%; 3/26) quando comparado a SP (6,7%; 4/60).

Tabela 8. Porcentagem de plasmídios nos genomas de *S. Gallinarum* (n=26) e *S. Pullorum* (n=60).

Plasmídios	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
ColpVC	-	86,7
IncX2	3,8	-
IncC	3,8	-
IncFII(S)	84,6	100
IncN	11,5	6,7
IncX1	3,8	15

-: Plasmídio não identificado

Quanto a pesquisa de profagos (Tabela 9), Gifsy-2 foi identificado em todos os 86 genomas analisados. SP apresentou uma maior diversidade de profagos, sendo encontrados: Enterobacteria ST104 (46,7%; 28/60), Escherichia 500465-1 (26,7%; 16/60), Escherichia pro483 (13,3%; 8/60), Salmonella RE-2010 (5%; 3/60); Yersinia L-413C (1,7%; 1/60). Enquanto que em apenas 3,8% (1/26) dos genomas de SG foram identificados os profagos Enterobacteria Fels-2, Salmonella 103203_sal5 e Salmonella vB_SenS-Ent2. Finalmente, o profago Salmonella Fels-1 esteve presente em 15,4% (4/26) dos isolados de SG e em 1,7% (1/60) de SP.

Tabela 9. Porcentagem de profagos nos genomas de *S. Gallinarum* (n=26) e *S. Pullorum* (n=60).

Profagos	Nº de acesso	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
Enterobacteria phage Fels-2	NC_010463	3,8	-
Enterobacteria phage ST104	NC_005841	-	46,7
Escherichia phage 500465-1	NC_049342	-	26,7
Escherichia phage pro483	NC_028943	-	13,3
Phage Gifsy-2	NC_010393	100	100
Salmonella phage 103203_sal5	NC_031946	3,8	-
Salmonella phage Fels-1	NC_010391	15,4	1,7
Salmonella phage RE-2010	NC_019488	-	5,0
Salmonella phage vB_SenS-Ent2	NC_023608	3,8	-
Yersinia phage L-413C	NC_004745	-	1,7

-: Profago não identificado

4.3. Determinantes genéticos de virulência

Os resultados obtidos na pesquisa de genes de virulência em *Salmonella* spp. (Tabela 10) demonstram que os 86 genomas analisados possuem genes relacionados ao sistema de secreção (*aec16*, *aec17*, *aec18*, *aec19*, *aec22*, *aec23*, *aec24*, *aec25*, *aec26*, *aec28*, *aec30*, *sopB/sigD*, *sopD*, *ssaC*, *ssaD*, *ssaE*, *ssaG*, *ssaH*, *ssaJ*, *ssaK*, *ssaL*, *ssaN*, *ssaO*, *ssaQ*, *ssaR*, *ssaU*, *ssaV*, *sscA*, *sscB*, *sseB*, *sseC*, *sseD*, *sseE*, *sseF*, *sseJ*, *sspH2*, *ssrA*); fatores de adesão fimbrial (*bcfA*, *bcfB*, *bcfC*, *bcfD*, *bcfE*, *bcfF*, *bcfG*, *csgA*, *csgD*, *csgE*, *csgF*, *csgG*, *fimD*, *fimF*, *fimH*, *fimZ*, *lpfB*, *lpfC*, *lpfD*, *lpfE*, *pegB*, *safB*, *stbB*, *stbE*, *steA*, *steC*, *steD*, *steE*, *stfD*, *stfE*, *stfG*, *sthA*, *sthC*, *sthD*, *stiA*, *stiB* e *stiH*); autotransportadores (*ehaB*); absorção de magnésio (*mgtB*, *mgtC*); resistência antimicrobiana a peptídeos (*mig-14*); fatores de adesão não fimbrial (*misL*, *sinH*); regulação (*phoP*, *phoQ*).

Quanto a diferenças entre ambos biovares, destaca-se SP com alta prevalência de alguns genes relacionados a fatores de aderência fimbrial: *safC* (100%; 60/60), *stdA* (96,7%; 58/60), *stdB* (100%; 60/60) e *stdC* (78,3%; 47/60).

Tabela 10. Porcentagem de genes de virulência encontrados nos genomas de *S. Gallinarum* (n=26) e *S. Pullorum* (n=60).

Genes	SG	SP	Genes	SG	SP	Genes	SG	SP	Genes	SG	SP	Genes	SG	SP
<i>acpXL</i>	7,7	1,7	<i>fepG</i>	7,7	1,7	<i>htrB</i>	7,7	1,7	<i>plr/gapA</i>	7,7	1,7	<i>ssaM</i>	53,8	81,7
<i>acrB</i>	7,7	1,7	<i>fimA</i>	100	88,3	<i>iacP</i>	96,2	98,3	<i>prgH</i>	96,2	100	<i>ssaN</i>	100	100
<i>adeG</i>	7,7	1,7	<i>fimC</i>	100	98,3	<i>iagB</i>	96,2	100	<i>prgl</i>	96,2	100	<i>ssaO</i>	100	100
<i>aec15</i>	84,6	100	<i>fimD</i>	100	100	<i>ibeC</i>	7,7	1,7	<i>prgJ</i>	96,2	100	<i>ssaP</i>	100	98,3
<i>aec16</i>	100	100	<i>fimF</i>	100	100	<i>icl</i>	7,7	1,7	<i>prgK</i>	96,2	100	<i>ssaQ</i>	100	100
<i>aec17</i>	100	100	<i>fimH</i>	100	100	<i>invA</i>	96,2	100	<i>ratB</i>	23,1	100	<i>ssaR</i>	100	100
<i>aec18</i>	100	100	<i>fimI</i>	100	88,3	<i>invB</i>	26,9	100	<i>rck</i>	7,7	-	<i>ssaS</i>	-	5
<i>aec19</i>	100	100	<i>fimW</i>	80,8	86,7	<i>invC</i>	96,2	100	<i>rcsB</i>	3,8	-	<i>ssaT</i>	92,3	91,7
<i>aec22</i>	100	100	<i>fimY</i>	73,1	70	<i>invE</i>	96,2	100	<i>rfaD</i>	7,7	1,7	<i>ssaU</i>	100	100
<i>aec23</i>	100	100	<i>fimZ</i>	100	100	<i>invF</i>	96,2	100	<i>rfaE</i>	7,7	1,7	<i>ssaV</i>	100	100
<i>aec24</i>	100	100	<i>flgB</i>	7,7	1,7	<i>invG</i>	96,2	100	<i>rfaF</i>	7,7	1,7	<i>sscA</i>	100	100
<i>aec25</i>	100	100	<i>flgC</i>	7,7	1,7	<i>invH</i>	96,2	100	<i>rmlA</i>	7,7	1,7	<i>sscB</i>	100	100
<i>aec26</i>	100	100	<i>flgD</i>	7,7	1,7	<i>invI</i>	96,2	96,7	<i>rmlB</i>	7,7	1,7	<i>sseA</i>	3,8	1,7
<i>aec27/clpV</i>	100	98,3	<i>flgE</i>	7,7	1,7	<i>invJ</i>	96,2	100	<i>rmlD</i>	7,7	1,7	<i>sseB</i>	100	100
<i>aec28</i>	100	100	<i>flgF</i>	7,7	1,7	<i>iroB</i>	7,7	1,7	<i>rpoS</i>	7,7	1,7	<i>sseC</i>	100	100
<i>aec29</i>	100	76,7	<i>flgG</i>	7,7	1,7	<i>iroC</i>	7,7	1,7	<i>safA</i>	-	1,7	<i>sseD</i>	100	100
<i>aec30</i>	100	100	<i>flgH</i>	7,7	1,7	<i>iroD</i>	-	1,7	<i>safB</i>	100	100	<i>sseE</i>	100	100
<i>aec31</i>	50,0	88,3	<i>flgI</i>	-	1,7	<i>iroE</i>	7,7	1,7	<i>safC</i>	-	100	<i>sseF</i>	100	100
<i>aec32</i>	88,5	93,3	<i>flgJ</i>	7,7	1,7	<i>iroN</i>	7,7	1,7	<i>safD</i>	76,9	90	<i>sseG</i>	92,3	100
<i>algU</i>	7,7	1,7	<i>flgL</i>	7,7	1,7	<i>katG</i>	7,7	1,7	<i>sefC</i>	84,6	-	<i>sseJ</i>	100	100
<i>avrA</i>	96,2	100	<i>flgM</i>	7,7	1,7	<i>kdsA</i>	7,7	1,7	<i>shdA</i>	100	81,7	<i>sseK1</i>	73,1	96,7
<i>bcfA</i>	100	100	<i>flhA</i>	-	1,7	<i>kdtA</i>	7,7	1,7	<i>sicA</i>	96,2	100	<i>sseL</i>	88,5	98,3
<i>bcfB</i>	100	100	<i>flhC</i>	7,7	1,7	<i>lpfA</i>	100	98,3	<i>sicP</i>	96,2	100	<i>sspH2</i>	100	100

<i>bcfC</i>	100	100	<i>flhD</i>	7,7	1,7	<i>lpfB</i>	100	100	<i>sifA</i>	100	98,3	<i>ssrA</i>	100	100
<i>bcfD</i>	100	100	<i>fliA</i>	7,7	1,7	<i>lpfC</i>	100	100	<i>sifB</i>	96,2	100	<i>ssrB</i>	88,5	95
<i>bcfE</i>	100	100	<i>fliD</i>	7,7	1,7	<i>lpfD</i>	100	100	<i>sinH</i>	100	100	<i>stbA</i>	88,5	98,3
<i>bcfF</i>	100	100	<i>fliE</i>	7,7	1,7	<i>lpfE</i>	100	100	<i>sipA</i>	96,2	100	<i>stbB</i>	100	100
<i>bcfG</i>	100	100	<i>fliF</i>	7,7	1,7	<i>lpxA</i>	7,7	1,7	<i>sipB</i>	96,2	100	<i>stbC</i>	100	98,3
<i>bioB</i>	7,7	1,7	<i>fliG</i>	7,7	1,7	<i>lpxB</i>	7,7	1,7	<i>sipC</i>	96,2	100	<i>stbD</i>	100	96,7
<i>ccmF</i>	7,7	-	<i>fliH</i>	7,7	1,7	<i>lpxC</i>	7,7	1,7	<i>sipD</i>	96,2	100	<i>stbE</i>	100	100
<i>cesT</i>	3,8	-	<i>flil</i>	7,7	1,7	<i>lpxD</i>	7,7	1,7	<i>sitA</i>	7,7	1,7	<i>stdA</i>	-	96,7
<i>cheB</i>	7,7	1,7	<i>fliJ</i>	7,7	1,7	<i>luxS</i>	7,7	1,7	<i>sitB</i>	7,7	1,7	<i>stdB</i>	-	100
<i>cheR</i>	7,7	1,7	<i>fliL</i>	7,7	1,7	<i>mgtB</i>	100	100	<i>sitC</i>	7,7	1,7	<i>stdC</i>	-	78,3
<i>cheW</i>	7,7	1,7	<i>fliM</i>	7,7	1,7	<i>mgtC</i>	100	100	<i>sitD</i>	7,7	1,7	<i>steA</i>	100	100
<i>cheY</i>	7,7	1,7	<i>fliN</i>	7,7	1,7	<i>mig-14</i>	100	100	<i>slrP</i>	96,2	100	<i>steB</i>	100	-
<i>cheZ</i>	7,7	1,7	<i>fliO</i>	7,7	-	<i>mig-5</i>	84,6	100	<i>sodCI</i>	92,3	96,7	<i>steC</i>	100	100
<i>csgA</i>	100	100	<i>fliP</i>	7,7	1,7	<i>misL</i>	100	100	<i>sopA</i>	96,2	100	<i>steD</i>	100	100
<i>csgB</i>	100	91,7	<i>fliQ</i>	7,7	1,7	<i>motA</i>	7,7	1,7	<i>sopB/sigD</i>	100	100	<i>steE</i>	100	100
<i>csgC</i>	65,4	83,3	<i>fliR</i>	7,7	1,7	<i>motB</i>	7,7	1,7	<i>sopD</i>	100	100	<i>steF</i>	100	98,3
<i>csgD</i>	100	100	<i>fliS</i>	7,7	1,7	<i>mrsA/glmM</i>	7,7	1,7	<i>sopD2</i>	7,7	1,7	<i>stfA</i>	100	88,3
<i>csgE</i>	100	100	<i>fliZ</i>	7,7	1,7	<i>msbA</i>	7,7	1,7	<i>sopE</i>	42,3	11,7	<i>stfC</i>	100	98,3
<i>csgF</i>	100	100	<i>flmH</i>	7,7	1,7	<i>msbB2</i>	7,7	1,7	<i>sopE2</i>	80,8	95	<i>stfD</i>	100	100
<i>csgG</i>	100	100	<i>gacA</i>	7,7	1,7	<i>narH</i>	7,7	1,7	<i>spaO</i>	96,2	100	<i>stfE</i>	100	100
<i>csrA</i>	7,7	1,7	<i>galE</i>	7,7	1,7	<i>nueA</i>	7,7	1,7	<i>spaP</i>	96,2	100	<i>stfF</i>	92,3	98,3
<i>ctpV</i>	7,7	1,7	<i>galF</i>	7,7	1,7	<i>opsX/rfaC</i>	7,7	1,7	<i>spaQ</i>	96,2	100	<i>stfG</i>	100	100
<i>cysC1</i>	7,7	1,7	<i>galU</i>	7,7	1,7	<i>orfH</i>	7,7	1,7	<i>spaR</i>	96,2	100	<i>sthA</i>	100	100

<i>ddhA</i>	3,8	-	<i>glnA1</i>	7,7	-	<i>orfM</i>	7,7	1,7	<i>spaS</i>	96,2	100	<i>sthC</i>	100	100
<i>ddhC</i>	3,8	1,7	<i>gmhA/lpcA</i>	7,7	1,7	<i>orgA</i>	80,8	95	<i>spiC/ssaB</i>	19,2	1,7	<i>sthD</i>	100	100
<i>ehaB</i>	100	100	<i>gtrA</i>	7,7	66,7	<i>orgB</i>	96,2	100	<i>sprB</i>	96,2	100	<i>sthE</i>	100	98,3
<i>eno</i>	7,7	1,7	<i>gtrB</i>	7,7	1,7	<i>orgC</i>	96,2	100	<i>sptP</i>	96,2	100	<i>stiA</i>	100	100
<i>entA</i>	7,7	1,7	<i>hcpB</i>	-	1,7	<i>panD</i>	7,7	1,7	<i>spvB</i>	42,3	98,3	<i>stiB</i>	100	100
<i>entB</i>	7,7	1,7	<i>hemC</i>	7,7	1,7	<i>pegA</i>	92,3	98,3	<i>spvC</i>	-	15	<i>stiC</i>	92,3	98,3
<i>entC</i>	7,7	1,7	<i>hemE</i>	7,7	1,7	<i>pegB</i>	100	100	<i>spvD</i>	11,5	13,3	<i>stiH</i>	100	100
<i>entD</i>	7,7	1,7	<i>hemH</i>	7,7	1,7	<i>pegC</i>	92,3	98,3	<i>ssaC</i>	100	100	<i>sugC</i>	7,7	1,7
<i>entE</i>	7,7	1,7	<i>hemL</i>	7,7	1,7	<i>pegD</i>	100	95	<i>ssaD</i>	100	100	<i>ugd</i>	7,7	1,7
<i>entF</i>	7,7	1,7	<i>hemN</i>	11,5	1,7	<i>pgi</i>	7,7	1,7	<i>ssaE</i>	100	100	<i>upaG/ehaG</i>	7,7	1,7
<i>faeH</i>	84,6	96,7	<i>hilA</i>	92,3	100	<i>phoP</i>	100	100	<i>ssaG</i>	100	100	<i>virK</i>	7,7	1,7
<i>faeI</i>	76,9	93,3	<i>hilC</i>	96,2	100	<i>phoQ</i>	100	100	<i>ssaH</i>	100	100	<i>wbaP/rfbP</i>	7,7	1,7
<i>faeJ</i>	84,6	100	<i>hilD</i>	96,2	100	<i>pilW</i>	53,8	1,7	<i>ssal</i>	61,5	81,7	<i>wbjD/wecB</i>	7,7	1,7
<i>farB</i>	-	1,7	<i>hlyA</i>	7,7	1,7	<i>pipB</i>	96,2	100	<i>ssaJ</i>	100	100	<i>wcal</i>	7,7	1,7
<i>fepB</i>	7,7	1,7	<i>hofC</i>	-	1,7	<i>pipB2</i>	11,5	100	<i>ssaK</i>	100	100	<i>wecA</i>	7,7	1,7
<i>fepC</i>	7,7	1,7	<i>htpB</i>	7,7	1,7	<i>pla</i>	7,7	1,7	<i>ssaL</i>	100	100	<i>wzb</i>	7,7	1,7

-: gene não encontrado; SG: *Salmonella* Gallinarum; SP: *Salmonella* Pullorum

Na Tabela 11, estão os resultados obtidos na pesquisa de ilhas de patogenicidade em *Salmonella* spp. (SPI). As ilhas de patogenicidade SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-14 e uma denominada como “*Not_named*” (número de acesso JQ071613) foram encontradas nos 86 genomas. C63PI, SPI-1 e SPI-13 foram detectadas em 96,2% (25/26) e 100% (60/60) dos genomas de SG e SP, respectivamente. SPI-9 foi constatada em todos os genomas de SP e em 92,3% (24/26) de SG.

As ilhas CS54_island e SPI-6 foram identificadas somente em SG em 84,6% (22/26) e 3,8% (1/26) dos genomas, respectivamente. Enquanto que em SP encontrou-se a SGI-1 em 6,7% (4/60) dos genomas. SPI-4, SPI-10 e SPI-12 foram detectadas em genomas de ambos biovars, porém, em porcentagens menores quando comparadas as outras ilhas de patogenicidade.

Tabela 11. Porcentagem de ilhas de patogenicidade encontradas nos genomas de *S. Gallinarum* (n=26) e *S. Pullorum* (n=60).

SPI	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
C63PI	96,2	100
CS54_island	84,6	-
Not_named (JQ071613)	100	100
SGI1	-	6,7
SPI-1	96,2	100
SPI-2	100	100
SPI-3	100	100
SPI-4	65,4	60
SPI-5	100	100
SPI-6	3,8	-
SPI-9	92,3	100
SPI-10	76,9	35
SPI-12	19,2	8,3
SPI-13	96,2	100
SPI-14	100	100

-: ilha de patogenicidade não identificada; SPI: ilha de patogenicidade em *Salmonella* spp.

4.4. Análise filogenética

Os resultados obtidos na pesquisa do ST dos 86 genomas estão na Tabela 12. Em SG foi identificado, predominantemente, o ST78 (92,3%; 24/26). Diferentemente de SP que apresentou uma maior diversidade e o ST92 foi o mais prevalente (76,7%; 46/60).

Tabela 12. Porcentagem dos *sequence type* (ST) encontrados quando analisados os genomas de *S. Gallinarum* (n=26) e *S. Pullorum* (n=60).

ST	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
78	92,3	-
92	-	76,7
331	7,7	-
2151	-	10
2453	-	3,3
3717	-	1,7
3720	-	5
3723	-	1,7
8420	-	1,7

-: ST não encontrado

Na árvore filogenética baseada em cgMLST (Figura 2), é evidenciado a separação de ambos biovars com a formação de clados exclusivos de SG e SP.

A maioria dos isolados de SG provenientes do Brasil formaram um único clado (Figura 2A). Dentre os demais, alguns agruparam com genomas do Reino Unido, Belize e México (Figura 2B) e um único isolado de 2015 ficou separado (Figura 2D). Genomas provenientes da Colômbia, que possuem ano e fonte de isolamento iguais, constituíram um único grupo (Figura 2C). Finalmente, os únicos isolados da Tanzânia e Coreia do Sul formaram os clados E e F, respectivamente.

Genomas de SP oriundos do Brasil agruparam-se com outros dos Estados Unidos da América, Austrália, Reino Unido, Alemanha e Bélgica (Figura 2K). Um isolado do Brasil também formou outro grupo com genomas da China e do Reino Unido (Figura 2L). A maioria dos genomas provenientes da China formou dois clados distintos (Figura 2I e 2J).

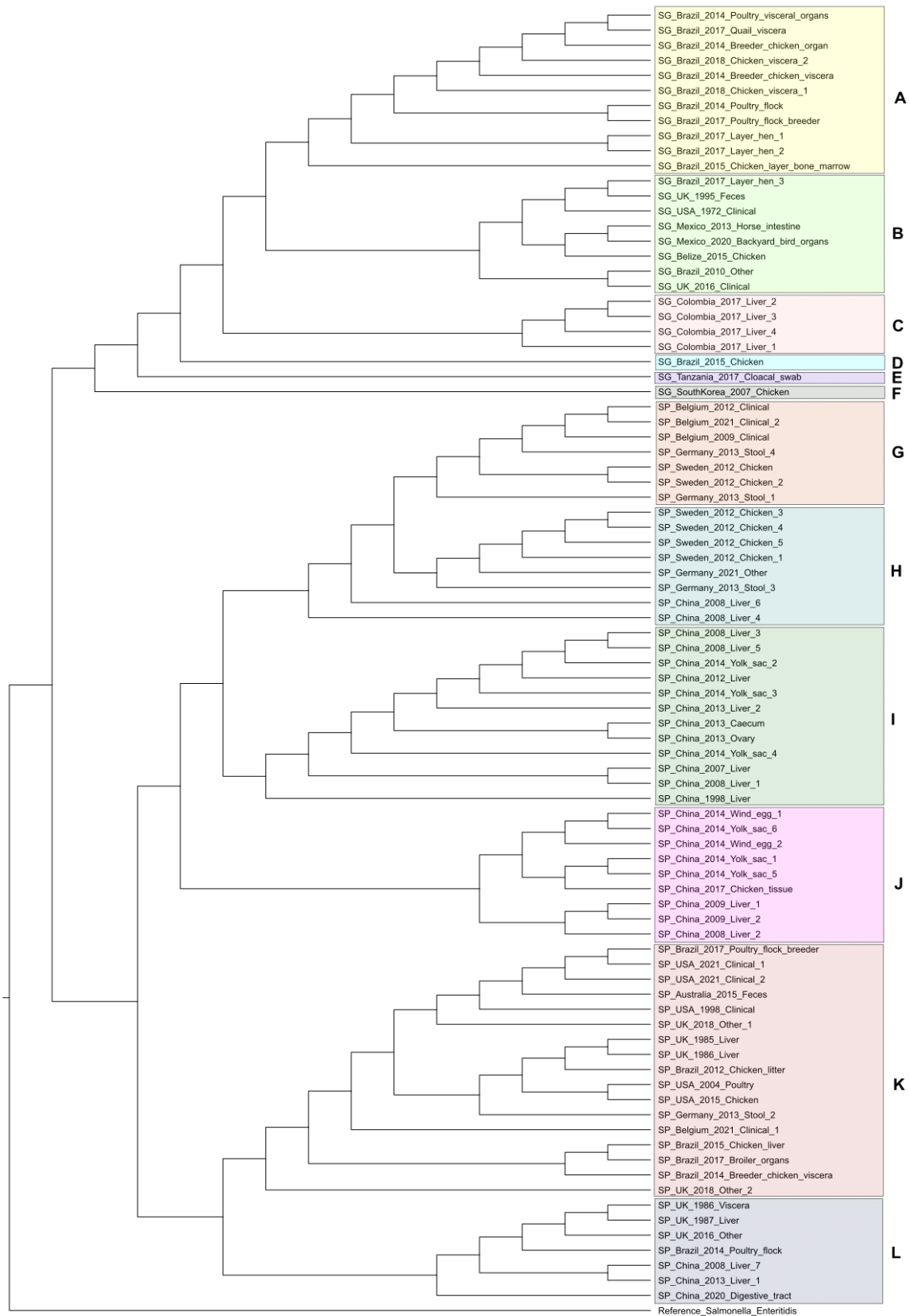


Figura 2. Análise filogenética baseada no cgMLST dos 86 genomas estudados. *Salmonella* Enteritidis P125109 (número de acesso AM933172.1) foi utilizada como genoma de referência.

5. DISCUSSÃO

O uso indiscriminado de antimicrobianos na avicultura industrial contribuiu para o aumento e a disseminação de resistência a esses fármacos (NHUNG; CHANSIRIPORNCHAI; CARRIQUE-MAS, 2017). No estudo realizado, todos os genomas apresentaram genes relacionados à bomba de efluxo (*mdsA* e/ou *mdsB*), que compreende um importante mecanismo de resistência antimicrobiana e virulência em *Salmonella* spp. (BLAIR; RICHMOND; PIDDOCK, 2014). Segundo Song et al. (2015) a bomba de efluxo tripartida MdsABC de *S. Typhimurium* apresentou uma maior expressão durante a infecção de macrófagos, resultando em um aumento da multiplicação bacteriana intracelular.

No presente estudo, observou-se maiores porcentagens quanto a resistência a β -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclinas em SP, enquanto que em um genoma de SG (número de acesso GCA_014840155.1) encontrou-se maior diversidade de genes associados a aminoglicosídeos, diferindo do estudo de Vaid et al. (2021), baseado em menor quantidade de genomas desses biovars e conduzido em outra plataforma, que apenas detectou o gene *aac(6')-laa*, relacionado a resistência a aminoglicosídeos.

No que diz respeito à resistência a quinolonas, mutações pontuais no gene *gyrA* foram as mais prevalentes, sendo que SG apresentou uma maior variedade, à semelhança de um estudo feito com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum (KIM et al., 2019). Em SP, mutações S83F e D87G também foram relatadas por Li et al. (2015) e Guo et al. (2018), respectivamente.

Em relação aos genes de estresse, em mais de 90% dos genomas de ambos os biovars, identificou-se o gene *asr*, responsável pela resistência a ácidos e, conseqüentemente, à sobrevivência bacteriana (SEPUTIENE et al., 2004). Esse gene já foi descrito em sorovares de *Salmonella* envolvidos em surtos alimentares (LI et al., 2021).

Os 86 genomas analisados apresentaram genes de resistência ao cobre, o qual comumente é utilizado como aditivo na alimentação de aves, juntamente com outros metais como zinco e cobalto (KORISH & ATTIA, 2020). Por serem estáveis, quando ocorre o acúmulo desses metais, microrganismos em contato podem potencialmente desenvolver resistência (ROSEN, 1999; YANG et al., 2020). Todos os genomas apresentaram genes de resistência ao ouro, codificada por três unidades transcricionais *gesABC*, *golTS* e *golB* presentes no *cluster gol*, o qual está ausente

em bactérias entéricas como *Escherichia coli* e sorovares de *Salmonella enterica* adaptados a humanos (CHECA & SONCINI, 2011).

Em um dos genomas de SG (número de acesso GCA_020023795.1) foi identificado um gene relacionado à resistência a amônia quaternária, comumente utilizada como desinfetante (GERBA, 2015) e ao mercúrio, metal que pode ser encontrado como contaminante na alimentação animal (EFSA, 2008). Vale ressaltar que a pressão seletiva gerada por metais pesados e biocidas também contribui para seleção e disseminação de resistência antimicrobiana (SOUZA et al., 2022; WALES & DAVIES, 2015).

Em relação aos elementos genéticos móveis, os plasmídios IncFII(S) e ColpVC foram identificados em 100% (60/60) e 86,7% (52/60), respectivamente, dos genomas de SP, enquanto que em SG o plasmídio IncFII(S) foi o mais prevalente, sendo encontrado em 84,6% (22/26) dos isolados. Este último também foi identificado em alta prevalência por Jain et al. (2018) em *S. Typhimurium*. Com relação à pesquisa de profagos, foi encontrado o Gifsy-2 em 100% dos genomas estudados. Este profago possui o gene *sodC*, o qual codifica a enzima superóxido dismutase que favorece o estabelecimento de *Salmonella* spp. no interior de macrófagos e a persistência no hospedeiro (FIGUEROA-BOSSI & BOSSI, 1999; RUBY et al., 2012).

SP apresentou uma maior variedade de profagos em relação a SG, assim como constatado por Vaid et al. (2021). Em uma outra análise de 97 genomas de SP também foram identificadas diversas sequências de profagos e plasmídios, contribuindo para uma maior diversidade genética e aquisição de resistência a antimicrobianos (HU et al., 2019). Dentre a diversidade de profagos encontrada em SP, destaca-se o profago Enterobacteria ST104, pertencente ao gênero P22 (KING et al., 2012). Segundo HU et al. (2019), este profago está associado a virulência e modificações do antígeno O do lipopolissacarídeo (LPS).

Comparando-se as duas enfermidades, a pulrose caracteriza-se por uma infecção mais persistente, com detecção da bactéria em órgãos como fígado e baço em aves produtoras de ovos vermelhos para consumo com até 9 meses de vida (FOSTER et al., 2021; PINHEIRO; OLIVEIRA; BERCHIERI, 2001). Dentre os fatores de virulência relacionados a persistência de *Salmonella* destacam-se as ilhas de patogenicidade SPI-1 e SPI-2 e o *operon spv* (LAWLEY et al., 2006; FOSTER et al., 2021). No presente estudo, foram identificados os genes *spvB*, *spvC*, *spvD* em 98,3%

(59/60), 15% (9/60) e 13,3% (8/60) dos genomas de SP, respectivamente. Enquanto que em SG detectou-se apenas os genes *spvB* e *spvD* em porcentagens menores.

O gene *sseK1* foi encontrado em 96,7% (58/60) e 73,1% (19/26) dos isolados de SP e SG, respectivamente. Segundo Yang et al. (2018), estirpes de *S. Enteritidis* contendo a deleção do gene *sseK1* apresentaram menor capacidade de formação de biofilme e redução da multiplicação intracelular em macrófagos peritoneais de camundongos. Estudos com *Pseudomonas aeruginosa* em crianças com fibrose cística demonstraram que a formação de biofilme esteve associada à capacidade de remodelar uma resposta imune Th1 para uma resposta Th2 com a redução da produção de INF- γ (MOSER et al., 2000; MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014). Esta resposta imunológica também ocorre em infecções causadas por SP (TANG et al., 2018), permitindo pressupor que a presença do gene *sseK1* contribua para a persistência da bactéria no hospedeiro.

Outros fatores de virulência como antígenos relacionados a adesão fimbrial também desempenham um papel importante durante a patogênese de *Salmonella* spp. (REHMAN et al., 2019). Em se tratando de SG e SP, que causam infecção sistêmica, a degradação do *operon* fimbrial tem sido associada à perda da capacidade de colonização intestinal (HU et al., 2019; YUE et al., 2012). Dentre os genes associados à adesão fimbrial em *S. Enteritidis* (CLAYTON et al., 2008), *bcf*, *csg*, *fim*, *peg*, *saf*, *stb*, *ste*, *stf*, *sth* e *lpf* foram identificados no presente estudo, assim como relatado por Hu et al. (2019) em SP e Vaid et al (2021) em SP e SG. Já o gene *std*, relacionado à persistência intestinal e adesão à mucosa cecal em camundongos infectados com *S. Typhimurium* (CHESSA et al., 2009), esteve ausente nos genomas de SG. O *operon sefABC*, que codifica o fator fimbrial SEF14 em *S. Enteritidis* (QUAN et al., 2019; Zhu et al., 2009), não foi identificado em SP; contudo detectou-se o gene *sefC* em 84,6% (22/26) dos isolados de SG, porém, a expressão desse gene depende da presença do gene *sefA* (ZHU et al., 2009), o qual não foi encontrado nos genomas analisados.

No presente estudo, a ilha de patogenicidade SPI-10 foi identificada em 76,9% (20/26) dos genomas de SG e em 35% (21/60) dos isolados de SP. Segundo HU et al. (2019), a ausência dessa ilha de patogenicidade pode ser decorrente da sua degeneração devido a formação de pseudogenes dentro do *operon sef*. Geralmente, as ilhas de patogenicidade SPI 1 a 5 estão presentes em *Salmonella* spp. (RYCHLIK et al., 2009). As ilhas de patogenicidade SPI 1, 2, 3 e 5 foram detectadas em 96,2-

100% dos genomas de SG e SP, enquanto que a ilha de patogenicidade SPI-4 relacionada à adesão ao epitélio intestinal (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017; MORGAN et al., 2004) foi identificada em aproximadamente 60% dos genomas de ambos biovars. Em mais de 90% dos genomas, foram identificadas as ilhas de patogenicidade C63PI, SPI-9, SPI-13 e SPI-14, relacionadas à codificação de ferro e manganês, formação de biofilme, sobrevivência em macrófagos e invasão de células Caco-2, respectivamente (BOYER et al., 2002; KIM et al., 2017; LATASA et al., 2005; ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017; JIANG et al., 2017).

Segundo Achtman et al (2012), os STs, que variam em apenas um dos sete genes de manutenção, são agrupados em um mesmo *eBurstGroup* (eBG). Os biovars Gallinarum (ST78, ST331, ST470, ST762) e Pullorum (ST92, ST747) estão inseridos no eBG4, representado principalmente por *S. Enteritidis* (ACHTMAN et al., 2012). Nos genomas analisados, SG apresentou predominância do ST78 (92,3%; 24/26), enquanto que em SP os mais prevalentes foram o ST92 (76,7%; 46/60) e o ST2151 (10%; 6/60), assim como descrito por Guo et al. (2018) em SP. Essa diferenciação também é evidenciada na árvore filogenética baseada em cgMLST, análise mais sensível e indicada para investigações epidemiológicas (ALIKHAN et al., 2018), com o agrupamento de apenas genomas provenientes do mesmo biovar.

6. CONCLUSÃO

O trabalho permitiu a obtenção de informações relacionadas a genes de resistência antimicrobiana, estresse e virulência, profagos, plasmídios, ilhas de patogenicidade e ST relacionados a SP e SG. Nota-se que além da proximidade filogenética, ambos biovars compartilham semelhanças quanto ao perfil de genes de estresse, plasmídios e ilhas de patogenicidade mesmo quando comparado isolados de diferentes regiões do mundo. SP apresentou uma maior diversidade de profagos, o que contribui para maior diversidade genética e aquisição de resistência a antimicrobianos, esta evidenciada neste estudo pelas maiores porcentagens de resistência a β -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclina. Em SP, ainda, deve-se destacar a presença do gene *sseK1*, associado a capacidade de formação de biofilme, a qual possivelmente está relacionada a resposta imune desencadeada e, conseqüentemente, maior persistência deste biovar.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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.; S. Enterica MLST Study Group. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002776, 2012.

ALIKHAN, N.F.; ZHOU, Z.; SERGEANT, M.J.; ACHTMAN, M. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. **PLoS genetics**, v. 14, n. 4, p. e1007261, 2018.

ARNDT, D.; GRANT, J. R.; MARCU, A.; SAJED, T.; PON, A.; LIANG, Y.; WISHART, D. S. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W16-W21, 2016.

BARROW, P.A.; NETO, O.C.F. Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. **Avian pathology**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2011.

BARTUAL, S.G.; SEIFERT, H.; HIPPLER, C.; LUZON, M.A.; WISPLINGHOFF, H.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4382-4390, 2005.

BATISTA, D.F.A.; NETO, O.C.F.; ALMEIDA, A.M.; MABONI, G.; DE CARVALHO, T.F.; DE CARVALHO, T.P.; BARROW, P.A.; BERCHIERI JR, A. Evaluation of pathogenicity of *Salmonella Gallinarum* strains harbouring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*. **PloS one**, v. 13, n. 7, p. e0200585, 2018.

BLAIR, J.M.A.; RICHMOND, G.E.; PIDDOCK, L.J.V. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 9, n. 10, p. 1165-1177, 2014.

BOYER, E.; BERGEVIN, I.; MALO, D.; GROS, P.; CELLIER, M.F. Acquisition of Mn (II) in addition to Fe (II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 6032-6042, 2002.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2009.

CARATTOLI, A.; ZANKARI, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; VOLDBY LARSEN, M.; LUND, O.; VILLA, L.; MØLLER AARESTRUP, F.; HASMAN, H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895-3903, 2014.

CHECA, S.K.; SONCINI, F.C. Bacterial gold sensing and resistance. **Biometals**, v. 24, n. 3, p. 419-427, 2011.

CHEN, L.; YANG, J.; YU, J.; YAO, Z.; SUN, L.; SHEN, Y.; JIN, Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl_1, p. D325-D328, 2005.

CHEN, L.; XIONG, Z.; SUN, L.; YANG, J.; JIN, Q. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D641-D645, 2012.

CHEN, L.; ZHENG, D.; LIU, B.; YANG, J.; JIN, Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D694-D697, 2016.

CHESSA, D.; WINTER, M.G.; JAKOMIN, M.; BÄUMLER, A. Salmonella enterica serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal α (1, 2) fucose residues in the cecal mucosa. **Molecular microbiology**, v. 71, n. 4, p. 864-875, 2009.

CLAUSEN, P.T.L.C.; AARESTRUP, F.M.; LUND, O. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. **BMC bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2018.

CLAYTON, D.J.; BOWEN, A.J.; HULME, S.D.; BUCKLEY, A.M.; DEACON, V.L.; THOMSON, N.R.; BARROW, P.A.; MORGAN, E.; JONES, M.A.; WATSON, M.; STEVENS, M.P. Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by Salmonella enterica serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. **BMC microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Mercury as undesirable substance in animal feed-Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **EFSA Journal**, v. 6, n. 4, p. 654, 2008.

FELDGARDEN, M.; BROVER, V.; HAFT, D.H.; PRASAD, A.B.; SLOTTA, D.J.; TOLSTOY, I.; TYSON, G.H.; ZHAO, S.; HSU, C.H.; MCDERMOTT, P.F.; TADESSE,

D.A.; MORALES, C.; SIMMONS, M.; TILLMAN, G.; WASILENKO, J.; FOLSTER, J.P.; KLIMKE, W. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 11, p. e00483-19, 2019.

FELDGARDEN, M.; BROVER, V.; GONZALEZ-ESCALONA, N.; FRYE, J.G.; HAENDIGES, J.; HAFT, D.H.; HOFFMANN, M.; PETTENGILL, J.B.; PRASAD, A.B.; TILLMAN, G.E.; TYSON, G.H.; KLIMKE, W. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

FELDGARDEN, M.; BROVER, V.; FEDOROV, B.; HAFT, D.H.; PRASAD, A.B.; KLIMKE, W. Curation of the AMRFinderPlus databases: applications, functionality and impact. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 6, p. 000832, 2022.

FIGUEROA-BOSSI, N.; BOSSI, L. Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice. **Molecular microbiology**, v. 33, n. 1, p. 167-176, 1999. FIGUEROA-BOSSI, N.; BOSSI, L. Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice. **Molecular microbiology**, v. 33, n. 1, p. 167-176, 1999

FOLEY, S.L.; JOHNSON, T.J.; RICKE, S.C.; NAYAK, R.; DANZEISEN, J. Salmonella pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 582-607, 2013.

FOSTER, N.; TANG, Y.; BERCHIERI, A.; GENG, S.; JIAO, X.; BARROW, P. Revisiting Persistent Salmonella Infection and the Carrier State: What Do We Know?. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1299, 2021.

FREITAS NETO, O.C.; ARROYAVE, W.; ALESSI, A.C.; FAGLIARI, J.J.; BERCHIERI, A. Infection of commercial laying hens with Salmonella Gallinarum: clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 133-141, 2007.

FREITAS NETO, O.C., PENHA FILHO, R.A.C., BERCHIERI JUNIOR, A. **Salmoneloses aviárias**. In: Andreatti Filho RL, Berchieri Junior A, Silva EN, Back A, Di Fabio J, Zuanaze MAF (Eds.) Doenças das aves. Campinas: FACTA, p. 495-518, 2020.

GERBA, C.P. Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 2, p. 464-469, 2015.

GRIFFITHS, D.; FAWLEY, W.; KACHRIMANIDOU, M.; BOWDEN, R.; CROOK, D.W.; FUNG, R.; GOLUBCHIK, T.; HARDING, R.M.; JEFFERY, K.J.; JOLLEY, K.A.; KIRTON, R.; PETO, T.E.; REES, G.; STOESSERT, N.; VAUGHAN, A.; WALKER, A.S.; YOUNG, B.C.; WILCOX, M.; DINGLE, K.E. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 3, p. 770-778, 2010.

GUO, X.; WANG, H.; CHENG, Y.; ZHANG, W.; LUO, Q.; WEN, G.; WANG, G.; SHAO, H.; ZHANG, T. Quinolone resistance phenotype and genetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Pullorum isolates in China, during 2011 to 2016. **BMC microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2018.

HU, Y.; WANG, Z.; QIANG, B.; XU, Y.; CHEN, X.; LI, Q.; JIAO, X. Loss and gain in the evolution of the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum genome. **Msphere**, v. 4, n. 2, p. e00627-18, 2019.

HUANG, K.; HERRERO-FRESNO, A.; THØFNER, I.; SKOV, S.; OLSEN, J.E. Interaction differences of the avian host-specific *Salmonella enterica* serovar Gallinarum, the host-generalist *S. Typhimurium*, and the cattle host-adapted *S. Dublin* with chicken primary macrophage. **Infection and immunity**, v. 87, n. 12, p. e00552-19, 2019.

ILYAS, B.; TSAI, C.N.; COOMBES, B.K. Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 428, 2017.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P.I.; WEILL, F.X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in microbiology**, v.165, n. 7, p.526-30, 2014.

JAIN, P.; SUDHANTHIRAKODI, S.; CHOWDHURY, G.; JOSHI, S.; ANANDAN, S.; RAY, U.; MUKHOPADHYAY, A.; DUTTA, S. Antimicrobial resistance, plasmid, virulence, multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clinical and environmental isolates from India. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0207954, 2018.

JANTSCH, J.; CHIKKABALLI, D.; HENSEL, M. Cellular aspects of immunity to intracellular *Salmonella enterica*. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 185-195, 2011.

JAUREGUY, F.; LANDRAUD, L.; PASSET, V.; DIANCOURT, L.; FRAPY, E.; GUIGON, G.; CARBONNELLE, E.; LORTHOLARY, O.; CLERMONT, O.; DENAMUR, E.; PICARD, B.; NASSIF, X.; BRISSE, S. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2008.

JIANG, L.; FENG, L.; YANG, B.; ZHANG, W.; WANG, P.; JIANG, X.; WANG, L. Signal transduction pathway mediated by the novel regulator *LoiA* for low oxygen tension induced *Salmonella Typhimurium* invasion. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 6, p. e1006429, 2017.

KIM, J.J.; SEO, K.W.; MO, I.P.; LEE, Y.J. Genetic Characterization of Fluoroquinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar *Gallinarum* Isolates from Chicken in Korea. **Avian diseases**, v. 63, n. 4, p. 584-590, 2019.

KIM, S.; KIM, E.; PARK, S.; HAHN, T.W.; YOON, H. Genomic approaches for understanding the characteristics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Typhimurium* ST1120, isolated from swine feces in Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 1983-1993, 2017.

KING, A.M.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier**, 2012.

KIPPER, D.; ORSI, R.H.; CARROLL, L.M.; MASCITTI, A.K.; STRECK, A.F.; FONSECA, A.S.K.; IKUTA, N.; TONDO, E.C.; WIEDMANN, M.; LUNGE, V.R. Recent Evolution and Genomic Profile of *Salmonella enterica* Serovar *Heidelberg* Isolates from Poultry Flocks in Brazil. **Applied and environmental microbiology**, v. 87, n. 21, p. e01036-21, 2021.

KORISH, M.A.; ATTIA, Y.A. Evaluation of heavy metal content in feed, litter, meat, meat products, liver, and table eggs of chickens. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 727, 2020.

LANGRIDGE, G.C.; FOOKES, M.; CONNOR, T.R.; FELTWELL, T.; FEASEY, N.; PARSONS, B.N.; SETH-SMITH, H.M.; BARQUIST, L.; STEDMAN, A.; HUMPHREY, T.; WIGLEY, P.; PETERS, S.E.; MASKELL, D.J.; CORANDER, J.; CHABALGOITY, J.A.; BARROW, P.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; THOMSON, N.R. Patterns of

genome evolution that have accompanied host adaptation in Salmonella. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 3, p. 863-868, 2015.

LARSEN, M.V.; COSENTINO, S.; RASMUSSEN, S.; FRIIS, C.; HASMAN, H.; MARVIG, R.L.; JELSBAK, L.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; USSERY, D.W.; AARESTRUP, F.M.; LUND, O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355-1361, 2012.

LATASA, C.; ROUX, A.; TOLEDO-ARANA, A.; GHIGO, J.M.; GAMAZO, C.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Molecular microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1322-1339, 2005.

LAWLEY, T.D.; CHAN, K.; THOMPSON, L.J.; KIM, C.C.; GOVONI, G.R.; MONACK, D.M. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 2, p. e11, 2006.

LEMEE, L.; DHALLUIN, A.; PESTEL-CARON, M.; LEMELAND, J. F.; PONS, J.L. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2609-2617, 2004.

LI, M.; WANG, K.; TANG, A.; TANG, A.; CHEN, A.; HUANG, Z. Investigation of the Genes Involved in the Outbreaks of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in the United States. **Antibiotics**, v. 10, n. 10, p. 1274, 2021.

LI, Q.; HU, Y.; WU, Y.; WANG, X.; XIE, X.; TAO, M.; YIN, J.; LIN, Z.; JIAO, Y.; XU, L.; JIAO, X. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Pullorum multidrug resistance strain S06004 from China. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 606-611, 2015.

LIU, B.; ZHENG, D.; JIN, Q.; CHEN, L.; YANG, J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D687-D692, 2019.

MAIDEN, M.C.; JANSEN VAN RENSBURG, M.J.; BRAY, J.E.; EARLE, S.G.; FORD, S.A.; JOLLEY, K.A.; MCCARTHY, N.D. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728-736, 2013.

MORENO SWITT, A.I.; DEN BAKKER, H.C.; CUMMINGS, C.A.; RODRIGUEZ-RIVERA, L.D.; GOVONI, G.; RANEIRI, M.L.; DEGORICIJA, L.; BROWN, S.; HOELZER, K.; PETERS, J.E.; BOLCHACOVA, E.; FURTADO, M.R.; WIEDMANN, M. Identification and characterization of novel *Salmonella* mobile elements involved in the dissemination of genes linked to virulence and transmission. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41247, 2012.

MORGAN, E.; CAMPBELL, J.D.; ROWE, S.C.; BISPHAM, J.; STEVENS, M.P.; BOWEN, A.J.; BARROW, P.A.; MASKELL, D.J.; WALLIS, T.S. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular microbiology**, v. 54, n. 4, p. 994-1010, 2004.

MOSER, C.; KJAERGAARD, S.; PRESSLER, T.; KHARAZMI, A.; KOCH, C.; HØIBY, N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. **Apmis**, v. 108, n. 5, p. 329-335, 2000.

MULCAHY, L.R.; ISABELLA, V.M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

NHUNG, Nguyen Thi; CHANSIRIPORNCHAI, Niwat; CARRIQUE-MAS, Juan J. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, p. 126, 2017.

OJIMA, S.; ONO, H.K.; OKIMOTO, R.; YU, X.; SUGIYAMA, M.; YOSHIOKA, K.; HANEDA, T.; OKAMURA, M.; HU, D.L. *wecB* Gene of *Salmonella Gallinarum* Plays a Critical Role in Systemic Infection of Fowl Typhoid. **Frontiers in Microbiology**, p. 1386, 2022.

OLIVEIRA, G.H.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, A.C. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 51-56, 2005.

PINHEIRO, L.A.S.; DE OLIVEIRA, G.H.; BERCHIERI JR, A. Experimental *Salmonella enterica* serovar Pullorum infection in two commercial varieties of laying hens. **Avian Pathology**, v. 30, n. 2, p. 129-133, 2001.

QUAN, G.; XIA, P.; ZHAO, J.; ZHU, C.; MENG, X.; YANG, Y.; WANG, Y.; TIAN, Y.; DING, X.; ZHU, G. Fimbriae and related receptors for Salmonella Enteritidis. **Microbial pathogenesis**, v. 126, p. 357-362, 2019.

REHMAN, T.; YIN, L.; LATIF, M.B.; CHEN, J.; WANG, K.; GENG, Y.; HUANG, X.; ABAIDULLAH, M.; GUO, H.; OUYANG, P. Adhesive mechanism of different Salmonella fimbrial adhesins. **Microbial pathogenesis**, v. 137, p. 103748, 2019

ROER, L.; HENDRIKSEN, R.S.; LEEKITCHAROENPHON, P.; LUKJANCENKO, O.; KAAS, R.S.; HASMAN, H.; AARESTRUP, F.M. Is the evolution of Salmonella enterica subsp. enterica linked to restriction-modification systems?. **Msystems**, v. 1, n. 3, p. e00009-16, 2016.

ROGERS, A.W.L.; TSOLIS, R.M.; BÄUMLER, A.J. Salmonella versus the microbiome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 85, n. 1, p. e00027-19, 2021.

RUBY, Thomas et al. Salmonella's long-term relationship with its host. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 3, p. 600-615, 2012.

RYCHLIK, I.; KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; VOLF, J.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; KUMMER, V.; IMRE, A.; SZMOLKA, A.; NAGY, B. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of Salmonella enterica serovar Enteritidis for chickens. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2009.

SEPUTIENE, V.; SUZIEDELIS, K.; NORMARK, S.; MELEFORS, O.; SUZIEDELIENE, E. Transcriptional analysis of the acid-inducible asr gene in enterobacteria. **Research in microbiology**, v. 155, n. 7, p. 535-542, 2004.

SONG, S.; LEE, B.; YEOM, J.H.; HWANG, S.; KANG, I.; CHO, J.C.; HA, N.C.; BAE, J.; LEE, K.; KIM, Y.H. MdsABC-mediated pathway for pathogenicity in Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Infection and immunity**, v. 83, n. 11, p. 4266-4276, 2015.

SOUZA, S.S.R.; TURCOTTE, M.R.; LI, J.; ZHANG, X.; WOLFE, K.L.; GAO, F.; BENTON, C.S.; ANDAM, C.P. Population analysis of heavy metal and biocide resistance genes in Salmonella enterica from human clinical cases in New Hampshire, United States. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

TANG, Y.; FOSTER, N.; JONES, M.A.; BARROW, P.A. Model of persistent Salmonella infection: Salmonella enterica serovar Pullorum modulates the immune response of

the chicken from a Th17-type response towards a Th2-type response. **Infection and immunity**, v. 86, n. 8, p. e00307-18, 2018.

VAID, R.K.; THAKUR, Z.; ANAND, T.; KUMAR, S.; TRIPATHI, B.N. Comparative genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum decodes strain specific genes. **PloS one**, v. 16, n. 8, p. e0255612, 2021.

WALES, A.D.; DAVIES, R.H. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. **Antibiotics**, v. 4, n. 4, p. 567-604, 2015.

WANG, X.; WANG, H.; LI, T.; LIU, F.; CHENG, Y.; GUO, X.; WEN, G.; LUO, Q.; SHAO, H.; PAN, Z.; ZHANG, T. Characterization of *Salmonella* spp. isolated from chickens in Central China. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2020.

WEE, S.K.; CHAN, S.C.M.; GUAN, X.L.; YAP, E.P.H. Draft Genome Sequence of *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* Strain BEI01. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 28, p. e00406-21, 2021.

WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L.H.; KARCH, H.; REEVES, P.R.; MAIDEN, M.C.; OCHMAN, H.; ACHTMAN, M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Molecular microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1136-1151, 2006.

XIONG, D.; SONG, L.; PAN, Z.; JIAO, X. Identification and discrimination of *Salmonella enterica* serovar gallinarum biovars pullorum and gallinarum based on a one-step multiplex PCR assay. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1718, 2018.

YANG, J.; CHEN, L.; SUN, L.; YU, J.; JIN, Q. VFDB 2008 release: an enhanced web-based resource for comparative pathogenomics. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_1, p. D539-D542, 2008.

YANG, S.; DENG, W.; LIU, S.; YU, X.; MUSTAFA, G.R.; CHEN, S.; HE, L.; AO, X.; YANG, Y.; ZHOU, K.; LI, B.; HAN, X.; XU, X.; ZOU, L. Presence of heavy metal resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates and analysis of resistance gene structure in *E. coli* E308. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 21, p. 420-426, 2020.

YANG, Y.; YU, C.; DING, K.; ZHANG, C.; LIAO, C.; JIA, Y.; LI, J.; CHENG, X. Role of the sseK1 gene in the pathogenicity of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in vitro and in vivo. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 270-275, 2018.

YUE, M.; RANKIN, S.C.; BLANCHET, R.T.; NULTON, J.D.; EDWARDS, R.A.; SCHIFFERLI, D.M. Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro-and microevolution. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38596, 2012.

ZHANG, J.F.; SHANG, K.; PARK, J.Y.; LEE, Y.J.; CHOI, Y.R.; KIM, S.W.; CHA, S.Y.; JANG, H.K.; WEI, B.; KANG, M. Antimicrobial Resistance and PFGE Molecular Typing of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum Isolates from Chickens in South Korea from 2013 to 2018. **Animals**, v. 12, n. 1, p. 83, 2021.

ZHOU, Y.; LIANG, Y.; LYNCH, K.H.; DENNIS, J.J.; WISHART, D. S. PHAST: a fast phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_2, p. W347-W352, 2011.

ZHU, C.H.; HASSAN, H.M.; WU, S.L.; ZHU, G.Q. The role of SEF14 fimbriae in pathogenesis and enhancing the immunity of *Salmonella enteritidis*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 5, p. 191-194, 2009.