

**INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE**

**Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação**

**Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal**



**Dissertação**

**Avaliação de fatores de resistência e virulência em isolados de *Salmonella* Thompson  
na indústria avícola**

**Sabine Rippel Stahlhofer**

**Araquari, 2022**



**Sabine Rippel Stahlhofer**

**Avaliação de fatores de resistência e virulência em isolados de *Salmonella* Thompson  
na indústria avícola**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

**Orientador: Alessandra Farias Millezi**

**Araquari, 2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e  
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

S781a      Stahlhofer, Sabine  
Avaliação de fatores de resistência e virulência em  
isolados de Salmonella Thompson na indústria avícola /  
Sabine Stahlhofer; orientadora Alessandra Millezi;  
coorientadora Priscila Lopes. -- Araquari, 2022.  
42 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal  
Catarinense, campus Araquari, , Araquari, 2022.

Inclui referências.

1. frango de corte. 2. caracterização molecular. 3.  
resistência a antimicrobianos. I. Millezi, Alessandra  
, II. Lopes, Priscila. III. Instituto Federal  
Catarinense. . IV. Título.

**Sabine Rippel Stahlhofer**

**Avaliação de fatores de resistência e virulência em isolados de *Salmonella* Thompson  
na indústria avícola**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

**Data da Defesa: 05/12/2022**

**Banca examinadora:**

**Prof.<sup>a</sup>. Dra. Alessandra Farias Millezi (Orientadora)**

**Doutora em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Lavras  
Instituição de vínculo - Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia**

**Prof.<sup>a</sup>. Dra. Teane Milagres Augusto Gomes**

**Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituição de vínculo - Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia**

**Prof.<sup>a</sup>. Dra. Marita Vedovelli Cardozo**

**Doutora em Microbiologia pela Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal  
Instituição de vínculo - Universidade do Estado de Minas Gerais – Campus Passos**



*Emitido em 05/12/2022*

**DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI Nº 12/2022 - PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 01/02/2023 13:46)*

ALESSANDRA FARIAS MILLEZI  
PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO  
CCTA/CON (11.01.04.09)  
Matricula: ###899#7

*(Assinado digitalmente em 27/01/2023 16:30)*

IVAN BIANCHI  
COORDENADOR DE CURSO - TITULAR  
PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)  
Matricula: ###489#1

Visualize o documento original em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: **12**, ano: **2022**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI**, data de emissão: **27/01/2023** e o código de verificação: **2deefdfca3**

**Dedicatória**

Ao Danti, meu maior incentivador nessa trajetória

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me conduzir para as oportunidades certas.

Gratidão a minha mãe, Cladis, por ser minha referência de resiliência, otimismo e coragem, em especial aos momentos que passamos juntas durante a fase da dissertação e minha experiência como enfermeira. Mãe, você é a melhor paciente do mundo! Ao meu pai Ido, sempre vigilante e orgulhoso dos filhos. Ao meu irmão Leonardo, que me acompanhou nos momentos de descompressão, dividindo as ondas comigo, algumas vezes me empurrando nelas.

Ao meu marido Danti, por ser o maior incentivador para meu ingresso na pós-graduação e que me fez seguir em frente. Meu amor e admiração por ti são infinitos. Ao meu “mozi” Vicente, uma criança cheia de luz, que constantemente me faz buscar ser melhor em tudo que eu faço, faz eu reviver a minha história e faz eu ir em busca de transformar bons momentos em memórias felizes para toda vida. Meu amor por ti filho, é incondicional.

Agradeço a Professora Alessandra Farias Millezi, minha orientadora, por todo suporte, instrução e paciência durante o mestrado.

Além disso, agradecer imensamente a empresa Seara por oportunizar meu ingresso no programa, apoiando de forma imparcial em todo o projeto.

Gratidão a todos os laboratórios do grupo, LSA de Seara, LSA de Nuporanga e ao LSA de Montenegro. A todos os colegas de profissão, Zuffo, Taís, Tamara e em especial Priscilla, minha coorientadora, amiga, encorajadora e minha inspiração, sempre me ajudando e participando ativamente na construção de todo o projeto. A todos os veterinários, analistas, auxiliares dos laboratórios, em especial a Adri, Nai, “Amandas”, Gustavo, Tati, Dani, Elis. A todo meu time que superou as dificuldades nas minhas ausências e deu todo apoio necessário (Pati, Lu, Isa, Helô, Day, Lê, Jana, Paloma e Karol) e todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que o projeto fosse executado.



Finalmente, agradecer a Manu e Mari, colegas de profissão, amigas da vida, que vivenciaram junto comigo a experiência do mestrado, obrigada por todas as conversas, todo o apoio e a torcida recíproca pela superação!

***Epígrafe***

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”

**Aristóteles**

## Resumo

STAHLHOFER, Sabine. **Avaliação de fatores de resistência e virulência em isolados de *Salmonella* Thompson na indústria avícola.** 2022. número de folhas "59". Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2022.

*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Thompson tem sido identificada em vários países, sendo um dos principais sorovares envolvido em infecções alimentares em humanos na União Europeia. Além disso, esse sorovar vem apresentando resistência a antimicrobianos de interesse em saúde humana e animal, corroborando assim com a importância da investigação de fatores que contribuem para tal. O objetivo do estudo foi avaliar os perfis fenotípicos e genotípicos dos isolados de *Salmonella* Thompson da cadeia avícola de uma empresa brasileira, visando assim maior compreensão deste patógeno. Para a realização dos experimentos, foram selecionadas 44 estirpes oriundas de amostras coletadas em diferentes setores agropecuários. As estirpes foram submetidas ao teste de susceptibilidade frente a 12 agentes antimicrobianos. O número de isolados sensíveis (81,82%) foi superior ao de isolados resistentes (18,18%). A resistência a sulfonamida foi de 15,91%, e a tetraciclina foi de 2,22%. Na avaliação genotípica dos isolados através da RT-PCR em tempo real, foram investigados os genes relacionados a resistência a antimicrobianos e os fatores de virulência. Os genes de resistência a *tetA*, *sul1* e *sul2* estavam presentes na maioria das amostras (97,73%, 79,55% e 86,36%, respectivamente). A presença do gene *sul3* não foi detectada. Do total de 44 amostras, 26 (59,09%) apresentaram um ou mais genes de virulência. Foi realizada a identificação dos genes de resistência antimicrobianos pela técnica de microarranjo, sendo uma estirpe apresentou o gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> referente a resistência aos antimicrobianos betalactâmicos de espectro estendido e outra apresentou o gene *bla*<sub>OXA-48</sub>, relacionado a resistência antimicrobiana as carbapenamases. Além disso, foi realizada a tipagem molecular dos isolados pela técnica de PFGE, o que demonstrou pouca variabilidade genética entre os 44 isolados, formando 5 padrões de PFGE não clonais. Após análise genética e fenotípica, um isolado de cada *cluster* foi selecionado para avaliação de patogenicidade através do desafio em frangos comerciais. Em relação a excreção da *S.* Thompson, observou-se que a cepa A teve um percentual maior de excreção (94,12%). A cepa do grupo 3, referente ao *cluster* E no PFGE, demonstrou ser a mais invasiva quando comparada as outras cepas. A maioria das estirpes de *S.* Thompson apresentou alta similaridade no PFGE, e isso pode ter sido originado de um mesmo clone que se disseminou. As informações geradas nesse estudo auxiliam e aprimoram as estratégias de controle de *Salmonella* na cadeia avícola, mostrando a necessidade, por questões de saúde pública, de vigilância contínua e uso de análises moleculares como ferramentas auxiliares para tal.

**Palavras-chave:** frango de corte; caracterização molecular; controle; resistência a antimicrobianos .

## Abstract

**STAHLHOFER, Sabine. Evaluation of resistance and virulence factors in *Salmonella* Thompson isolates in the poultry industry.** 2022. number of sheets "59". Dissertation (Master of Science) - Postgraduate Course in Animal Production and Health, Dean of Research, Postgraduate Studies and Innovation, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2022.

*Salmonella* enterica subspecies enterica serovar Thompson has been identified in several countries, being one of the main serovars involved in foodborne infections in humans in the European Union. In addition, this serovar has shown resistance to antimicrobials of interest in human and animal health, thus corroborating the importance of investigating factors that contribute to this. The objective of the study was to evaluate the phenotypic and genotypic profiles of *Salmonella* Thompson isolates from the poultry chain of a Brazilian company, thus aiming at a better understanding of this pathogen. To carry out the experiments, 44 strains from samples collected in different agricultural sectors were selected. The strains were submitted to a susceptibility test against 12 antimicrobial agents. The number of susceptible isolates (81.82%) was higher than that of resistant isolates (18.18%). Sulfonamide resistance was 15.91%, and tetracycline resistance was 2.22%. In the genotypic evaluation of the isolates through real-time RT-PCR, genes related to antimicrobial resistance and virulence factors were investigated. The tetA, sul1 and sul2 resistance genes were present in most samples (97.73%, 79.55% and 86.36%, respectively). The presence of the sul3 gene was not detected. Of the total of 44 samples, 26 (59.09%) showed one or more virulence genes. Carbapenemase, colistin and beta-lactamase resistance genes were identified using the microarray technique, with one strain showing resistance to the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene of the ESBL resistance type and another to the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene, of the carbapenemases resistance type. In addition, molecular typing of the isolates was performed using the PFGE technique, which showed little genetic variability among the 44 isolates, forming 5 non-clonal PFGE patterns. After genetic and phenotypic analysis, one isolate from each cluster was selected for pathogenicity evaluation through challenge in commercial birds. Regarding the excretion of *S.* Thompson, it was observed that the A strain had a higher percentage of excretion (94.12%). The group 3 strain, referring to cluster E in the PFGE, proved to be the most invasive when compared to the other strains. Most of the *S.* Thompson strains showed high similarity in the PFGE, and this may have originated from the same clone that spread. The information generated in this study helps and improves *Salmonella* control strategies in the poultry chain, showing the need, for public health reasons, for continuous surveillance and the use of molecular analyzes as auxiliary tools for this purpose.

**Keywords:** broiler birds; molecular characterization; control; antimicrobial resistance.

## Lista de Figuras

Figura 1	Dendrograma com padrões de bandas obtidas pelo PFGE aplicado em isolados de S. Thompson.....	21
Figura 2	Percentual de recuperação das estirpes inoculadas em aves por dia pós desafio e por órgão avaliado.....	22

## Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> para detecção de genes de virulência em <i>Salmonella</i> Thompson e suas funções preditas.....	13
Tabela 2	<i>Primers</i> para detecção de genes de resistência aos antimicrobianos em <i>Salmonella</i> Thompson.....	13
Tabela 3	Genes detectados pela técnica de micro arranjo <i>Check</i> -MDR CT103XL....	15
Tabela 4	Perfil de resistência dos isolados de <i>S. Thompson</i> avaliados.....	18
Tabela 5	Presença ou ausência dos genes de resistência nos isolados de <i>S. Thompson</i> .....	19
Tabela 6	Frequência detecção genes de virulência <i>S. Thompson</i> .....	19
Tabela 7	Quantificação da carga bacteriana no 3º, 7º, 10º, 17º e 24º dia pós infecção em órgãos.....	23
Tabela 8	Lesões microscópicas observadas em frangos experimentalmente infectados por <i>S. Thompson</i> .....	25

## Lista de Abreviaturas e Siglas

BHI	Infusão cérebro coração
DPI	Dias pós infecção
ESBL	Betalactamase de espectro estendido
IPS	Ilhas de patogenicidade de <i>Salmonella</i>
PFGE	Eletroforese em gel de Campo Pulsado
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa
sp.	Espécie
spp.	Espécies
T3SS	Sistema de secreção tipo 3



## Lista de Símbolos

$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{l}$	Microlitros
ml	Mililitros

## SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE	1
2	OBJETIVOS	9
2.1	Geral	9
2.2	Específicos	9
3	AVALIAÇÃO DE FATORES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> THOMPSON NA INDÚSTRIA AVÍCOLA	10
3.1	Introdução	10
3.2	Material e Métodos	12
3.3	Resultados	19
3.4	Discussão	28
3.5	Conclusão	33
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
5	REFERÊNCIAS	36

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

### 1.1 Impacto e nomenclatura

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, *Salmonella* é um dos mais importantes patógenos zoonóticos, com amplo impacto econômico como também para a saúde dos animais e humanos (ALJAHDALI *et al.*, 2020; VELASQUEZ *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2014). Foram notificados 87.913 casos confirmados de Salmonelose em humanos no ano de 2019 na União Europeia (FOOD; AUTHORITY, 2021). No Brasil, entre os dez agentes identificados em surtos de doenças transmitidas por alimentos, observa-se que *Salmonella* foi o segundo agente mais identificado, no período de 2009 a 2018 (BRASIL, 2019).

*Salmonella* é dividida em duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica*. A espécie *enterica* é dividida em seis subespécies. Destas, a subespécie *enterica* é composta por aproximadamente 1.700 sorotipos, dos quais 99% podem causar infecções em animais e humanos (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014). Alguns sorotipos são bastante estudados, entre eles *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, porém, outros são menos investigados e com isso tem sua epidemiologia pouco esclarecida como por exemplo *S. Thompson* (SHAH *et al.*, 2017).

### 1.2 Casos de *S. Thompson*

*Salmonella enterica* sorovar Thompson foi isolada a primeira vez em 1924 na Inglaterra (CHISHOLM *et al.*, 1999). Conforme reportado pelos Laboratórios Nacionais de Serviços Veterinários dos Estados Unidos, entre 1968 e 2011, foram isoladas 5.408 cepas de *S. Thompson* de diferentes espécies animais, entre bovinos, suínos e frangos. Do total, 2.866 isolados (53%), foram provenientes das aves, demonstrando que este sorovar é mais comumente isolado nessa espécie e menos frequente em outras espécies de animais. (CDC, 2013).

Em uma investigação epidemiológica dos Estados Unidos em operações integradas de aves, *S. Thompson* foi o segundo sorotipo mais frequentemente

observado no incubatório, amostras de fezes, cama e *swab* de arrasto (BAILEY *et al.*, 2001).

Na União Europeia, *S. Thompson* é um dos 20 principais sorovares que infectam humanos (KOUTSOUMANIS *et al.*, 2019). Em um estudo realizado na Escócia, 113 isolados de *S. Thompson* procedentes de sete países europeus foram analisados molecularmente a fim de estudar sua epidemiologia. Verificou-se que o ser humano foi fonte de 62 do total de isolados (54,87%) e 51 isolados (45,13%) foram originários de fontes não humanas, desses, 24 isolados (21,24%) foram provenientes de aves (CHISHOLM *et al.*, 1999). Em um estudo realizado pela Autoridade Europeia para segurança de Alimentos (EFSA) sobre o controle de *Salmonella* em lotes de frango e impacto na saúde pública, o aumento de casos confirmados de salmonelose humana após 2014 desencadeou a investigação de fatores contributivos e opções de controle na produção de frangos. A reconsideração dos cinco sorovares-alvo atuais para galinhas reprodutoras mostrou que há justificativa para reter *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium (incluindo variantes monofásicas) e *Salmonella* Infantis como sorovares-alvo, enquanto *Salmonella* Virchow e *Salmonella* Hadar poderiam ser substituídos por *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Heidelberg ou *Salmonella* Thompson, considerando a ocorrência nos lotes, sua disseminação em alguns estados e virulência aumentada de algumas cepas (KOUTSOUMANIS *et al.*, 2019).

No Canadá, entre 2015 e 2017 *S. Thompson* está entre os quatro sorotipos mais frequentemente identificados em surtos de *Salmonella* reportados na cidade de Toronto. Neste período, foram reportados 1.044 surtos ao Sistema de Informação de Saúde Pública integrado ao Ministério da Saúde e Cuidados de longo prazo de Ontário. Do total, 138 (13,22%) foram relacionados a *S. Thompson* (VARGA *et al.*, 2020).

Além disso, em um comércio de carne de aves cruas na China, foram analisados 1.094 isolados de *Salmonella*, *S. Thompson* entre os cinco sorotipos mais comumente encontrados (YANG *et al.*, 2014).

### 1.3 Antimicrobianos na avicultura

O uso de antimicrobianos na avicultura, tanto para tratamento e profilaxia em frangos, associado a pressão de seleção de bactérias resistentes têm sido foco de vários estudos (RAHMANI *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2017; WALKER *et al.*, 2021). O aumento da resistência antimicrobiana é uma ameaça global significativa tanto para a saúde pública, segurança dos alimentos, como para o desenvolvimento econômico (BLAIR *et al.*, 2015; LOUREIRO *et al.*, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Estima-se que 700.000 pessoas morrem todos os anos por infecções resistentes a antimicrobianos e um número incontável de animais doentes pode não estar respondendo aos tratamentos. (FAO, 2020). Sob a perspectiva de saúde única, há um consenso de que vários fatores devem trabalhar juntos para controlar o aumento da resistência em todo o mundo. Em relação a produção animal, isso implica em mudanças de algumas práticas tradicionais, como a implantação de medidas que priorizam a prevenção de infecções (OIE, 2016; OMS, 2015). No relatório de vigilância dos isolados humanos do Sistema Nacional de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana de 2015 (NARMS), é apontado a resistência de isolados de *S. Thompson* frente a estreptomicina.

Através da Resolução nº XXVIII de 2007, foi estabelecida a Lista de Antimicrobianos de Importância Veterinária, para identificar aqueles extremamente relevantes que são usados na medicina veterinária e complementar a identificação de tais antimicrobianos usados também em medicina humana. Isso auxilia na escolha assertiva do antimicrobiano a ser utilizado nos tratamentos e permite um equilíbrio entre as necessidades da saúde animal e saúde pública (OIE, 2007).

Para atender exigências internacionais, o Brasil vem estabelecendo gradativamente, por meio de regulamentos, um maior rigor em relação ao uso de antibióticos e aditivos melhoradores de desempenho. Recentemente o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa nº 01 de 13 de janeiro de 2020, proibiu o uso de aditivos melhoradores de desempenho que

contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana (MAPA, 2020).

#### 1.4 Resistência bacteriana

No contexto da resistência aos antimicrobianos, as bactérias podem ser naturalmente resistentes a certos agentes, mas também podem obter ou disseminar os genes de resistência horizontalmente, como por meio da troca genética entre o plasmídeo, fagos lisogênicos e o cromossomo bacteriano (WÓJCICKI *et al.*, 2021). A integração desses genes dentro dos elementos genéticos especializados desempenha importante papel na aquisição e disseminação genética, conferindo novos fenótipos as bactérias receptoras, além de frequentemente serem fonte de mudanças adaptativas que potencializam aptidão das bactérias a sua sobrevivência e reprodução. (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017; NABI, 2017). Há outros mecanismos que conferem resistência bacteriana, como: (i) modificações nas vias de sinalização que regulam a expressão de genes que conferem resistência aos mesmos, incluindo mutações nas estruturas dos alvos que impedem a ligação eficiente dos antimicrobianos à bactéria; (ii) modificação direta dos antimicrobianos, que consiste em enzimas capazes de realizar hidrólise ou até mesmo capazes de adicionar grupos químicos à molécula dos antimicrobianos, impedindo a ligação do mesmo ao alvo, (BLAIR *et al.*, 2015; WÓJCICKI *et al.*, 2021).

Considerando a evolução da resistência aos antimicrobianos nas bactérias Gram-negativas, verifica-se que um dos mais importantes mecanismos de resistência aos antimicrobianos é a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases (LOUREIRO *et al.*, 2016; MORENO *et al.*, 2019). Neste contexto, Enterobacteriaceae produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) representam uma ameaça para algumas classes de antimicrobianos, particularmente cefalosporinas (EJAZ *et al.*, 2021).

Os antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos são utilizados em bactérias resistentes as classes dos  $\beta$ -lactâmicos. No entanto, algumas Enterobacteriaceae podem produzir enzimas hidrolisadoras de carbapenem, resistindo a atividade deste composto e, portanto, foram listados pela OMS como patógenos de alta prioridade,

devido a sua associação com mortalidades e morbidades (KOPOTSA; OSEI SEKYERE; MBELLE, 2019).

*Salmonella* desenvolveu uma série de mecanismos moleculares de resistência as drogas, como sensores de membrana e/ou sensores citosólicos (SHAHEEN *et al.*, 2020). Nesse gênero, muitas vias de sinalização que regulam a expressão de genes de resistência a antibióticos foram caracterizadas, como: a família de proteínas TetR (repressores que regulam genes de resistência à tetraciclina); a família de proteínas AraC/XylS, (ativadores/repressores de transcrição); e os componentes dos sistemas de transdução de sinal (como PhoPQ, CpxAR, BaeSR, EnvZ/OmpR e PmrAB) que consistem em proteínas sensoras, geralmente histidina quinase ligada à membrana, e um regulador de resposta citoplasmática (WESTON *et al.*, 2018; WÓJCICKI *et al.*, 2021).

Compreender o efeito da resistência adquirida na fisiologia bacteriana é relevante para o desenvolvimento de estratégias mais precisas para combater infecções, bem como o controle dos agentes ou mesmo da doença quando a infecção se estabeleceu (MARTÍNEZ; ROJO, 2011; RIBEIRO TIBA-CASAS *et al.*, 2021).

Os fatores predominantes que determinam o potencial patogênico de *Salmonella* estão diretamente relacionados com os mecanismos moleculares envolvidos com a capacidade de invadir e replicar-se dentro das células do hospedeiro, assim como resistir à destruição por componentes fagocíticos ou componentes do complemento plasmático (DE MELO *et al.*, 2021; LENITA MOURA, 2020; RIBEIRO TIBA-CASAS *et al.*, 2021).

### 1.5 Fatores de virulência em *Salmonella*

No cromossomo de *Salmonella*, existem locais específicos chamados de Ilhas de Patogenicidade (IPs), onde determinados genes ligados à infecção estão agrupados e os fatores de virulência são codificados. As IPs foram descritas como a “caixa de ferramentas molecular” para a patogênese deste agente. As IPs codificam diferentes funções, que, em grande parte dependem do contexto ambiental em que a bactéria vive. Esses genes conferem vantagens para as bactérias, como adaptação à célula

hospedeira, resistência aos antimicrobianos e a capacidade de superar mecanismos de defesa do hospedeiro (FOLEY *et al.*, 2013; GAL-MOR; FINLAY, 2006; ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017; VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). No pan-genoma de *Salmonella* existem 21 ilhas genômicas apontadas como IPSs. Destes, IPS-1 e IPS-2 foram amplamente caracterizados. Uma das funções da IPS-1 é a invasão das células epiteliais no trato intestinal, enquanto a IPS-2 está envolvida com a sobrevivência intracelular em macrófagos e disseminação sistêmica (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017; RÖDER; HENSEL, 2020).

A principal função dos genes codificados por IPS-1 é de secreção do sistema de secreção tipo III (SST3). O SST3 pode mediar a secreção de proteínas extracelulares diretamente no citosol das células hospedeiras, entre elas a SopE, e modificar vias de transdução de sinais, resultando na reorganização do citoesqueleto de actina na célula hospedeira (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017; RÖDER; HENSEL, 2020). Do mesmo modo, Spi também constitui o SST3 e exporta proteínas que permitem a sobrevivência de *Salmonella* dentro dos macrófagos, modificando os fatores do hospedeiro necessários na fagocitose (OCHMAN *et al.*, 1996).

A patogenicidade de *Salmonella* está associada a vários genes codificadores de virulência, localizados no cromossomo ou no plasmídeo. Por exemplo, os genes de virulência fimbrial, como os genes que codificam as fímbrias polares longas (*lpf*), desempenham um papel no reconhecimento do hospedeiro e medeiam a adesão da bactéria ao epitélio intestinal e a invasão celular. O gene *spvC*, que está localizado principalmente no plasmídeo de virulência, desempenha um papel na multiplicação intracelular e na sobrevivência de *Salmonella* no hospedeiro, também está ligado a infecções sistêmicas por *Salmonella*. (BAHRAMIANFARD *et al.*, 2021).

O ferro é um é um oligoelemento essencial que se incorpora às proteínas como um biocatalisador ou transportador de elétrons em muitos processos biológicos. Além disso, é um cofator de enzimas envolvidas em importantes reações redox e portanto um fator de crescimento essencial para as bactérias no processo de infecção



(DOMÍNGUEZ-ACUÑA; PORTILLO, 2022). A disponibilidade do ferro é reduzida no intestino inflamado e isso exige que bactérias liberem sideróforos, como a enterobactina, para adquirir esse metal essencial. Os sorovares de *Salmonella* adaptam-se a este ambiente produzindo um derivado glicosilado da enterobactina, denominado salmochelin, que não é neutralizado por proteínas do hospedeiro, proporcionando assim ao patógeno uma vantagem de crescimento sobre os concorrentes que dependem apenas de enterobactina para aquisição de ferro (KHAJANCHI *et al.*, 2019; ROGERS; TSOLIS; BÄUMLER, 2021). *S. Typhimurium* regula a expressão dos sistemas de aquisição de ferro respondendo a sinais como a concentração de oxigênio, a quantidade de ferro livre disponível ou a fase de crescimento. A proteína FuR atua como principal regulador desses sistemas. Outras proteínas envolvidas com metabolismo celular do ferro são IroN, FepA e CirA (DOMÍNGUEZ-ACUÑA; PORTILLO, 2022).

#### 1.6 Similaridade genética de *Salmonella*

Métodos capazes de discriminar estirpes de *Salmonella* spp. com base em diferenças no perfil genético estão disponíveis para auxiliar na investigação epidemiológica. Dentre estes, o método de Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE) usado para a comparação dos perfis genéticos bacterianos, principalmente devido ao seu potencial elevado de diferenciação e contribuição para investigações sobre origem e disseminação do patógeno (OLIVE; BEAN, 1999; RIBOT *et al.*, 2006).

O controle de *Salmonella* em granjas de frango não é uma tarefa simples, em função da existência de muitas fontes possíveis de contaminação, como vetores, ração e água, cama, transporte, pessoas, animais domésticos e selvagens (BAILEY *et al.*, 2001; KOUTSOUMANIS *et al.*, 2019; WIBISONO *et al.*, 2020). Nesse contexto, vale ressaltar que, medidas de biossegurança são importantes para o controle do agente. Porém, conhecer o perfil genético de *Salmonella*, contribui para melhor compreensão do patógeno (DE MELO *et al.*, 2021; WEBBER *et al.*, 2019), assim como, entender a

epidemiologia dos sorovares é essencial para controlar e evitar sua disseminação (FERRARI *et al.*, 2019). Por esse motivo, o intuito dessa pesquisa foi avaliar os perfis genotípico e fenotípico de virulência e de resistência aos antimicrobianos de *S. Thompson*, visando estabelecer critérios para melhorar as estratégias de prevenção e controle desse sorovar na cadeia avícola.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar perfil genotípico e fenotípico de virulência e resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* Thompson de diferentes setores da cadeia avícola de uma empresa de grande porte.

### **2.2 Específicos**

- I) Verificar o perfil fenotípico através do teste de suscetibilidade das estirpes de *Salmonella* Thompson de diferentes setores da empresa e determinar a frequência da suscetibilidade;
- II) Verificar o perfil genotípico (expressão de genes de resistência a antibióticos e virulência) das estirpes de *Salmonella* Thompson dos diferentes setores da empresa, determinando a frequência e correlacionando com perfil fenotípico encontrado;
- III) Diferenciar estirpes de *Salmonella* Thompson quanto à variabilidade dos padrões de restrição molecular por PFGE através do dendograma gerado;
- IV) Avaliar a patogenicidade das estirpes em frangos de corte para compreender a invasão em órgãos e excreção do patógeno;

### **3 AVALIAÇÃO DE FATORES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *SALMONELLA THOMPSON* NA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

#### **Autores**

Stahlhofer, Sabine Rippel<sup>ac</sup>; Lopes, Priscila Diniz<sup>b</sup>; Peripolli, Vanessa<sup>d</sup>; Milllezi, Alessandra Farias<sup>d</sup>.

<sup>a</sup> Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal, Instituto Federal Catarinense (IFC), Araquari, Brasil; <sup>c</sup> Médica Veterinária, Seara Alimentos, São José, Brasil, <sup>b</sup> Doutor(a) Universidade Estadual Paulista (UNESP); <sup>d</sup> Pesquisador(a) e Docente, Instituto Federal Catarinense (IFC), Brasil.

#### **3.1 Introdução**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, *Salmonella* é um dos mais importantes patógenos zoonóticos, com amplo impacto econômico na saúde dos animais e humanos (YANG *et al.*, 2014). No Brasil, entre os dez agentes identificados em surtos de doenças transmitidas por alimentos, observa-se que *Salmonella* foi o segundo agente mais identificado, no período de 2009 a 2018 (BRASIL, 2019). Alguns sorotipos são bastante estudados, entre eles *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, porém, outros são menos investigados, como por exemplo *S. Thompson* (SHAH *et al.*, 2017) mas com uma importância significativa na saúde.

Conforme reportado pelos Laboratórios Nacionais de Serviços Veterinários dos Estados Unidos, entre 1968 e 2011, foram isoladas 5.408 cepas de *S. Thompson* de diferentes espécies animais, entre bovinos, suínos e frangos, sendo que 53% foram provenientes das aves, demonstrando que este sorovar é mais comumente isolado dessa espécie e menos frequente em outras espécies de animais. (CDC, 2013).

Na União Europeia, *S. Thompson* é um dos 20 principais sorovares que infectam humanos (KOUTSOUMANIS *et al.*, 2019). No Canadá, entre 2015 e 2017, *S. Thompson*

esteve entre os 4 sorotipos mais frequentemente identificados em surtos de *Salmonella* reportados na cidade de Toronto, estando envolvido com 13,22% dos surtos (VARGA *et al.*, 2020). Além disso, em 2015 foi apontado no relatório de vigilância dos isolados humanos do Sistema Nacional de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana (NARMS), a resistência de isolados de *S. Thompson* frente a estreptomicina.

O aumento da resistência bacteriana frente aos antimicrobianos é uma ameaça global significativa tanto para a saúde pública, segurança dos alimentos e para o desenvolvimento econômico. Estima-se que 700.000 pessoas morrem todos os anos por infecções provocadas por agentes resistentes a antimicrobianos e um número incontável de animais doentes pode não estar respondendo aos tratamentos. (FAO, 2020). O uso de antibióticos na avicultura e a pressão de seleção de bactérias resistentes têm sido assuntos de vários estudos (RAHMANI *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014; ZOU *et al.*, 2010). No contexto da resistência aos antibióticos, as bactérias podem ser naturalmente resistentes a certos agentes, mas também podem obter ou disseminar os genes de resistência horizontalmente, como por meio da troca genética entre plasmídeos, fagos lisogênicos e o cromossomo bacteriano (WÓJCICKI *et al.*, 2021). Estes mesmos mecanismos de trocas genéticas entre as bactérias podem conferir vantagens adaptativas e selecionar características que permitem o crescimento e a sobrevivência de *Salmonella* no hospedeiro (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017; ROGERS; TSOLIS; BÄUMLER, 2021).

Os fatores predominantes que determinam o potencial patogênico de *Salmonella* estão diretamente relacionados com os mecanismos moleculares envolvidos com a capacidade de invadir e replicar-se dentro das células do hospedeiro, assim como resistir à destruição por componentes fagocíticos ou componentes do complemento plasmático (DE MELO *et al.*, 2021; LENITA MOURA, 2020; RIBEIRO TIBACASAS *et al.*, 2021). No cromossomo de *Salmonella*, existem locais específicos chamados de Ilhas de Patogenicidade (IPs), onde determinados genes ligados à

infecção estão agrupados e os fatores de virulência são codificados. As IPSs codificam diferentes funções, que, em grande parte dependem do contexto ambiental em que a bactéria vive. Esses genes conferem vantagens para as bactérias, como adaptação à célula hospedeira, resistência aos antimicrobianos e a capacidade de superar mecanismos de defesa do hospedeiro (FOLEY *et al.*, 2013; GAL-MOR; FINLAY, 2006; ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017; VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

O controle de *Salmonella* em granjas de frango não é uma tarefa simples, em função da existência de muitas fontes possíveis de contaminação, como vetores, ração e água, cama, transporte, pessoas (BAILEY *et al.*, 2001). Nesse contexto, vale ressaltar que, medidas de biossegurança são importantes para o controle do agente. Porém, conhecer o perfil genético de *Salmonella*, contribui para melhor compreensão das características do patógeno (WEBBER *et al.*, 2019), assim como, entender a epidemiologia dos sorovares é essencial para controlar e evitar a disseminação (FERRARI *et al.*, 2019). Por esse motivo, o intuito dessa pesquisa foi avaliar os perfis fenotípico e genotípico de virulência e de resistência aos antimicrobianos de *S. Thompson*, visando estabelecer critérios para melhorar as estratégias de prevenção e controle desta bactéria na cadeia avícola.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Etapa *in vitro***

#### **3.2.1.1 Seleção e tipificação dos isolados**

Foram selecionadas 44 estirpes de *Salmonella* Thompson isoladas de diferentes materiais, sendo 25 provenientes de suabes de arrasto de cama de aviários, três de *pool* de órgãos de frangos, 15 de chifonetes de ambiente e uma de matéria prima de rações. As amostras foram provenientes de diversos setores da cadeia avícola de uma empresa, entre o período de 2017 e 2021, dos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo.

As amostras foram recuperadas da coleção de cepas dos laboratórios, onde estavam conservadas em tubos criogênicos contendo meio de cultura Ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI, Merk, Alemanha) e glicerol 10%, armazenadas a temperatura de -20 ° C. Para ativação das cepas, as amostras foram repassadas do meio estoque para caldo BHI (Merk, Alemanha) e incubadas a uma temperatura de 37 °C por 18 a 24 horas. Em seguida foram estriadas em ágar Hektoen (Merk, Alemanha), para verificação da morfologia e pureza das colônias. Os sorovares das 44 amostras foram confirmados através da metodologia Premi®Test *Salmonella*, conforme descrito por Wattiau *et al.*, (2008).

#### 3.2.1.2 Análise de susceptibilidade aos antimicrobianos (disco-difusão)

Os testes de susceptibilidade, bem como a comparação dos resultados com o padrão dos relatórios, foram realizados de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals* (CLSI, 2018) e *Comité de l'Antibiogramme* (CASFM, 2018). Foram avaliados 12 antimicrobianos em discos (Oxoid, Reino Unido), sendo eles, Amoxicilina (10 µg), Canamicina (30 µg), Ceftiofur (30 µg), Colistina (50 µg), Enrofloxacina (5 µg), Fosfomicina (50 µg), Gentamicina (10 µg), Neomicina (30 µg), Norfloxacina (10 µg), Sulfonamidas (300 µg), Tetraciclina (30 µg) e Cloranfenicol (30 µg). Os discos foram dispensados sobre a placa de ágar *Mueller Hinton* após a semeadura dos isolados, padronizados na turbidez de uma solução padrão de escala *McFarland* 0,5, em duplicata. Em seguida, as placas foram incubadas por 24h a temperatura de 36°C e por fim realizada a leitura dos halos formados para análise de suscetibilidade. *Escherichia coli* ATCC 25922 foi usado como cepa de controle para o desempenho do teste.

#### 3.2.1.3 Análise de expressão gênica de virulência e resistência aos antimicrobianos

A caracterização molecular dos isolados de *S. Thompson* foi realizada através de RT-qPCR.

Foram realizadas análises qualitativas (presença/ausência) de cinco genes de virulência, *iron*, *sipA*, *lpfC*, *spvB* (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006) e *sopE* (PRAGER *et al.*, 2003) e 6 genes de resistência a antibióticos *tetA*, *tetB*, *tetC*, (FONSECA *et al.*, 2006) *sul1*, *sul2* (RANDALL *et al.*, 2004) e *sul3* (BOERLIN *et al.*, 2005). O gene 16sRNA foi usado como gene de referência, sendo as seguintes sequências dos oligonucleotídeos utilizadas como *primers* 5'-CAGAAGAAGCACCGGCTAACTC-3' (*foward*) e 5'-GCGCTTTACGCCCCAGTAATT-3' (*reverse*) (BOTTELDOOM *et al.*, 2006). Os genes alvos foram detectados através do uso de iniciadores (*primers*) descritos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: *Primers* para detecção de genes de virulência em *Salmonella* Thompson e função dos genes

Gene	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	Função gene
<i>lpfC</i>	F: GCCCGCCTGAAGCCTGTGTTGC R: AGGTCGCCGCTGTTGAGGTTGGATA	Invasão células do hospedeiro
<i>sopE</i>	F: ACACACTTTCCACGAGGAAGCG R: GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	Sistema de secreção tipo III
<i>iroN</i>	F: ACTGGCACGGCTCGCTGTCGCTCTAT R: CGCTTTACCGCGTTCTGCCACTGC	Metabolismo ferro
<i>sipA</i>	F: CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG R: CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	Sobrevivência macrófago
<i>spvB</i>	F: CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA R: GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	Sobrevivência intracelular

Tabela 2: *Primers* para detecção de genes de resistência antimicrobianos em *Salmonella* Thompson

Gene	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	Resistência
<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	Tetraciclina
<i>tetB</i>	F: TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGGCAATAACACCG	
<i>tetC</i>	F: CTTGAGAGCCTTCAACCCAG R: ATGGTCGTCATCTACCTGCC	



<i>su/1</i>	F: TCACCGAGGACTCCTTCTTC R: AATATCGGGATAGAGCGCAG	
<i>su/2</i>	F: CGGTCCGGCATCCAGCAATCC R: CGAGAGCCACGACCGCGCC	Sulfonamidas
<i>su/3</i>	F: GAGCAAGATTTTTGGAATCG R: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTGGA	

As 44 estirpes de *Salmonella* Thompson foram recuperadas de acordo com o descrito no item 3.2.1.1 e posteriormente submetidas a técnica RT-qPCR.

A extração total de RNAm foi realizada pela tecnologia de partículas magnéticas para a purificação de ácido nucleico, utilizando um aparelho de extração automática de ácidos nucleicos (Indimag48, Indical Biosense, Alemanha) conforme procedimento indicado pelo fabricante do Indimag® Pathogen Kit (Indical Biosense, Alemanha). O RNA purificado foi analisado e quantificado utilizando um espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), consistindo na quantificação mínima de 38 e máxima de 52 ng/ µL amostra, e na qualidade do RNAm livre de proteínas.

Para a síntese do cDNA, a transcriptase reversa foi realizada conforme procedimento descrito no kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen, EUA). A preparação da reação foi feita usando 27 ng de RNA (5 µL), 10 µL de QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix, 1 µL de cada *primer*, 3 µL água livre de DNase até um volume total de 20 µL para cada reação. Com o cDNA obtido, a análise de detecção dos genes ocorreu por qPCR no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América). Cada amostra foi realizada em triplicata. As condições de amplificação para os genes foram conforme descrito no kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR: 50°C por 10 minutos para etapa de transcrição reversa, 95°C por 2 minutos para etapa de ativação inicial, 40 ciclos de desnaturação 95°C por 5 segundos, anelamento e extensão 60°C por 10 segundos. Finalizada a análise, foi realizada a avaliação da curva de Melting. A distribuição das frequências da presença ou não dos genes de resistência e virulência das estirpes avaliadas foram analisadas.

#### 3.2.1.4 Detecção molecular e identificação dos genes de resistência a colistina e betalactâmicos pela técnica de microarranjo *Check-MDR*

Para esta análise, as estirpes de *Salmonella* Thompson foram recuperadas de acordo com o descrito no item 3.2.1.1 e posteriormente submetidas a técnica de Check-Points *Check-MDR CT103XL* de acordo com as recomendações do fabricante (*Check-Points B.V. Wageningen, Holanda*).

A extração de DNA das amostras previamente isoladas foi realizada utilizando o kit de extração manual *QIAamp DNA mini kit* (*Qiagen, Alemanha*), conforme procedimento descrito abaixo.

##### 3.2.1.4.1 Extração de DNA

As etapas da extração manual do DNA consistiram nas etapas de lise, ligação, lavagem e eluição. A primeira etapa teve finalidade de lise celular para obtenção do DNA, então foi adicionado em tubo de 1,5 ml uma solução tampão de lise juntamente com 20 µL de proteinase K e a amostra. Em seguida, a solução foi incubada a temperatura de 56°C por 30 a 60 minutos em termobloco. Após esta etapa, foi adicionado ao tubo 200 µL de solução tampão e 200 µL etanol absoluto. Todo o volume foi transferido para a coluna disponibilizada pelo kit, onde ocorreu a ligação dos ácidos nucleicos a coluna. Em seguida foram realizadas lavagens para que os contaminantes fossem removidos e somente os ácidos nucleicos permanecessem na coluna. Enfim, para a eluição da amostra foi adicionada a solução o tampão de eluição (500 µl) e o tubo foi incubado em temperatura de 15 a 25 °C por 5 minutos, centrifugado e por fim o eluido obtido foi diluído cinco vezes em água pura.

##### 3.2.1.4.2 *Check MDR* – microarranjo

Os isolados de *S. Thompson* foram avaliados molecularmente pela técnica de microarranjo, para os genes de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos e

colistina (Tabela 3). A análise foi realizada de acordo com o protocolo recomendado no manual do usuário do Check-MDR CT103XL (Check-Points B.V. Wageningen, Holanda).

Tabela 3: Genes de resistência antimicrobiana detectados pela técnica de microarranjo *Check-MDR CT103XL*.

<b>Carbapenamases (<i>bla</i>)</b>	<b>ESBLs (<i>bla</i>)</b>	<b>Minor ESBL:</b>	<b>AMPCs</b>	<b>MCR</b>
GES	CTX-M-1 group	BEL	ACC	MCR 1-2
GIM	CTX-M-1 subgroup	GES	ACT/MIR	
IMP	CTX-M-2 group	PER	CMY I/MOX	
KPC	CTX-M-3 subgroup	VEB	CMY II	
NDM	CTX-M-8 group		DHA	
OXA-23	CTX-M-9 group		FOX	
OXA-24	CTX-M-15 subgroup			
OXA-48	CTX-M-25 group			
OXA-58	CTX-M-32 subgroup			
VIM	TEM wt			
SPM	TEM 104K			
	TEM 164C			
	TEM 164H			
	TEM 164S			
	TEM 238S			
	SHV wt			
	SHV 238A			
	SHV 238S			
	SHV 240K			

Legenda: ESBL: betalactamase de espectro estendido; AMPC: genes de betalactamase tipo *AmpC*; MCR: resistência a colistina.

### 3.2.1.5 Análise de PFGE

Foi realizada a análise de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para os 44 isolados, seguindo protocolo PulseNet, segundo Ribot et al (RIBOT *et al.*, 2006), com modificações. A restrição do DNA foi realizada utilizando 10 U/ $\mu$ L da enzima XbaI por amostra (Thermo Scientific) seguidos por PFGE, usando o sistema CHEF DR III Power Module (Bio-Rad Laboratories, EUA). Uma cepa de *Salmonella* Braenderup H9812 foi utilizada como padrão. Os fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 1,2% (Bio-Rad,) com um tempo de comutação inicial de 2,2 s e um tempo de comutação final de 63,8 s a 6 V/s por 22 h. Os géis foram corados em brometo de etídio (1  $\mu$ g/mL) e visualizados na cabine de luz ultravioleta modelo Pro-tools, (Pró-análise, Brasil).

As imagens foram capturadas pelo sistema de fotodocumentação L-PIX (Locus Biotecnologia) e os padrões de macrorrestrição calculados utilizando o *software* Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). O dendograma gerado foi analisado por agrupamento, comparando os padrões de bandas usando o método de grupos de pares ponderados com médias aritméticas (UPGMA). A similaridade foi calculada pelo coeficiente de Dice com tolerância de 1,5%.

### 3.2.2 Infecção experimental

#### 3.2.2.1 Avaliação da patogenicidade

O projeto foi submetido para avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IFC campus Araquari -SC, obtendo aprovação e sendo certificado com número de protocolo 375/2021.

Após avaliação genotípica do PFGE, foram selecionadas cinco cepas, dos *clusters* A, B, C, D e, para a avaliação de patogenicidade. Foram utilizados 150 frangos de corte de um dia de idade distribuídas em 6 isoladores de pressão negativa, temperatura do ambiente controlada e livres de *Salmonella* sp. O fornecimento de ração e água foi sem restrições durante todo o período do experimento. Ao 5º dia de idade, 5 grupos de frangos foram desafiados com 1 ml do inóculo contendo  $1 \times 10^8$

UFC/mL de seus respectivos isolados de *S. Thompson*, por via oral, diretamente no papo, utilizando agulhas de gavagem. Um grupo de frango não foi desafiado (controle negativo). Foram coletadas amostras de papo, fígado, baço e conteúdo cecal aos 3, 7, 10, 17 e 24 dias pós-infecção (dpi) para isolamento e quantificação de *S. Thompson* em placa utilizando a técnica de contagem de microgotas descrita por Miles e Misra (MILES; MISRA; IRWIN, 1938). Fragmentos de papo, coração, fígado, baço e ceco foram coletados neste mesmo intervalo de tempo para avaliação histopatológica. Foram coletadas amostras de suabes cloacais (1 suabe para 2 aves, totalizando 10 aves), no dia do alojamento dos pintinhos e aos 6, 15, 21 e 23 dpi para detecção de *S. Thompson*.

#### 3.2.2.2 Análises estatísticas

A contagem bacteriana foi analisada com o modelo geral linearizado (GENMOD) com distribuição de Poisson considerando o efeito do tratamento (controle e cepas), dos órgãos ( fígado, baço, papo e intestino) e a interação entre tratamento e órgão (tratamento x órgão). Os efeitos principais de tratamento e órgão, bem como suas interações, foram avaliados a um nível de significância de 5% e as médias comparadas pelo teste de Boferroni. A função de link utilizada foi a log. Os dados foram analisados usando o *software Statistical Analysis System* (SAS Inst. Inc., Cary, NC, versão 9.4). As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Fenótipos de susceptibilidade antimicrobiana

A distribuição das frequências das respostas da análise de sensibilidades das estirpes frente aos antimicrobianos foi avaliada (Tabela 4). O número de isolados sensíveis (81,82%) foi superior ao de isolados resistentes (18,18%). Em relação a resistência intermediária, houve um isolado para Enrofloxacino (2,27%), 11 isolados para Neomicina (25%), 11 para Sulfonamidas (25%) e três isolados para Tetraciclina (n=44; 6,82%). Foi observada resistência a compostos de duas classes de

antimicrobianos, as sulfonamidas (15,91%) e as tetraciclina (2,27%). Todos os isolados foram suscetíveis a Amoxicilina, Canamicina, Ceftiofur, Colistina, Enrofloxacina, Fosfomicina, Gentamicina, Neomicina, Norfloxacina e Cloranfenicol.

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *Salmonella* Thompson avaliados.

Princípio ativo	Sensível	Intermediário	Resistente
Amoxicilina	44	0	0
Canamicina	44	0	0
Ceftiofur	44	0	0
Colistina	44	0	0
Enrofloxacino	43	1	0
Fosfomicina	44	0	0
Gentamicina	44	0	0
Neomicina	33	11	0
Norfloxacino	44	0	0
Sulfonamidas	26	11	7
Tetraciclina	40	3	1
Cloranfenicol	44	0	0

Além disso, um isolado (2,22%) foi resistente a dois compostos, sulfonamida e tetraciclina.

Quando avaliado o percentual de cepas resistentes em cada setor da cadeia, observa-se maior resistência no setor de frango de corte (4,35% para tetraciclina e 17,39% para sulfonamida) em comparação com o setor dos Incubatórios (16,67% para sulfonamida) e matrizes (11,11% para sulfonamida).

### 3.3.2 Expressão gênica

Seis genes (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *su1*, *su2* e *su3*) que codificam resistência a duas classes de antimicrobianos (Tetraciclina e Sulfonamidas) foram detectados por RT-qPCR. A presença ou ausência dos genes nas amostras testadas está discriminada na Tabela 5. Os genes de resistência a *tetA*, *su1* e *su2* estavam presentes na maioria das amostras (97,73%, 79,55% e 86,36%, respectivamente). A presença do gene *su3* não foi detectada em nenhuma amostra.

Tabela 5: Presença ou ausência dos genes de resistência antimicrobianos nos isolados de *Salmonella* Thompson.

Genes de resistência	S. Thompson	
	n=44	%
<i>tetA</i>	43	97,73
<i>tetB</i>	6	13,64
<i>tetC</i>	19	43,18
<i>sul1</i>	35	79,55
<i>sul2</i>	38	86,36
<i>sul3</i>	0	0

Os genes de virulência *iron*, *spiA*, *lpfC*, *spvB* e *sopE* foram detectados por RT-qPCR. A frequência de detecção de cada genes nas amostras testadas está discriminada na Tabela 6.

Do total de 44 amostras, 26 (59,09%) apresentaram um ou mais genes de virulência, sendo que 15 (34,09%) apresentaram pelo menos um gene, 9 (20,45%) apresentaram 2 genes e 2 (4,55%) apresentaram 3 genes de virulência.

Tabela 6: Frequência detecção genes de virulência S. Thompson

Frequência de genes de virulência	S. Thompson	
	n=44	%
<i>iroN</i>	20	45,45
<i>lpfC</i>	8	18,18
<i>sopE</i>	6	13,64
<i>spiA</i>	4	9,09
<i>spvB</i>	1	2,27

### 3.3.3 Detecção Molecular e Identificação de genes de resistência a carbapenemase, colistina e beta lactâmicos

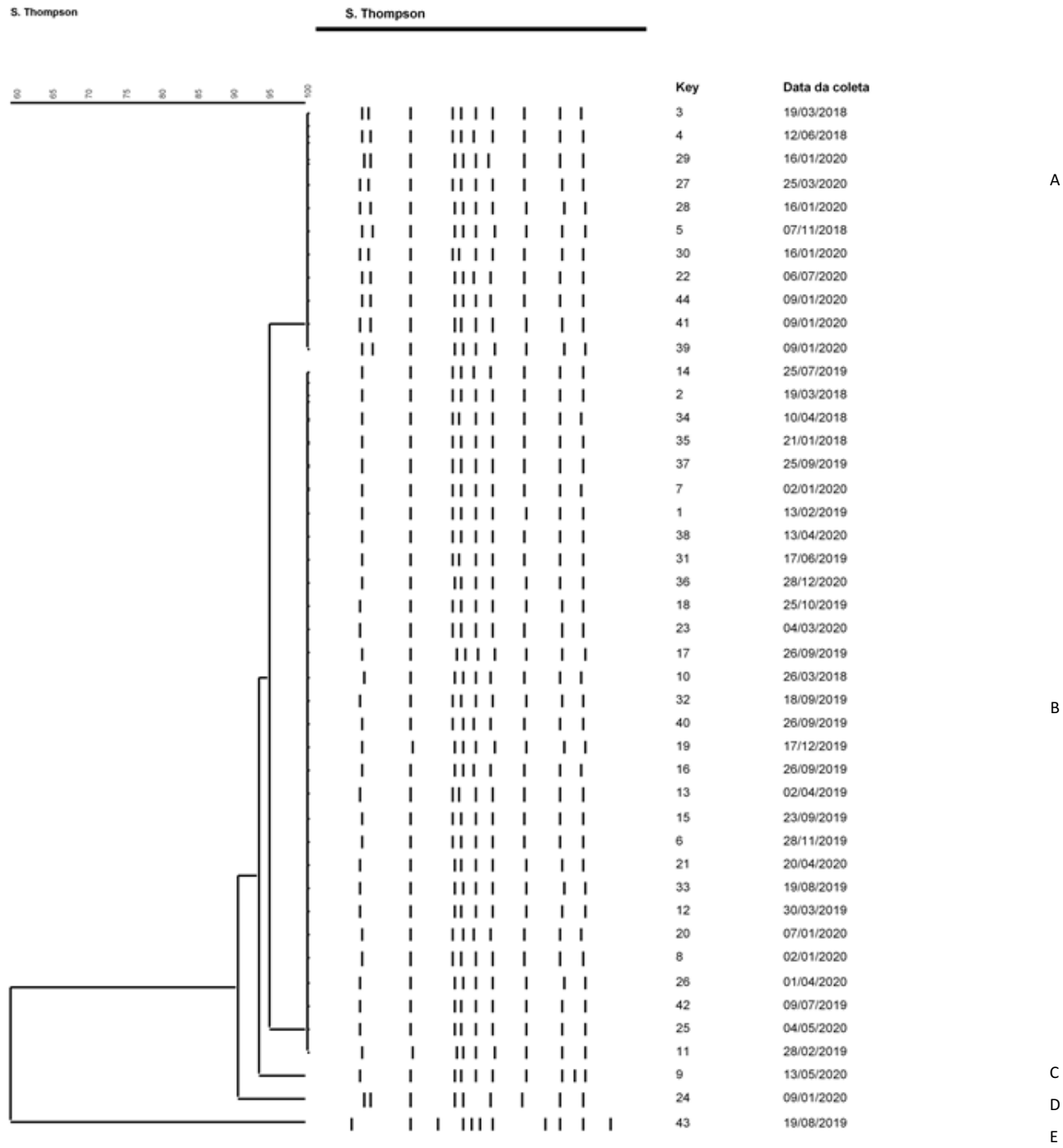
Em relação a análise da detecção molecular e identificação dos genes pela técnica de microarranjo Check-MDR CT103XL, foi encontrada uma estirpe com resistência ao gene CTX-M-1, da classe dos antibióticos ESBL e uma estirpe resistente ao gene *bla*<sub>OXA-48</sub>, da classe de antimicrobianos carbapenêmicos.

#### 3.3.4 Análise de PFGE

Foi realizado a tipagem molecular dos isolados pela técnica de PFGE. O dendrograma gerado se encontra na Figura 1. Observa-se que houve pouca variabilidade genética entre os 44 isolados, formando 5 padrões de PFGE não clonais. Dos 5 padrões, os *clusters* C, D e possuem apenas um isolado. O *cluster* A possui 11 isolados clonais e o *cluster* B possui 30 isolados clonais.



Figura 1: Dendrograma com padrões de bandas obtidas pelo PFGE aplicado em isolados de *Salmonella* Thompson.



### 3.3.5 Avaliação da patogenicidade

#### 3.3.5.1 Excreção cloacal

Em relação a excreção da *S. Thompson* via cloaca, observou-se que a excreção foi maior no 6º dia pós infecção (95,65%) considerando todas as estirpes inoculadas, e no 23º dpi houve um decréscimo de 25,65%.

Em relação a excreção da *S. Thompson*, considerando todo o período do desafio, observou-se que a estirpe A teve um percentual maior de excreção (94,12%) e a estirpe B teve um percentual menor de excreção (78,95%), sendo que as estirpes C, D e E tiveram o mesmo percentual de excreção (88,84%).

#### 3.3.5.2 Isolamento em órgãos

Observou-se que o percentual de recuperação da *S. Thompson* foi maior no intestino, onde foi recuperada em todos os dias pós infecção e de todos os grupos de frangos avaliados, seguido do papo, baço e fígado, respectivamente, conforme demonstrado na Figura 2.

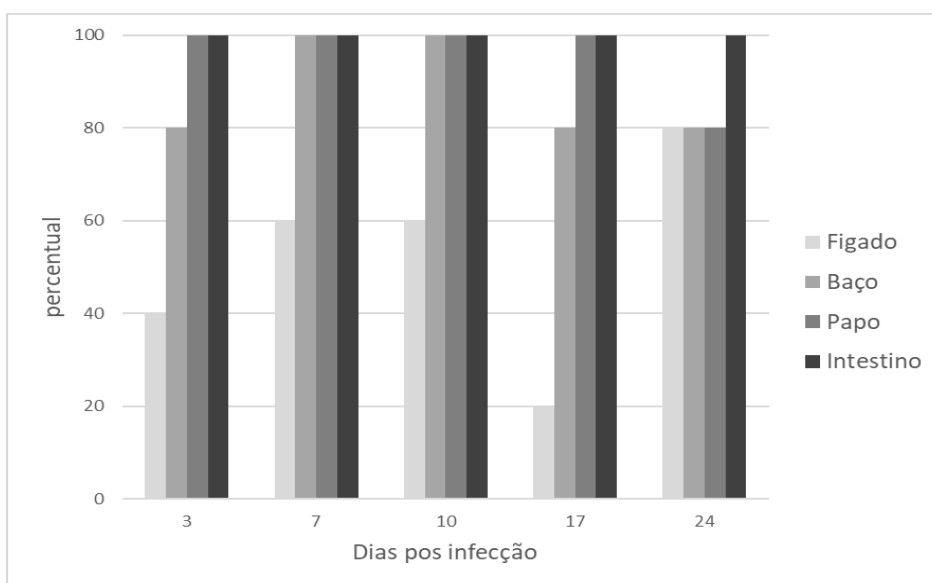


Figura 2: Percentual de recuperação das estirpes inoculadas em frangos por dia pós infecção e por órgão avaliado.

Em relação a contagem da carga bacteriana, os resultados se encontram na Tabela 7.

Tabela 7: Quantificação da carga bacteriana no 3º, 7º, 10º, 17º e 24º dia pós infecção em órgãos

Tratamento	Órgão				Média	DP
	Baço	Fígado	Papo	Intestino		
<i>Dia 3</i>						
Controle	0aA	0aA	0aC	0aB	0	-
Cepa 1	0bA	0bA	1,83bABC	7,83aA	2,42	3,50
Cepa 2	0,40bA	0bA	0,69bBC	7,83aA	2,23	3,44
Cepa 3	0,86bA	0,86bA	4,13abAB	7,10aA	3,24	3,15
Cepa 4	1,79bA	1,11bA	2,55bABC	8,28aA	3,43	3,20
Cepa 5	1,80bcA	0cA	4,61abA	6,63aA	3,26	3,13
Média	0,80	0,32	2,31	6,28		
DP	1,65	0,88	2,38	3,06		
Pr>F						
Tratamento × órgão	<0,001					
<i>Dia 07</i>						
Controle	0aA	0aA	0aA	0aB	0	-
Cepa 1	0,46bA	0,40bA	1,32bA	7,19aA	2,34	3,10
Cepa 2	0,52cA	0,69cA	3,86bA	7,87aA	3,18	3,34
Cepa 3	0,86cA	0cA	3,05bA	7,67aA	2,89	3,19
Cepa 4	2,33bA	1,57bA	1,26bA	7,48aA	3,10	2,83
Cepa 5	1,91bA	0bA	3,46abA	7,58aA	3,23	3,54
Média	1,01	0,40	2,15	6,26		
DP	1,68	0,95	2,37	2,87		
Pr>F						
Tratamento × órgão	0,002					
<i>Dia 10</i>						
Controle	0aA	0aA	0aA	0aB	0	-
Cepa 1	0,40bA	0,40bA	1,76bA	7,76aA	2,57	3,66
Cepa 2	0,91cA	0cA	3,52bA	6,61aA	2,75	2,87
Cepa 3	0,96bA	0bA	1,16bA	8,23aA	2,58	3,50
Cepa 4	1,31bA	0,40bA	1,38bA	6,05aA	2,28	2,72
Cepa 5	0,40bA	0,56bA	0,86bA	8,0aA	2,45	3,41
Média	0,66	0,22	1,44	6,10A		
DP	1,29	0,69	2,05	3,05		
Pr>F						
Tratamento × órgão	0,067					

<i>Dia 17</i>						
Controle	0aA	0aA	0aB	0aB	0	-
Cepa 1	0,40bA	0,40bA	0,80bAB	4,84aA	1,61	2,67
Cepa 2	1,01bA	0bA	2,16bA	7,04aA	2,55	3,23
Cepa 3	1,74bcA	0cA	2,32bA	7,91aA	2,99	3,17
Cepa 4	0cA	0cA	2,20bA	6,94aA	2,28	2,92
Cepa 5	0,8bA	0bA	1,2bAB	7,02aA	2,25	2,96
Média	0,65	0,06	5,62	1,44		
DP	1,15	0,36	3,26	1,16		
Pr>F						
Tratamento × órgão	<0,001					
<i>Dia 24</i>						
Controle	0aA	0aA	0aA	0aA	0	-
Cepa 1	0,8aA	0,4aA	0aA	3,10aA	1,07	2,40
Cepa 2	0,86aA	0,4aA	0,97aA	3,90aA	1,53	2,39
Cepa 3	0,99aA	0,46aA	0,40aA	2,95aA	1,20	2,31
Cepa 4	1,36aA	0,4aA	0,73aA	4,38aA	1,71	2,65
Cepa 5	0aA	0aA	2,71aA	1,46aA	1,04	2,56
Média	0,66	0,27	0,80	2,63		
DP	1,04	0,71	1,88	3,55		
Pr>F						
Tratamento × órgão	<0,001					

Pr>F: probabilidade, DP: desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes na coluna e letras minúsculas diferentes na linha diferem pelo teste de Bonferroni a 5% (P<0,05).

Observou-se maiores cargas bacterianas para intestino em relação aos demais órgãos analisados em todas as cepas analisadas no 3º, 7º, 10º e 17º dpi. No 3º dpi as maiores cargas encontradas foram no papo (cepa 3 e cepa 5) e no 17º dpi no papo (cepa 2, cepa 3 e cepa 4). No 7º, 10º e 24º dpi não houve diferença estatística na quantificação de carga bacteriana entre as diferentes cepas.

### 3.3.5.2 Alterações microscópicas:

As coletas para a análise histopatológica ocorreram conforme descrito no item 3.2.2.1 e as alterações microscópicas induzidas pelas estirpes de *S. Thompson* foram observadas principalmente em fígado e tonsilas cecais (Tabela 8).

Tabela 8: Lesões microscópicas observadas em frangos experimentalmente infectados por *Salmonella* Thompson.

<b>Dias pós-inoculação</b>	<b>Papo</b>	<b>Fígado</b>	<b>Baço</b>	<b>Coração</b>	<b>Tonsilas cecais</b>
<b>3 DPI</b>	Descamação epitelial discreta	Infiltrado inflamatório mononuclear periportal	N.D.N	N.D.N	N.D.N
<b>7 DPI</b>	N.D.N	N.D.N	N.D.N	Hemorragia leve no endocárdio	Hemorragia focal leve a moderada
<b>10 DPI</b>	N.D.N	Dissociação dos hepatócitos e edema multifocal leve	Serosite heterofílica leve	Hemorragia leve	Abscessos dentro de criptas grau leve, serosite mista multifocal leve e tiflíte de origem bacteriana
<b>17 DPI</b>	Severa adesão de bastonetes ao epitélio	Colangiohepatite heterofílica leve	N.D.N	Hemorragia leve	N.D.N
<b>24 DPI</b>	N.D.N	Colangiohepatite discreta multifocal leve	N.D.N	N.D.N	Hemorragia focal leve

Legenda: N.D.N: nada digno de nota.

No 3º dpi, foi encontrado Infiltrado inflamatório mononuclear periportal no fígado e descamação epitelial discreta no papo de duas aves do grupo três. Neste mesmo período, descamação epitelial discreta no papo foi encontrada em todas as aves do grupo quatro. No 7º dpi, foi encontrado hemorragia focal leve em tonsilas cecais de duas aves do grupo um. Em uma ave do grupo dois foi observado hemorragia focal moderada em tonsilas cecais e hemorragia leve no endocárdio em uma ave do

grupo três. No 10º dpi, foi observado dissociação dos hepatócitos e edema multifocal leve no fígado e serosite heterofilica leve no baço de uma ave do grupo três. As lesões encontradas nas tonsilas cecais dessa mesma ave foram abscessos dentro de criptas grau leve, serosite mista multifocal leve e tiflíte de origem bacteriana. Em uma ave do grupo três e outra do grupo cinco, foi observado hemorragia leve no endocárdio. No 17º dpi foi observado colangiohepatite heterofílica leve no fígado de uma ave do grupo dois e severa adesão de bastonetes ao epitélio do papo em uma ave do grupo um. Também observado hemorragia leve no endocárdio em uma ave do grupo quatro. No 24º dpi foi encontrado colangiohepatite discreta multifocal leve no fígado de uma ave do grupo quatro e hemorragia focal leve em tonsilas cecais em duas aves do grupo um e duas aves do grupo dois.

### **3.4 Discussão**

Compreender o efeito da resistência adquirida na fisiologia bacteriana é relevante para o desenvolvimento de estratégias mais precisas para combater infecções (MARTÍNEZ; ROJO, 2011). No contexto da resistência aos antibióticos, os genes podem ser obtidos ou disseminados horizontalmente, por meio da troca genética entre o plasmídeo e o cromossomo bacteriano. A integração desses genes dentro dos elementos genéticos especializados desempenham importante papel na aquisição e disseminação genética (NABI, 2017).

Após análise dos resultados do teste de disco difusão, a análise de expressão gênica foi direcionada para os genes *sul1*, *sul2*, *sul3*, *tetA*, *tetB* e *tetC*, referentes aos princípios ativos sulfonamida e tetraciclina, os quais a resistência fenotípica foi observada.

Os perfis genotípico e fenotípico de resistência à sulfonamida e à tetraciclina não foram 100% concordantes, ou seja, todas estirpes apresentaram resistência genotípica a pelo menos um gene de cada classe de antimicrobianos testado, porém no teste fenotípico a grande maioria (81,82%) das estirpes foram sensíveis a estes compostos.

Na maioria das vezes, a resistência se expressa em todas as células da população bacteriana. Porém, em alguns casos, o fenótipo de resistência é expresso apenas por algumas células de uma população bacteriana clonal (fenômeno denominado heterorresistência). Esse resultado possivelmente pode ser explicado pela heterorresistência de *Salmonella*. Essa subpopulação pode ser o resultado de raros mutantes resistentes que aumentam em frequência ao longo do tempo, ou das subpopulações distintas (sensível e resistentes) que alternam fenotipicamente mesmo na ausência de antibióticos (BAKKAREN et al, 2020). A subpopulação, aparentemente isogênica, pode exibir uma gama de suscetibilidade a um antimicrobiano específico. A bactéria pode possuir o gene relacionado à resistência, mas nem todas o expressam fenotipicamente da mesma maneira (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015).

Além disso, outro fator que pode estar relacionado a essa não correlação é a resistência transitória e reversível ligada ao estado fisiológico da bactéria frente a ambientes desfavoráveis ou de estresse. O estudo dos mecanismos de resistência fenotípica é relevante para compreender as razões das falhas terapêuticas frente as bactérias classificadas como sensíveis (CORONA; MARTINEZ, 2013).

Ainda em relação a resistência fenotípica, apenas uma estirpe foi resistente a 2 compostos, porém, não foi classificado como Multi Droga Resistente (MDR), pois para isso deveria exibir resistência a três ou mais classes antimicrobianas (MAGIORAKOS et al., 2012). De acordo com relatos dos estudos de Lestari et. al (2009) e Shah et. al (2017) os dados sugerem que é improvável que MDR seja comum entre *S. Thompson* isoladas de frangos dos Estados Unidos, corroborando com os dados do presente estudo.

Em relação a análise da detecção molecular e identificação dos genes pela técnica de microarranjo *Check-MDR CT103XL*, foi encontrada uma estirpe com resistência ao gene *bla<sub>CTX-M-1</sub>* do tipo de resistência ESBL e uma estirpe resistente ao gene *bla<sub>OXA-48</sub>*, do tipo de resistência a carbapenemase. A estirpe ESBL também foi a única que foi observada a presença dos três genes de resistência as tetraciclinas *tetA*,

*tetB* e *tetC*. O resultado do presente estudo corrobora com De Jong et al., (2014) assim como Valentin et al. (2014). Estes autores identificaram que a maioria das bactérias ESBL em frangos são *E. coli* e *Salmonella* spp., sendo que o gene de resistência do tipo ESBL mais frequentemente detectado em frangos é o gene *bla*<sub>CTX-M</sub>. Uma alta similaridade foi observada entre os plasmídeos que codificam *bla*<sub>CTX-M-1</sub> isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp. de origem avícola, o que leva a crer na capacidade que as bactérias tem em transferir genes que codificam essa resistência (SALIU; VAHJEN; ZENTEK, 2017). Este mesmo gene foi detectado pela técnica do microarranjo aplicada no presente estudo.

Nos resultados obtidos a partir do dendrograma gerado, foram identificadas cinco fazendas com a distribuição de estirpes em diferentes *clusters*, sendo três fazendas com estirpes em dois *clusters* distintos e duas fazendas com estirpes em três *clusters* distintos. Esse achado pode ser resultado de mutação genética sofrida pela *S. Thompson* a fim de se adaptar em diferentes condições ambientais (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017). Portanto, análises como o sequenciamento do genoma completo são necessárias para confirmar essa hipótese.

As estirpes alocadas nos *cluster* A, B, C e D, possuem similaridade genética menor que 90%. Observou-se também que a amostra alocada no *cluster* E é a que possui maior variabilidade genética (similaridade 57,1% em relação aos clusters A e C, 60% em relação ao cluster B e 50% em relação ao *cluster* D). O agrupamento B é o que se destaca por possuir maior número de isolados (65,91%) obtidos em diferentes datas, materiais e localização geográfica, sendo alguns pertencentes a mesma granja, outros não.

Considerando a alta similaridade genética entre as estirpes dos *clusters* A,B,C e D, considera-se a possibilidade de disseminação de um mesmo clone de *S. Thompson* pela cadeia agropecuária. Esses dados corroboram com estudo epidemiológico de Bailey et al (2001), onde *S. Thompson* foi um dos sorotipos mais identificados no estudo, principalmente no incubatório seguido de amostras de fezes, cama e suabe de



arrasto, indicando que a colonização de pintinhos com esse sorotipo provavelmente ocorreu no incubatório, demonstrando a capacidade de disseminação do agente.

Os fatores de virulência são codificados por vários genes e podem estar localizados no próprio cromossomo da bactéria. Essas moléculas podem estar presentes nas chamadas ilhas de patogenicidade, ou em elementos genéticos móveis (BERTELLI *et al.*, 2017; VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). As IPSs codificam diferentes funções, que, em grande parte dependem do contexto ambiental em que a bactéria vive (GAL-MOR; FINLAY, 2006). No pan-genoma de *Salmonella* existem 21 ilhas genômicas apontadas como IPSs. Destes, IPS-1 e IPS-2 foram amplamente caracterizados. Uma das funções da IPS-1 é a invasão das células epiteliais no trato intestinal, enquanto da IPS-2 está envolvida com a sobrevivência em macrófagos e disseminação sistêmica (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017).

É amplamente divulgado que quando esses genes estão presentes e especialmente quando a expressão gênica é induzida, eles conferem uma série de vantagens às bactérias como adaptação à célula hospedeira, resistência aos antimicrobianos e a capacidade de superar mecanismos de defesa do hospedeiro (COHEN *et al.*, 2020; GAL-MOR; FINLAY, 2006; ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017).

Os genes de virulência fimbrial desempenham um papel importante na patogenicidade bacteriana, uma vez que promovem a ligação bacteriana às células epiteliais intestinais (enterócitos) (BAHRAMIANFARD *et al.*, 2020; VAN DER VELDEN *et al.*, 1998). No presente estudo, foram analisados os genes fimbriais *lpfC*, onde 18,18% (oito amostras) apresentaram o gene (Tabela 6). No estudo de Skyberg, Logue e Nolan, (2006), os genes *lpfC* e *sifA* foram encontrados com frequência maior que 80% em isolados de aves.

A proteína SopE, é uma proteína efetora secretadas por T3SS que desempenha um papel parte importante na fase sistêmica da infecção por Salmonelose (RÖDER; HENSEL, 2020; VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). A SopE demonstrou estar envolvido em rearranjos do citoesqueleto de actina e no enrugamento da membrana. Como fator de

virulência frequentemente transferido por bacteriófagos, o gene *sopE* é codificado na IPS-I e foi identificado em isolados envolvidos em grandes epidemias (FOLEY et al., 2013; RÖDER; HENSEL, 2020). Em estudo realizado por Rahman et al, (2004), o gene *sopE* parece ser distribuído e conservado entre apenas alguns sorovares de *Salmonella* (Enteritidis, Gallinarum e Virchow). Em outro estudo, todas os sorovares de *Salmonella* Enteritidis isolados de humanos, aviários, galinhas e ovos, testaram positivo para *sopE*, o que pode indicar sua importância na patogênese (HAN et al., 2013). Esses achados corroboram com o presente estudo, em que esse gene foi detectado em 13,64% (n=6) das estirpes de *S. Thompson* testadas (Tabela 6). A estirpe do grupo 2, referente ao *cluster C* no PFGE, apresentou o gene de virulência *sopE*. Além disso foi uma das estirpes mais recuperada em órgãos do estudo *in vitro*.

A fim de avaliar a taxa de sobrevivência dentro das células, o seguinte gene foi investigado em nosso estudo: *spiA*. Esse gene constitui o SST3 e exporta proteínas que permitem a sobrevivência de *Salmonella* dentro das células fagocíticas, modificando os fatores do hospedeiro necessários para a fusão entre fagossomo e lisossomo (ELDER et al., 2016; HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001; ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017). Em nosso estudo, 9,09% (n=4) das estirpes testadas apresentaram este gene, ao contrário dos achados de Han et al. e Webber et al., em que encontraram a presença do gene em 99,09% e 95,02% respectivamente nas amostras testadas de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* respectivamente.

Apenas um isolado de *S. Thompson* apresentou o gene *spvB* (2,27%). Este gene é de origem plasmidial, está associado ao plasmídeo de virulência de *Salmonella* e é responsável pela manutenção e sobrevivência bacteriana dentro da célula (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). A baixa frequência desse gene pode ser explicada, uma vez que a presença de plasmídeos em *Salmonella* está intimamente relacionada ao sorotipo envolvido. Sua detecção é mais comum no sorotipo Enteritidis (HAN et al., 2013; SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006).

No presente estudo, investigamos o gene associado ao metabolismo do ferro, *iroN*. *Salmonella* sp. encontra diferentes desafios ambientais durante as interações com as células do hospedeiro, incluindo ofertas limitadas de ferro dentro das células. O ferro não é apenas um fator de crescimento essencial para muitas bactérias patogênicas, mas também serve como um elemento de sinalização que regula vários genes, incluindo genes associados à virulência (KHAJANCHI et al., 2019; RATLEDGE; DOVER, 2000). Dos isolados de *S. Thompson* analisados, 45,5% apresentaram o gene em questão, o que corrobora com estudos de Johnson et al., (2010), onde o gene *iroN* foi encontrado em plasmídeos comuns detectados em *E. coli* patogênica aviária e certos sorotipos de *Salmonella* que estão presentes em frangos, incluindo Kentucky, Heidelberg e Typhimurium.

Na avaliação fenotípica de resistência a antimicrobianos, a cepa 3, pertencente ao *cluster* E no PFGE, apresentou resistência a sulfonamida e tetraciclina, bem como os genes de resistência *tetA*, *tetB*, *sul1* e *sul2*, resultando no perfil fenotípico e genotípico concordantes, diferente das demais estirpes avaliadas. Essa mesma estirpe demonstrou ser a mais invasiva quando comparada as outras estirpes, baseado nas lesões microscópicas relatadas e dados apresentados na Tabela 8. Porém, em relação aos genes de virulência, essa cepa não apresentou nenhum dos genes estudados. É possível que a patogenicidade da bactéria em questão possa ser explicada por outros genes não avaliados neste experimento, visto que há diversos genes que contribuem para as características de virulência na patogênese das infecções por *Salmonella*.

### **3.5 Conclusão**

A maioria das estirpes de *S. Thompson* apresentou alta similaridade no PFGE, e isso pode ter sido originado de um mesmo clone que se disseminou. Foram encontradas estirpes alocadas em *clusters* diferentes provenientes de mesmas origens produtivas, o que sugere que a *S. Thompson* pode ter sofrido mutações.

Todas as estirpes testadas expressaram dois ou mais genes de resistência a antimicrobianos, entre eles *tetA* e *su12*. O perfil fenotípico em relação aos antibióticos testados apresentou uma estabilidade entre as estirpes analisadas, além disso não houve correlação direta com a expressão de genes de resistência, concluindo-se que a resistência ou a sensibilidade fenotípica para esse sorovar pode estar ligada a um fenômeno intrínseco não-hereditário e transitório.

A maioria das estirpes testadas apresentou pelo menos um gene de virulência, sendo o gene *iron* o mais frequente. *S. Thompson* foi capaz de invadir órgãos e colonizar o intestino, provocando lesões microscópicas como descamação e adesão de bastonetes ao epitélio do papo e hemorragia em tonsilas cecais de algumas aves.

Além disso, indicamos a ocorrência de isolados de *S. Thompson* portadores de genes de resistência a antimicrobianos em amostras oriundas da cadeia avícola brasileira pela primeira vez. Portanto, por questões de saúde pública e de vigilância contínua, demonstra a importância do uso de análises moleculares como ferramentas auxiliares nas estratégias de controle deste patógeno na cadeia de frangos.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O conhecimento sobre um sorotipo específico de *Salmonella* e de seu perfil genético permitem um melhor entendimento das particularidades deste. Estirpes de mesma origem alocadas em *clusters* distintos sugerem que a *S. Thompson* possa ter sofrido mutações. Análises como o sequenciamento do genoma completo são necessárias para confirmar essa hipótese.

As informações geradas nesse estudo auxiliam e aprimoram as estratégias de controle de *Salmonella* na cadeia avícola, mostrando a necessidade, por questões de saúde pública e de vigilância contínua, o uso de análises moleculares como ferramentas auxiliares nas estratégias de controle deste patógeno na cadeia de frangos.

## 5 REFERÊNCIAS

ALJAHDALI, N.H. *et al.* Whole-genome sequences of 66 incompatibility group FIB plasmid-carrying salmonella enterica serovar typhimurium isolates from food animal sources. **Microbiology Resource Announcements**, [s. l.], v. 9, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MRA.01435-19>

ARTICLE, Review. Ilhas de patogenicidade de Salmonella enterica: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 219–227, 2012.

BAHRAMIANFARD, Hassan *et al.* Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of Salmonella Enteritidis from poultry and egg samples in Iran. [s. l.], Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02900-2>

BAILEY, J. S. *et al.* Sources and movement of Salmonella through integrated poultry operations: A multistate epidemiological investigation. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 64, n. 11, p. 1690–1697, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.11.1690>

BAKKEREN, Erik, DIARD, Mederik, e HARDT, Wolf-Dietrich. Evolutionary causes and consequences of bacterial antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology** v. 18, n. 9, p. 479–490, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0378-z>

BERTELLI, Claire *et al.* IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 45, n. W1, p. W30–W35, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>

BLAIR, Jessica M.A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

BOERLIN, Patrick *et al.* Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of Escherichia coli Isolates from Swine in Ontario. **Applied And Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 11, p. 6753–6761, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6753-6761.2005>

BOTTLEDOOM, Nadine *et al.* Real-time reverse transcription PCR for the quantification of the mntH expression of Salmonella enterica as a function of growth phase and phagosome-like conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 125-135, 2006. Disponível em [https://www.mendeley.com/catalogue/be6bcc06-96b9-3480-82e3-702b13b797a5/?utm\\_source=desktop](https://www.mendeley.com/catalogue/be6bcc06-96b9-3480-82e3-702b13b797a5/?utm_source=desktop)

CDC- CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. 2013. An Atlas of Salmonella in the United States, 1968-2011. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/pdf/thompson-508c.pdf>

CHISHOLM, S. A. *et al.* Molecular typing of Salmonella serotype Thompson strains isolated from human and animal sources. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 33–39, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0950268898001836>

COHEN, Emiliano *et al.* Emergence of new variants of antibiotic resistance genomic islands among multidrug-resistant Salmonella enterica in poultry. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 413–432, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14858>

CORONA, Fernando; MARTINEZ, Jose L. **Phenotypic resistance to antibiotics**. [S. l.: s. n.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020237>

DE JONG, Anno et al. Antimicrobial susceptibility of Salmonella isolates from healthy pigs and chickens (2008–2011). **Veterinary Microbiology**. v. 171, n. 3-4, p. 298-306, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113514000650>

DE MELO, Roberta Torres *et al.* Salmonella enterica serovar minnesota biofilms, susceptibility to biocides, and molecular characterization. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050581>

DOMÍNGUEZ-ACUÑA, Lorena; PORTILLO, Francisco García Del. Ferrous Iron Uptake Is Required for Salmonella to Persist within Vacuoles of Host Cells. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 90, n. 6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.00149-22>

EJAZ, Hasan *et al.* Molecular analysis of blaSHV, blaTEM, and blaCTX-M in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae recovered from fecal specimens of animals. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245126>

EL-HALFAWY, Omar M.; VALVANO, Miguel A. Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 191–207, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-14>

ELDER, Jacob R *et al.* The Salmonella pathogenicity island 13 contributes to pathogenesis in streptomycin pre-treated mice but not in day-old chickens. **Gut Pathog**, [s. l.], v. 8, p. 16, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0098-0>

ELKENANY, Rasha M.; ELADL, Abdelfattah H.; EL-SHAFEI, Reham A. Genetic characterisation of class 1 integrons among multidrug-resistant Salmonella serotypes in broiler chicken farms. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 14, p. 202–208, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2018.04.009>

FERRARI, Rafaela G. *et al.* Worldwide epidemiology of Salmonella serovars in animal-based foods: A meta-analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 85, n. 14, p. 1–21, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>

FOLEY, Steven L *et al.* Salmonella Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 582–607, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-13>

FONSECA, E. L. *et al.* Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant Salmonella enterica serovar infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 2767–2772, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01916-05>

FOOD, European; AUTHORITY, Safety. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, [s. l.], v. 19, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

GAL-MOR, Ohad; FINLAY, B. Brett. Pathogenicity islands: A molecular toolbox for

bacterial virulence. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1707–1719, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x>

HAN, Jing *et al.* Evaluation of virulence and antimicrobial resistance in salmonella enterica serovar enteritidis isolates from humans and chicken- and egg-associated sources. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1008–1015, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1518>

HANSEN-WESTER, Imke; HENSEL, Michael. Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 549–559, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01411-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01411-3)

ILYAS, Bushra; TSAI, Caressa N.; COOMBES, Brian K. Evolution of Salmonella-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. SEP, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00428>

ISSENHUTH-JEANJEAN, Sylvie *et al.* Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>

JAJERE, S.M. A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 504–521, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

JOHNSON, Timothy *et al.* Horizontal Gene Transfer of a ColV Plasmid Has Resulted in a Dominant Avian Clonal Type of Salmonella enterica Serovar Kentucky. **PLoS ONE**. v.5, n. 12, p. 15524, 2010. Disponível em: Horizontal gene transfer of a col... preview & related info | Mendeley

KHAJANCHI, Bijay K. *et al.* Global transcriptomic analyses of Salmonella enterica in Iron-depleted and iron-rich growth conditions. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5768-0>

KHAJANCHI, Bijay K *et al.* Global transcriptomic analyses of Salmonella enterica in Iron-depleted and Iron-rich growth conditions. [s. l.], Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5768-0>

KOPOTSA, Katlego; OSEI SEKYERE, John; MBELLE, Nontombi Marylucy. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1457, n. 1, p. 61–91, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nyas.14223>

KOUTSOUMANIS, Kostas *et al.* Salmonella control in poultry flocks and its public health impact. **EFSA Journal**, [s. l.], v. 17, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5596>

LENITA MOURA, Stefani. Expression of blaCTX-M2 and invA genes of Salmonella Heidelberg isolated from poultry by Qpcr. **Annals of Molecular and Genetic Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 006–011, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.17352/amgm.000006>

LESTARI, Sofiyah, k. *et al.* Prevalence and antimicrobial Resistance of Salmonella



serovars In conventional and organic chickens from Louisiana retail stores. **Journal of Food Protection**. v. 72, n. 6, p. 1165-1172, 2009. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/72/6/1165/164530/Prevalence-and-Antimicrobial-Resistance-of>

LOUREIRO, Rui João *et al.* Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Revista Portuguesa de Saude Publica**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03570.X>

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 2020. Instrução Normativa No 01, de 13 de Janeiro de 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-1-de-13-de-janeiro-de-2020-239402385>

MARTÍNEZ, José L.; ROJO, Fernando. Metabolic regulation of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 768–789, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00282.x>

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 732–749, 1938. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de ação nacional de prevenção e controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022. **Diário da República, 1.ª série — N.º 96 de 18 de maio de 2018**, [s. l.], p. 23, 2018. Disponível em: <https://data.dre.pt/eli/port/141/2018/05/18/p/dre/pt/htm>

MORENO, Miguel A. *et al.* Day-old chicks are a source of antimicrobial resistant bacteria for laying hen farms. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 230, p. 221–227, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2019.02.007>

NABI, Ari Q. Molecular study on some antibiotic resistant genes in Salmonella spp. isolates. **AIP Conference Proceedings**, [s. l.], v. 1888, n. September, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.5004314>

OCHMAN, Howard *et al.* Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 93, n. 15, p. 7800–7804, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7800>

OIE - ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL PARA SAÚDE ANIMAL (OIE). 2007. OIE list of antimicrobials of veterinary importance. Disponível em: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Internationa\\_Standard\\_Setting/docs/pdf/OI\\_E\\_list\\_antimicrobials.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Internationa_Standard_Setting/docs/pdf/OI_E_list_antimicrobials.pdf)

OIE - ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL PARA SAÚDE ANIMAL. 2016. The OIE Strategy on Antimicrobial Resistance and the Prudent Use of Antimicrobials. Disponível

em:

[https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media\\_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN\\_OIE-AMRstrategy.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdf)

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 1661–1669, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.37.6.1661-1669.1999>

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2015. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2018. Foodsafety. Disponível em: [www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/salmonella/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/salmonella/en/)

PRAGER, Rita *et al.* Molecular Properties of Salmonella enterica Serotype Paratyphi B Distinguish between Its Systemic and Its Enteric Pathovars. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 4270–4278, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4270-4278.2003>

RAHMANI, Maral *et al.* Molecular clonality and antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 9, p. 66, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-66>

RANDALL, L. P. *et al.* Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of Salmonella enterica isolated from humans and animals in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 208–216, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh070>

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. October, p. 881–941, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.881>

RIBEIRO TIBA-CASAS, Monique *et al.* Molecular Characterization and Survival Abilities of Salmonella Heidelberg Strains of Poultry Origin in Brazil. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.674147>

RIBOT, Efrain M. *et al.* Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 59–67, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>

RÖDER, Jennifer; HENSEL, Michael. Presence of SopE and mode of infection result in increased Salmonella-containing vacuole damage and cytosolic release during host cell infection by Salmonella enterica. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cmi.13155>

ROGERS, Andrew W. L.; TSOLIS, Renée M.; BÄUMLER, Andreas J. Salmonella versus the Microbiome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 85, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mubr.00027-19>

SALIU, Eva-Maria; VAHJEN, Wilfried; ZENTEK, Jürgen. Types and prevalence of

extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1466252317000020>

SHAH, D.H. *et al.* Microbiology and food safety: Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated Salmonella serotypes. **Poultry Science**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 687–702, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps/pew342>

SHAHEEN, Aqsa *et al.* Transcriptional regulation of drug resistance mechanisms in Salmonella: where we stand and what we need to know. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02862-x>

SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Virulence genotyping of Salmonella spp. with multiplex PCR. **Avian Diseases**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 77–81, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1637/7417.1>

USDA-FSIS - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. 2020. Roadmap to Reducing Salmonella Driving Change through Science-Based Policy. Disponível em <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/388d5b27-b821-42ba-a717-526f3bc68b4a/FSISRoadmaptoReducingSalmonella.pdf?MOD=AJPERES>

VALENTIN, Lars *et al.* Subgrouping of ESBL-producing Escherichia coli from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. **International journal of medical microbiology: IJMM**. v. 304, n. 7, p. 805-816, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.015>

VAN ASTEN, Alphons J.A.M.; VAN DIJK, Jaap E. Distribution of “classic” virulence factors among Salmonella spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 251–259, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.02.002>

VAN DER VELDEN, Adrianus W.M. *et al.* Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of Salmonella typhimurium in mice. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 2803–2808, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.66.6.2803-2808.1998>

VARGA, Csaba *et al.* Spatial and space-time clustering and demographic characteristics of human nontyphoidal Salmonella infections with major serotypes in Toronto, Canada. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1–19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235291>

VELASQUEZ, C. G. *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Salmonella isolated from poultry farms in southeastern United States. **Poultry Science**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 2144–2152, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps/pex449>

WALKER, Grayson K. *et al.* Genomic Characterization of a Nalidixic Acid-Resistant Salmonella Enteritidis Strain Causing Persistent Infections in Broiler Chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 8, n. September, p. 1–8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.725737>

WEBBER, Bruna *et al.* Detection of virulence genes in salmonella heidelberg isolated from chicken carcasses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 61, n. June, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961036>

WESTON, Natasha *et al.* Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 169, n. 7–8, p. 425–431, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2017.10.005>

WIBISONO, Freshindy Marissa *et al.* A review of salmonellosis on poultry farms: Public health importance. **Systematic Reviews in Pharmacy**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 481–486, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.31838/srp.2020.9.69>

WÓJCICKI, Michał *et al.* Transcriptional Regulation of the Multiple Resistance Mechanisms in Salmonella—A Review. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 801, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens10070801>

YANG, Baowei *et al.* Counts, serotypes, and antimicrobial resistance of salmonella isolates on retail raw poultry in the People’s Republic of China. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 77, n. 6, p. 894–902, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-439>

ZOU, Wen *et al.* Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles for Identification of *Salmonella*; Serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 9, p. 3122 LP – 3126, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00645-10>

## **6. ANEXOS**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
INSTITUTO FEDERAL  
CATARINENSE  
ARAQUARI - COORD ENSINO  
SUPERIOR

CERTIFICADO Nº 430 / 2021 - CGES/ARA (11.01.02.39)

Nº do Protocolo: 23349.002915/2021-57

Araquari-SC, 21 de julho de 2021.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO INSTITUTO FEDERAL  
CATARINENSE, CAMPUS ARAQUARI

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação genotípica, fenotípica e de patogenicidade de isolados de Salmonella Thompson na indústria avícola.**" de protocolo número "**375/2021**" sob a responsabilidade de "**Alessandra Farias Millezi**" que envolve a **utilização** de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de **Pesquisa** encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no 11.794 de 08 de Outubro de 2008, do Decreto 6.899 de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais IFC-Araquari em reunião de "**16/06/2021**".

Vigência do projeto:	23/08/2021 a 25/07/2022
Espécie/Linhagem:	Aves/Leghorn Branca
Nº de Animais:	125 animais
Peso/Idade:	45g / 1 dia
Sexo:	125 machos
Origem:	Laboratório de Saúde Animal da Seara Alimentos de Nuporanga-SP

**OBS:**

Em caso de não execução do projeto, deve ser solicitada a retirada do mesmo em até 60 dias após a emissão do parecer conforme orientação disponível em <http://araquari.ifc.edu.br/ceua/>

**60 dias após a execução do projeto, deve ser submetido relatório final para avaliação do comitê conforme regimento do CEUA Artigo 25 §4:**

§ 4º. O proponente de um projeto/protocolo deve, ao final da execução do mesmo, encaminhar à CEUA/IFC o relatório final contendo informações básicas baseando-se nos itens descritos no formulário de submissão. O não envio de relatórios de projetos/protocolos já concluídos implicará na não aprovação de novos projetos/protocolos do mesmo proponente.

Elizabeth Schwegler  
Médica Veterinária (CRMV/RS 10058)  
Prof. EBTT (Siape nº 1046884)

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais do  
IFC - Campus Araquari

Portaria nº 247/2018/Reitoria

*(Assinado digitalmente em 21/07/2021 11:59)*

ELIZABETHSCHWEGLER

PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO

CGES/ARA (11.01.02.39)

Matricula: 1046884

Para verificar a autenticidade deste documento entre em

<https://sig.ifc.edu.br/public>

[/documentos/index.jsp](#) informando seu número: 430, ano: 2021, tipo:

CERTIFICADO, data de emissão: 21/07/2021 e o código de verificação: 5498cdf952