

André Duarte Alves e Sousa

Caracterização Fenotípica e Genética de Resistência Antimicrobiana em
Salmonella enterica

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023

André Duarte Alves e Sousa

Caracterização Fenotípica e Genética de Resistência Antimicrobiana em
Salmonella enterica

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023

André Duarte Alves e Sousa

Caracterização Fenotípica e Genética de Resistência Antimicrobiana em
Salmonella enterica

Atesto a originalidade do trabalho,

(André Duarte Alves e Sousa)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação do Professor Doutor Ricardo Magalhães.

Porto, 2023

RESUMO

O género *Salmonella*, pertence à família *Enterobacteriaceae* e consiste em bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos. As bactérias que constituem o género contêm três tipos diferentes de antígenos. As propriedades aglutinantes dos antígenos somáticos (O), flagelar (H) e capsular (Vi), são usados para diferenciar sorologicamente através do esquema de White-Kauffman-Le Minor, os diversos sorovares e assim classificar o género em duas espécies bacterianas, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo que a primeira é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*.

Ao longo dos anos esta bactéria de origem alimentar desenvolveu vários mecanismos moleculares através de genes de resistência a antibióticos, frequentemente associados a elementos genéticos móveis, que promovem a sua mobilidade, permitindo que eles se espalhem rapidamente no ambiente. A crescente taxa de resistência aos antibióticos em *Salmonella*, representa uma preocupação global significativa, muito pelo surgimento de estirpes multirresistentes e extensivamente resistentes. Desta forma, é essencial uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência a antibióticos em *Salmonella*, para a escolha do antibiótico adequado no tratamento de infeções.

Nesta dissertação, identificaram-se os mecanismos de disseminação de genes de resistência e de que modo estes influenciam a ação da bactéria na presença de diferentes classes de antibióticos. Concluiu-se que a existência de métodos genotípicos para caracterização de *Salmonella*, em particular a sequenciação do genoma completo, são fulcrais para entender os processos que estão na base da resistência a antibióticos.

Palavras-chave: resistência *Salmonella*, transferência horizontal genes, subtipagem *Salmonella*, febre tifoide, salmonelose

ABSTRACT

The *Salmonella* genus belongs to the Enterobacteriaceae family and consists of Gram-negative, non spore forming bacilli. The bacteria that make up the genus contain three different types of antigens. The agglutinating properties of the somatic (O), flagellar (H) and capsular (Vi) antigens are used to serologically differentiate through the White-Kauffman-Le Minor scheme, the various serovars and thus classify the genus into two bacterial species, *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*, the former being divided into six subspecies: enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae and indica.

Over the years, this food-borne bacterium has developed several molecular mechanisms through antibiotic resistance genes, often associated with mobile genetic elements, which promote its mobility, allowing it to spread rapidly in the environment. The increasing rate of antibiotic resistance in *Salmonella* represents a significant global concern, largely due to the emergence of multidrug-resistant and extensively resistant strains. In this way, a better understanding of the mechanisms of antibiotic resistance in *Salmonella* is essential, for the choice of the appropriate antibiotic in the treatment of infections.

In this dissertation, we identified the mechanisms of dissemination of resistance genes and how they influence the action of bacteria in the presence of different classes of antibiotics. It was concluded that the existence of genotypic methods for characterizing *Salmonella*, in particular the sequencing of the complete genome, are essential to understand the processes that underlie antibiotic resistance.

Keywords: *Salmonella* resistance, horizontal gene transfer, *Salmonella* subtyping, typhoid fever, salmonellosis

AGRADECIMENTOS

Naturalmente um agradecimento infinito ao meu Pai, Adriano e à minha Mãe, Antónia.

Ao Professor Doutor Ricardo Magalhães, meu orientador, um obrigado pela disponibilidade e acima de tudo, pela paciência que teve para comigo.

Deixar ainda um agradecimento, sem exceção, a todas as Professoras e Professores que se cruzaram no meu percurso e que deixam uma marca indelével na minha formação académica.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
AGRADECIMENTOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. DESENVOLVIMENTO	3
1. Enquadramento Histórico	3
2. Género <i>Salmonella</i>	4
2.1. Taxonomia	4
2.2. Características Gerais	5
3. Mecanismos de Patogenicidade e Fatores de Virulência em <i>Salmonella</i>	6
4. Epidemiologia	9
4.1. <i>Salmonella</i> tifoide.....	9
4.2. <i>Salmonella</i> não tifoide.....	11
5. Manifestações Clínicas e Antibioterapia	13
5.1. Manifestações Clínicas	13
5.2. Antibioterapia	15
6. Mecanismos de Disseminação de Genes de Resistência em <i>Salmonella</i>	15
6.1. Transferência Horizontal de Genes	17
6.1.1. Plasmídeos	18
6.1.2. Integrões.....	19
6.1.3. Transposões.....	20
6.1.4. Mecanismos de Transferência Horizontal de Genes.....	20
6.1.4.1. Conjugação.....	21
6.1.4.2. Transformação	21
6.1.4.3. Transdução	22

7.	Mecanismos de Resistência a Antibióticos.....	23
7.1.	Inativação do Antibiótico	24
7.2.	Alteração do Local de Ação	24
7.3.	Diminuição da Permeabilidade da Membrana Externa	24
7.4.	Bombas de Efluxo	24
7.5.	Mecanismos de Resistência em <i>Salmonella</i> por Classe de Antibióticos.....	25
7.5.1.	Tetraciclinas	26
7.5.2.	Aminoglicosídeos.....	26
7.5.3.	Sulfonamidas e Trimetoprim	27
7.5.4.	Anfenicóis	28
7.5.5.	Beta-Lactâmicos.....	29
7.5.6.	Quinolonas	31
7.5.7.	Macrólidos	32
7.5.8.	Colistina	32
8.	Caracterização Fenotípica e Genotípica de <i>Salmonella</i>	33
8.1.	Métodos Fenotípicos	34
8.1.1.	Serotipagem	35
8.1.2.	Fagotipagem.....	35
8.1.3.	Perfil de Resistência Antimicrobiana.....	36
8.2.	Métodos Genotípicos.....	37
8.2.1.	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	37
8.2.2.	Análise de Repetição em Tandem de Número Variável de Múltiplos Locus (MLVA)	38
8.2.3.	Tipagem de Sequência Multilocus (MLST)	38
8.2.4.	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR)	39
8.2.5.	Ribotipagem	40
8.2.6.	Sequenciação do genoma completo (WGS).....	40
8.2.7.	Identificação de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs)	41
8.2.8.	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	41
III.	CONCLUSÃO.....	43
IV.	BIBLIOGRAFIA.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das espécies e subespécies de <i>Salmonella</i> . Adaptado de (Hurley et al., 2014)	5
Figura 2 - Etapas básicas na patogênese da infecção por <i>Salmonella</i> . Adaptado de (Pradhan et al., 2019).....	7
Figura 3 - Evolução da resistência. A resistência pode evoluir através de dois mecanismos básicos, transferência vertical de genes (a) e transferência horizontal de genes (b). Adaptado de (Sommer et al., 2017).	16
Figura 4 - Mecanismo de transferência horizontal de genes - Conjugação. Adaptado de (Mutuku et al., 2022)	21
Figura 5 - Mecanismo de transferência horizontal de genes - Transformação. Adaptado de (Mutuku et al., 2022)	22
Figura 6 - Mecanismo de transferência horizontal de genes - Transdução. Adaptado de (Mutuku et al., 2022)	22
Figura 7 - Mecanismos de resistência aos antibióticos em <i>Salmonella</i> . Adaptado de (Castro-Vargas et al., 2020).....	23
Figura 8 - Linha do tempo representando a implantação de antibióticos e resistências ocorridas em <i>Salmonella</i> para esses antibióticos. Adaptado de (Castro-Vargas et al., 2020).	25

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Casos confirmados de febre tifoide, paratifoide e taxa por 100 000 habitantes em Portugal e UE/EEE, de 2015–2017. Adaptado de (ECDC, 2020).....	10
Tabela 2 - Casos humanos confirmados de salmonelose e taxa por 100 000 habitantes em Portugal e UE, de 2019–2021. Adaptado de (EFSA/ECDC, 2022).	12
Tabela 3 - Distribuição de casos confirmados de salmonelose humana na EU, para os 10 sorovares de <i>Salmonella</i> mais frequentes entre 2019–2021. Adaptado de (EFSA/ECDC, 2022).	13

LISTA DE ABREVIATURAS

AMR	<i>Antimicrobial Resistance</i> (Resistência Antimicrobiana)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centros de Controle e Prevenção de Doenças)
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas)
DHFR	Dihidrofolato Redutase
DHPS	Dihidropteroato Sintetase
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> (Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças)
H	Antigénio Flagelar
Inc	Incompatibilidade
IRs	<i>Inverted Repeat Sequences</i> (Sequências Repetidas e Invertidas)
ISs	<i>Insertion Sequences</i> (Sequências de Inserção)
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	<i>Multidrug Resistance</i> (Estirpes Multirresistentes)
MGEs	<i>Mobile Genetic Elements</i> (Elementos Genéticos Móveis)
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (Tipagem de Sequência Multilocus)
MLVA	<i>Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis</i> (Análise de Repetição em Tandem de Número Variável de Múltiplos Locus)
NTS	<i>Non-Typhoidal Salmonella</i> (Salmonella Não Tifoide)
O	Antigénio Somático
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBPs	<i>Penicillin Binding Proteins</i> (Proteínas de Ligação à Penicilina)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado)

PMQR	<i>Plasmid Mediated Quinolone Resistance</i> (Resistência às Quinolonas Mediada por Plasmídeos)
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)
QRDR	<i>Quinolone Resistance Determinant Region</i> (Região Determinante de Resistência às Quinolonas)
RA	Resistência aos Antibióticos
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição)
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico Ribossomal)
SCV	<i>Salmonella Containing Vacuole</i> (Vacúolo Contendo <i>Salmonella</i>)
SGI1	<i>Salmonella Genomic Island 1</i> (Ilha Genômica 1 de <i>Salmonella</i>)
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismos de Nucleotídeo Único)
SPIs	<i>Salmonella Pathogenicity Islands</i> (Ilhas de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>)
SSRs	<i>Short Sequences Repeated</i> (Sequências Curtas Repetidas)
THG	Transferência Horizontal de Genes
tRNA	<i>Transfer Ribonucleic Acid</i> (RNA de Transferência)
TTSS	<i>Type III Secretion System</i> (Sistema de Secreção Tipo Três)
UE/EEE	União Europeia/ Espaço Económico Europeu
Vi	Antigénio Capsular
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i> (Repetições em Tandem de Número Variável)
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> (Sequenciação do Genoma Completo)
XDR	<i>Extensively Drug Resistant</i> (Estirpes Extensivamente Resistentes)

I. INTRODUÇÃO

Há mais de um século em todo o mundo, a infecção humana por *Salmonella* continua a ser um grande problema de saúde pública, tanto ao nível da morbidade como de custo económico associado. A *Salmonella* é um organismo zoonótico e um potencial agente patogénico pois tem uma propensão limitada ao trato digestivo de humanos e animais hospedeiros. Animais como aves, bovinos e suínos constituem o principal reservatório, mas a disseminação significativa no ambiente mais amplo resultou das atividades de humanos e outros animais (Rabsch *et al.*, 2013; Wales *et al.*, 2013; Jajere, 2019; Oludairo *et al.*, 2022).

Além disso, nos últimos anos, o desenvolvimento de resistência aos antibióticos entre bactérias de origem alimentar, como *Salmonella*, tem sido associada a um aumento do número de mortes humanas, maior duração dos internamentos hospitalares e altos custos de tratamento devido à falha terapêutica. A fácil acessibilidade, o uso crescente e descontrolado de antibióticos em produtos alimentares de origem animal, bem como o controlo da salmonelose humana, pioraram a situação em todo o mundo, proporcionando uma plataforma para a resistência induzida. Historicamente, os antibióticos têm sido usados como promotores de crescimento desde 1950, quando se descobriu que pequenas quantidades subterapêuticas de antibióticos, como penicilina e tetraciclina, fornecidos aos animais na alimentação, poderiam aumentar o peso de aves, suínos e bovinos. Essas doses baixas de antibióticos, conferem a capacidade aos microrganismos de desenvolver mecanismos de resistência (Ferrari *et al.*, 2017; Jajere, 2019; Pradhan *et al.*, 2019; Castro-Vargas *et al.*, 2020).

O cenário atual do surgimento de estirpes de *Salmonella* multirresistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) a antibióticos, reflete ainda mais o papel da sua adaptação evolutiva. Essa adaptação está associada às mudanças genotípicas e fenotípicas, que ocorrem através de genes de resistência localizados no cromossoma, onde são herdados por células filhas, mas também, devido à transferência horizontal de genes, que é conhecida como o principal mecanismo de proliferação de genes de resistência a antibióticos no ambiente. A rápida disseminação horizontal da resistência a antibióticos entre os vários géneros bacterianos, faz-se sobretudo por elementos genéticos móveis, em particular plasmídeos, transposões e integrões (Harbottle *et al.*, 2006; Pradhan *et al.*, 2019; Zarei-Baygi *et al.*, 2021).

Estes genes codificam a expressão de mecanismos de resistência a antibióticos envolvidos em *Salmonella*, ou seja, redução da permeabilidade da membrana externa, inativação do antibiótico, ativação de bombas de efluxo e modificação do local de ação. A presença de um único mecanismo de resistência, por si só, não garante a sobrevivência das bactérias, pelo que é comum a ocorrência simultânea de vários mecanismos de resistência diferentes, em diferentes grupos de antibióticos. No caso da *Salmonella*, resistência a aminoglicosídeos, tetraciclina, antibióticos β -lactâmicos, cloranfenicol, sulfonamidas-trimetoprim, quinolonas e, cada vez mais à colistina, é a mais comumente observada (Chaudhari *et al.*, 2022; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Assim, surge a necessidade fundamental de explicar como a resistência a antibióticos e outras características fenotípicas, evoluem nos microrganismos ao longo do tempo, contribuindo para a sobrevivência das bactérias e para a gravidade e disseminação da doença. É neste contexto, que foram desenvolvidas técnicas de caracterização fenotípicas e genotípicas para detectar eficientemente os casos de infecção humana por *Salmonella* e seus possíveis danos, mas também, melhorar a capacidade do tratamento clínico (Ferrari *et al.*, 2017; Ricke *et al.*, 2018).

Nesta dissertação tem-se como objetivo, compreender a gênese da resistência aos antibióticos em *Salmonella*, para tal, pretende-se identificar os mecanismos de disseminação de genes de resistência e de que modo estes influenciam a ação da bactéria na presença de diferentes classes de antibióticos, bem como, a existência de métodos de caracterização fenotípica e genotípica cruciais para se entender o comportamento da *Salmonella*.

Para a pesquisa bibliográfica utilizou-se os motores de busca da PubMed, ScienceDirect e Google Scholar, com preferência por artigos publicados entre 2000 e 2022. Foram utilizadas como palavras-chave: “Antimicrobial Resistance *Salmonella*”, “*Salmonella enterica* resistance”, “*Salmonella* Horizontal Gene Transfer”, “*Salmonella* Subtyping”, “typhoid fever” e “non-typhoidal *Salmonella*”

II. DESENVOLVIMENTO

1. Enquadramento Histórico

Foi em 1839 por Sohlerin, que a bactéria *Salmonella* foi encontrada pela primeira vez. Posteriormente, em 1880, é isolada por Karl Joseph Eberth a partir dos nódulos linfáticos mesentéricos e do baço de pacientes com febre tifoide, por consequência, em sua homenagem, a bactéria designava-se na altura *Eberthella typhosa*. Reforçando a descoberta de Eberth, em 1884 Georg Gaffky também isola com sucesso este bacilo de pacientes com febre tifoide, o qual mais tarde seria descrito como *Salmonella Typhi*. Assistia-se, portanto, à evolução na descoberta deste organismo, a qual viria a ter o contributo do patologista veterinário americano Daniel Elmer Salmon e seu assistente Theobald Smith, que em 1884 cultivaram o espécime, originalmente chamado de *Bacillus choleraesuis*, a partir de porcos que morreram de cólera suína, assumindo incorretamente, que este era o agente causador da cólera. A posteriori esta designação seria alterada para *Salmonella choleraesuis*. Salmon esteve na génese do nome atribuído ao género *Salmonella*, formalizado em 1934, por proposta do bacteriologista francês Joseph Lignières, como reconhecimento dos seus esforços, apesar do contributo de vários cientistas (Su *et al.*, 2007; Marineli *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2018; Monte *et al.*, 2020).

O 1º Congresso da Sociedade Internacional de Microbiologia em 1930, foi um marco para o género *Salmonella*, com a formação de um subcomité com a responsabilidade de dar respostas às questões relativas à taxonomia e nomenclatura deste género. O subcomité publicou em 1934, a primeira lista oficial com nomes aprovados para o género *Salmonella*. Os nomes tiveram princípio baseado no esquema White-Kauffmann, mas também, tanto quanto possível, nas Regras Internacionais de Nomenclatura Bacteriana. O esquema de White-Kauffmann é baseado na presença ou ausência de anticorpos específicos contra os antígenos somáticos (O) e flagelares (H), os quais foram acidentalmente descobertos em 1896 e desde então, têm sido usados para agrupar o género *Salmonella* (Evangelopoulou *et al.*, 2018).

2. Género *Salmonella*

O género *Salmonella*, é um dos mais importantes géneros de bactérias patogénicas implicadas em doenças transmitidas por via alimentar. A nomenclatura de *Salmonella* é controversa e ainda em evolução, uma vez que, a taxonomia original do género não teve por base o parentesco de DNA e os nomes foram atribuídos de acordo com considerações clínicas. Ainda assim, a identificação de *Salmonella* ao nível de género, agora apresenta poucos problemas, pois a maioria dos membros deste género compartilham perfis bioquímicos comuns e um alto nível de similaridade genética. Atualmente, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) utilizam o sistema de nomenclatura de *Salmonella* recomendado pelo Centro Colaborador da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Agbaje *et al.*, 2011; Eng *et al.*, 2015; Lamas *et al.*, 2016).

2.1. Taxonomia

De acordo com a recomendação do Centro Colaborador da OMS, o sistema atual empregado pelos CDC, reconhece *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* como as 2 espécies do género *Salmonella*. Com base nas propriedades bioquímicas e no parentesco genómico, a espécie *S. enterica* é ainda classificada em seis subespécies. Essas subespécies na nomenclatura são indicadas por algarismos romanos ou pelo nome: (I) *Salmonella enterica* subsp. *enterica*; (II) *S. enterica* subsp. *salamae*; (IIIa) *S. enterica* subsp. *arizonae*; (IIIb) *S. enterica* subsp. *diarizonae*; (IV) *S. enterica* subsp. *houtenae* e (VI) *S. enterica* subsp. *indica*, enquanto a *Salmonella bongori* é a subespécie V (Figura 1) (Jajere, 2019; Guard, 2022; Oludairo *et al.*, 2022).

Com base no esquema de sorotipagem de White-Kaufman-LeMinor, as seis subespécies relativas à *S. enterica*, são ainda classificadas em sorovares. Até agora, mais de 2.600 sorovares pertencentes a *S. enterica* têm sido descritos em todo o mundo e muitos desses sorovares são capazes de causar doenças em humanos e animais. Os sorovares, *Salmonella enterica* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B e Paratyphi C podem ser referidos coletivamente como *Salmonella* tifoide, enquanto os outros sorovares de *S. enterica*, são agrupados como *Salmonella* não tifoide. A outra espécie, *S. bongori* é composta por 22 sorovares pouco estudados, por estarem associados principalmente a animais de sangue

frio e serem pouco comuns em humanos (Crump *et al.*, 2015; Lamas *et al.*, 2018; Jajere, 2019; Guard, 2022).

REINO: Eubacteria
FILO: Proteobacteria
CLASSE: Gammaproteobacteria
ORDEM: Enterobacteriales
FAMÍLIA: Enterobacteriaceae

GÉNERO:

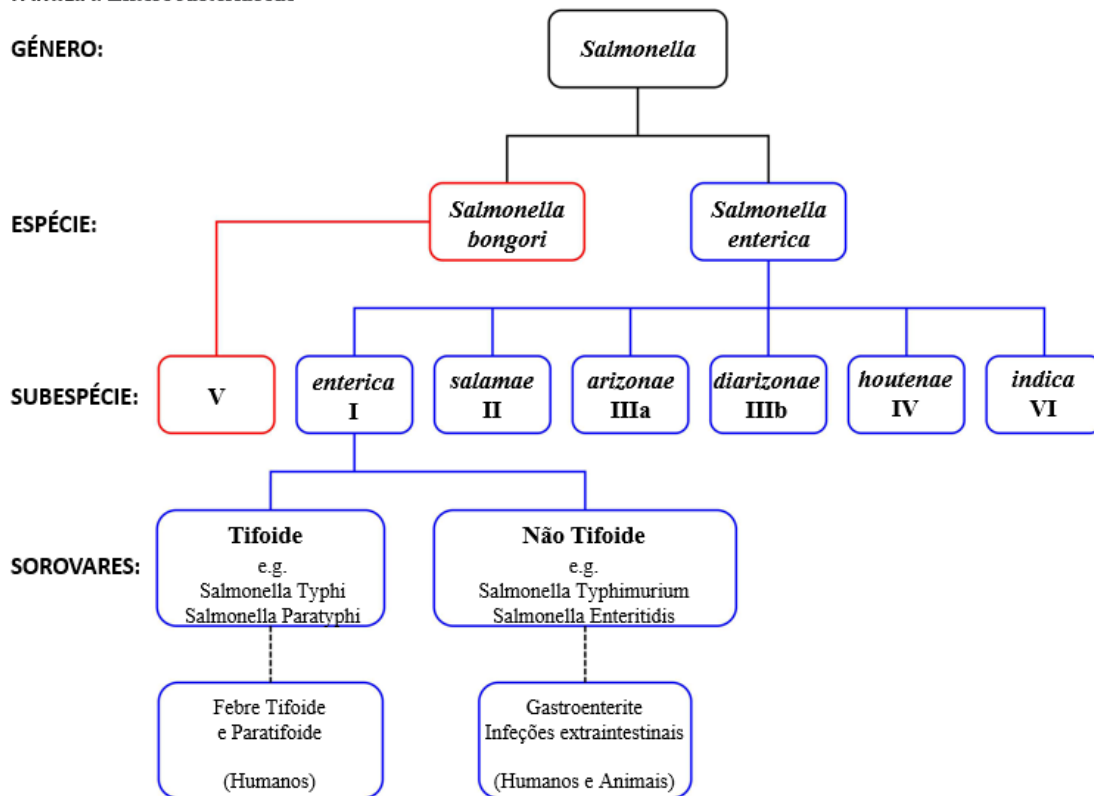


Figura 1 - Classificação das espécies e subespécies de *Salmonella*. Adaptado de (Hurley *et al.*, 2014)

2.2. Características Gerais

A *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo, anaeróbia facultativa e não formadora de esporos. À exceção dos sorovares, *Salmonella enterica* sorovar Pullorum e *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum, os membros deste género são na sua grande maioria móveis dada a presença de flagelos peritríquios. A maioria dos sorovares prosperam e crescem numa faixa de temperatura de 5°C a 47°C, embora a temperatura ótima seja no intervalo de 35°C a 43°C.

O pH necessário para o crescimento de *Salmonella* varia entre 3,8 a 9,5, com uma faixa ótima entre 6,5 e 7,5 (Agbaje *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; Jajere, 2019).

A parede celular em *Salmonella* possui lípidos, lipopolissacarídeos, proteínas e lipoproteínas. O lipopolissacarídeo e a porção lipídica da parede celular contêm a endotoxina, que é responsável pelos efeitos biológicos da bactéria. Os polissacarídeos do centro comum da endotoxina são chamados de antígeno somático (O). A *Salmonella* também possui os antígenos flagelares (H), os quais são compostos por subunidades de flagelina e são a porção filamentosa dos flagelos bacterianos, apresentando-se numa ou duas fases, referidas como antígeno H de fase I e/ou fase II. Há ainda o antígeno capsular (Vi), que ocorre apenas em *Salmonella* Typhi, embora seja ocasionalmente identificado em *Salmonella* Paratyphi C e *Salmonella* Dublin. Evidências atuais indicam que a *Salmonella* pode também produzir inúmeras fímbrias, que medeiam uma variedade de funções e são importantes para a manutenção e sobrevivência do organismo no hospedeiro e seu ambiente. (Jones, 2013; Ryan *et al.*, 2017; Oludairo *et al.*, 2022).

De modo geral em provas bioquímicas a *Salmonella* é positiva para catalase e vermelho de metilo. Para os testes de urease, fenilalanina, indol e oxidase é negativa. É uma bactéria aerogênica, produtora de gás sulfídrico, fermentadora de L-ramnose, L-arabinose, D-sorbitol, D-manitol, D-manose, D-xilose, maltose e trealose. A *Salmonella* cresce facilmente em meios de cultura agar sangue e agar MacConkey, inclusive, o agar sulfato de bismuto (BSA), o agar *Salmonella* Shigella (SSA) e o agar xilina lisina desoxicolato (XLD), também podem ser usados no seu isolamento. Nestes meios, a *Salmonella* fermenta glicose e manose, mas não fermenta lactose e sacarose (Agbaje *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; Oludairo *et al.*, 2022).

3. Mecanismos de Patogenicidade e Fatores de Virulência em *Salmonella*

A patogenicidade define-se como a capacidade de um microrganismo em causar doença. Os microrganismos patogênicos distinguem-se de outros da mesma espécie, pelo fato de possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, ou seja, fatores que induzem a ocorrência de eventos associados à alteração da fisiologia regular do

hospedeiro e que levam ao aparecimento de sinais e sintomas anormais (Vieira, 2009; Oliveira *et al.*, 2013).

A *Salmonella* é uma bactéria que causa doenças em humanos e animais, por via do consumo e da ingestão de alimentos contaminados. Os sorovares de *Salmonella* tifoide e *Salmonella* não tifoide (NTS), inicialmente ativam a resposta de tolerância ácida para sobreviver no ambiente ácido do trato gastrointestinal, de seguida aderem e invadem as células M do epitélio intestinal. A invasão pela bactéria induz a expressão de citocinas, o que resulta numa resposta inflamatória e consequente migração de neutrófilos e macrófagos para o intestino. A inflamação causada pelas citocinas pró-inflamatórias leva à diarreia, úlceras e destruição das células da mucosa. As bactérias são então fagocitadas pelas células imunes, posteriormente, através do sangue e do sistema linfático, atingem o linfonodo mesentérico, de onde viajam para tecidos mais profundos, como baço, fígado e até medula óssea. Em todos estes tecidos, as bactérias residem dentro dos macrófagos, em compartimentos endossomais especializados, chamados vacúolo contendo *Salmonella* (SCV) e lá proliferam, por ser desprovido de mecanismos de defesa antimicrobianos do hospedeiro (Figura 2) (Shinohara *et al.*, 2008; Gal-Mor *et al.*, 2014; Pradhan *et al.*, 2019; Wójcicki *et al.*, 2021; Alenazy, 2022).

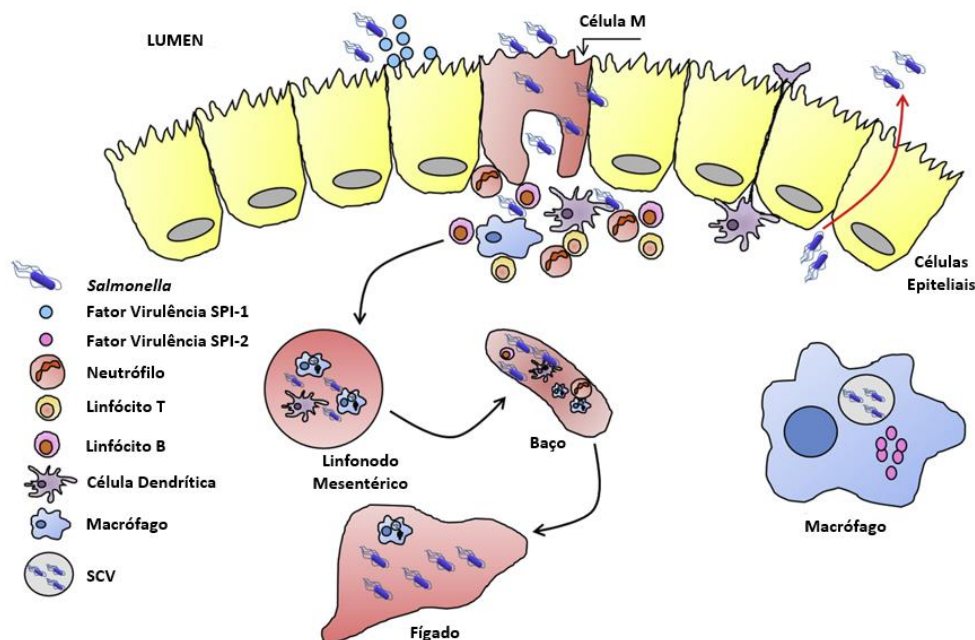


Figura 2 - Etapas básicas na patogênese da infecção por *Salmonella*. Adaptado de (Pradhan *et al.*, 2019)

No entanto, todo este processo de patogênese durante a infecção por *Salmonella* é muito mais complexo e está correlacionado com a presença de um grande número de fatores de virulência. Estes fatores incluem flagelos, fimbrias, proteínas da membrana externa, lipopolissacarídeos (LPS), cápsula, síntese de enterotoxinas e citotoxinas, bem como a presença ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPIs). Alguns fatores de virulência são codificados por genes nos cromossomas e outros estão presentes em plasmídeos (Kaur *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2020; Wójcicki *et al.*, 2021).

O LPS estimula a libertação de citocinas pró-inflamatórias específicas para *Salmonella*, sendo o principal responsável pelos sintomas clínicos da infecção. A parte externa do LPS desempenha um papel importante na colonização do hospedeiro, pois o comprimento, estrutura, composição e rugosidade da superfície das cadeias laterais do antígeno somático (O) no LPS, determinam a virulência da bactéria (Wójcicki *et al.*, 2021).

Alguns genes são conhecidos por estarem envolvidos na adesão e invasão, incluindo fimbrias codificadas por plasmídeos (*pefA*). As fimbrias desempenham um papel importante na patogênese por *Salmonella*, pois apresentam os sistemas de adesão mais comuns às células do hospedeiro (Gharieb *et al.*, 2015; Jajere, 2019).

As proteínas externas da *Salmonella*, codificadas pelos genes *stn* e *slyA*, para produção respetivamente de enterotoxinas e salmolisina, estão também associadas à manifestação de processos patogénicos (Gharieb *et al.*, 2015; Jajere, 2019).

A maioria dos genes virulentos em *Salmonella*, está presente nas SPIs que desempenham um papel importante na infecção, sobrevivência intracelular e onde existem vários sistemas reguladores. Até agora, 23 SPIs foram descritas, no entanto, SPI-I e SPI-II são os determinantes de virulência mais importantes em *Salmonella*. Estas SPIs codificam uma máquina molecular chamada sistema de secreção tipo três (TTSS), que está envolvido na translocação de proteínas efetoras através da membrana plasmática, para a célula hospedeira, de modo a explorar a maquinaria do hospedeiro no sentido de assegurar a sua sobrevivência e patogênese (Pradhan *et al.*, 2019).

O T3SS localizado na SPI-1 é regulado pela proteína HilA, facilita a captação e invasão endotelial, permitindo que as proteínas efetoras sejam translocadas do citoplasma bacteriano para a célula hospedeira. A expressão do aparelho de secreção T3SS SPI-2 é

regulado pelo sistema de dois componentes SsrA-SsrB, onde os genes são expressos apenas dentro do SCV da célula hospedeira. O T3SS SPI-2 ativo facilita a transferência de proteínas efetoras de *Salmonella* através da membrana do SCV, contribuindo para a sobrevivência e replicação dentro das células do hospedeiro, como células epiteliais e macrófagos (Kaur *et al.*, 2012; Lamas *et al.*, 2018).

4. Epidemiologia

A ocorrência de infecções pelos diversos sorovares de *Salmonella* amplamente distribuídos na natureza, varia em diferentes países e regiões do mundo, causando um espectro de doenças no homem e animais. Alguns sorovares podem espalhar-se numa área geográfica por um determinado período de tempo e depois persistir ou haver declínio da sua incidência. A questão da globalização, intrinsecamente relacionada com o aumento do volume de comércio internacional envolvendo produtos de origem animal, tem facilitado a introdução de novos sorovares de *Salmonella* para países importadores. As infecções por *Salmonella* continuam a ser um grande fardo para a saúde pública em todo o mundo, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento. Com base nos padrões clínicos, as infecções por *Salmonella* são separadas em *Salmonella* tifoide e *Salmonella* não tifoide (Agbaje *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2018; Gal-Mor, 2019).

4.1. *Salmonella* tifoide

A infecção por sorovares de *Salmonella* tifoide redonda em febre tifoide ou paratifoide, isto se, causada por *Salmonella* Typhi ou *Salmonella* Paratyphi A, B ou C, respetivamente. Tratam-se de sorovares altamente adaptados ao hospedeiro humano, o qual é usado como seu reservatório exclusivo. A transmissão da infecção é feita pela via fecal-oral e pode ocorrer em dois padrões principais: (i) ciclo curto, com contaminação de alimentos e água no ambiente imediato através de medidas inadequadas de higiene e saneamento, ou (ii) ciclo longo, com contaminação mais ampla do meio ambiente, como poluição do abastecimento de água por esgotos, tratamento inadequado de água encanada ou uso de fezes humanas não tratadas como fertilizante agrícola (Gal-Mor *et al.*, 2014; WHO, 2018).

Desta forma, a febre tifoide assume um importante problema de saúde pública em muitos países de médio e baixos rendimento, com a maioria dos casos a ocorrer no sul/sudeste da Ásia e na África subsaariana. A cada ano, cerca de 27 milhões de novos casos de febre tifoide ocorrem, com mortalidade em torno das 200 000 pessoas. As áreas higienicamente comprometidas de países em desenvolvimento, como Paquistão, Índia e Bangladesh, juntas, carregam o peso de 85% dos casos ocorridos globalmente. De facto, a incidência de febre tifoide é alta na Ásia (exceto Japão) e na África Austral, com uma taxa superior a 100 casos por 100 000 habitantes/ano. No norte de África, América Latina, Ilhas Caribenhas e Oceânia, a incidência é média, com a ocorrência de 10 a 100 casos por 100 000 habitantes/ano (WHO, 2018; Chandankhede *et al.*, 2022; Pund *et al.*, 2022).

Relativamente à incidência de febre tifoide na Europa, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia, é estimada como baixa, pois ocorrem menos de 10 casos por 100 000 habitantes/ano. A febre entérica, também assim designada, em países de elevados rendimentos é adquirida geralmente no exterior e está associada a viagens para áreas de endemicidade (Crump *et al.*, 2015; Chandankhede *et al.*, 2022).

Com base nos dados reportados pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC), relativos ao ano de 2017 (último ano disponível para consulta), 22 países notificaram um total de 1098 casos de febre tifoide e paratifoide, inclusive Portugal ao apresentar 9 casos confirmados (Tabela 1). A taxa de notificação da União Europeia/Espaço Económico Europeu (UE/EEE) foi de 0,28 casos por 100 000 habitantes. Dos 798 casos com informações disponíveis, 725 foram relacionados a viagens, dos quais 577 estavam associados a viagens para países fora da UE/EEE. A Índia e o Paquistão foram os dois destinos mais visitados, correspondendo a 44,4% e 21,5%, respetivamente (ECDC, 2020).

Tabela 1 - Casos confirmados de febre tifoide, paratifoide e taxa por 100 000 habitantes em Portugal e UE/EEE, de 2015–2017. Adaptado de (ECDC, 2020).

	2017		2016		2015	
	CASOS	TAXA	CASOS	TAXA	CASOS	TAXA
Portugal	9	0,09	9	0,09	8	0,08
UE/EEE	1 098	0,28	1 161	0,30	1 007	0,25

4.2. *Salmonella* não tifoide

Em contraste com a febre tifoide frequente nos países em desenvolvimento, as salmoneloses provocadas pela infecção por *Salmonella* não tifoide (NTS), ocorrem em todo o mundo. Resultam da infecção por uma ampla gama de sorovares zoonóticos e são transmitidas, em particular (embora não exclusivamente), pela ingestão de alimentos contaminados. Além de produtos alimentares de origem animal contaminados, como suínos, bovinos, aves, ovos e laticínios, a transmissão de NTS pode resultar do contato de pessoa para pessoa ou do contato com animais de estimação, desde gatos, cães, roedores, répteis ou anfíbios. Outra importante fonte de infecção é o consumo de produtos contaminados, especialmente vegetais e frutas todos associados a surtos recentes. Saliente-se ainda que, o processo de abate e desmancha de animais para alimentação em matadouros, é considerado uma das importantes fontes de contaminação de órgãos e carcaças com *Salmonella* (Gal-Mor *et al.*, 2014; Eng *et al.*, 2015; Gal-Mor, 2019; Wójcicki *et al.*, 2021).

Entre os sorovares de NTS, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Newport, são epidemiologicamente, os mais importantes pois têm sido associados à maioria da carga de salmonelose humana em todo o mundo. *Salmonella* Enteritidis é comumente associado a aves e produtos derivados, em contraste, *Salmonella* Typhimurium tem uma gama mais ampla de hospedeiros, incluindo suínos. No entanto, nas últimas décadas, observa-se uma tendência de mudança nos sorovares de *Salmonella* associados à salmonelose de origem alimentar, com a expansão mundial de sorovares anteriormente menos comuns, como *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i e *Salmonella* Derby (Campos *et al.*, 2019; Jajere, 2019).

Estudos têm mostrado uma incidência crescente de NTS, inclusive, um desses estudos estimou que existem aproximadamente 94 milhões de casos de gastroenterite por NTS, resultando a nível global em 155 000 mortes a cada ano. De acordo com este estudo, a maior parte da carga de NTS foi encontrada nas regiões do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental. Quanto aos Estados Unidos, a NTS é responsável em média por cerca de 1,4 milhões de infecções humanas a cada ano, levando a 116 000 hospitalizações e 600 mortes (Gal-Mor, 2019; Jajere, 2019).

A salmonelose foi a segunda infecção gastrointestinal de origem alimentar mais relatada em humanos na União Europeia (UE) em 2021, depois da campilobacteriose. Em 2020, o número de casos humanos confirmados, atingiram os níveis mais baixos observados desde o início da vigilância de *Salmonella* a nível da UE em 2007. Isto deveu-se provavelmente à pandemia da COVID-19 e à saída do Reino Unido da UE. Em 2021 registou-se um ligeiro aumento e o número de casos confirmados de salmonelose humana foi de 60 050, correspondente a uma taxa de 15,7 por 100 000 habitantes. Houve 11 785 hospitalizações e 71 mortes. Relativamente a Portugal, foram reportados 361 casos que representam uma taxa de 3,5 por 100 000 habitantes (Tabela 2) (EFSA/ECDC, 2022).

Tabela 2 - Casos humanos confirmados de salmonelose e taxa por 100 000 habitantes em Portugal e UE, de 2019–2021. Adaptado de (EFSA/ECDC, 2022).

	2021		2020		2019	
	CASOS	TAXA	CASOS	TAXA	CASOS	TAXA
Portugal	361	3,5	262	2,5	432	4,2
UE	60 050	15,7	52 690	13,7	78 190	20,4

Informações relativas aos vários sorovares de NTS, estavam apenas disponíveis para 84,6% do número total de casos confirmados, isto é, 50 817 casos em 60 050. Tal como nos anos anteriores, os três sorovares de *Salmonella* mais relatados em 2021 foram *Salmonella* Enteritidis (54,6%), *Salmonella* Typhimurium (11,4%) e *Salmonella* Typhimurium monofásica (1,4,[5],12:i:-) (8,8%), representando 74,8% dos 50 817 casos humanos confirmados (Tabela 3). A proporção destes três sorovares, sobretudo impulsionada pela *Salmonella* Enteritidis, aumentou durante os últimos 3 anos, de 70,5% em 2019 para 72,2% em 2020 e para 74,8% em 2021. Quanto ao quarto e quinto sorovares, *Salmonella* Infantise *Salmonella* Derby, estiveram nos mesmos níveis de 2020 e 2019 (EFSA/ECDC, 2022).

Tabela 3 - Distribuição de casos confirmados de salmonelose humana na EU, para os 10 sorovares de *Salmonella* mais frequentes entre 2019–2021. Adaptado de (EFSA/ECDC, 2022).

SOROVAR	2021		2020		2019	
	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%
Enteritidis	27 734	54,6	24 008	51,8	39 451	50,4
Typhimurium	5 781	11,4	5 337	11,5	9 288	11,9
Typhimurium 1.4.[5]0.12:i:-	4 495	8,80	4 697	10,1	6 432	8,20
Infantis	1 019	2,00	1 064	2,30	1 912	2,40
Derby	474	0,93	525	1,13	719	0,92
Coeln	463	0,91	324	0,70	441	0,56
Braenderup	373	0,73	93	0,20	292	0,37
Napoli	352	0,69	412	0,89	493	0,63
Chester	316	0,62	129	0,28	340	0,43
Newport	311	0,61	336	0,73	846	1,08

5. Manifestações Clínicas e Antibioterapia

5.1. Manifestações Clínicas

A manifestação da doença depende do sorovar envolvido, fatores de virulência, dose infectante e imunidade do hospedeiro. Pacientes imunocomprometidos, crianças e idosos tendem a ser mais suscetíveis e apresentar sintomas clínicos mais graves, incluindo sépsis. Noutros casos, a infeção pode causar um estado crónico de transporte assintomático no hospedeiro. Do ponto de vista clínico quanto às doenças causadas, a febre entérica com origem em sorovares tifoïdes, difere substancialmente da gastroenterite associada à NTS. A febre tifoïde tem um período de incubação mais longo, de 5 a 9 dias e uma duração mais longa dos sintomas, em que a febre persiste por aproximadamente três semanas. Enquanto a gastroenterite causada por NTS é caracterizada por um rápido início, após um curto período de incubação de 12 a 72h e uma breve duração inferior a 10 dias (Raffatelli *et al.*, 2008; Castro-Vargas *et al.*, 2020).

Na febre tifoide, o sintoma predominante da infecção em indivíduos imunocompetentes é caracterizado por febre alta. Outros sintomas frequentes incluem calafrios, dor abdominal, hepatoesplenomegalia, erupção cutânea na forma de manchas rosadas, náusea, anorexia, diarreia ou obstipação, dor de cabeça e tosse seca. Caso a doença não seja tratada, após a segunda semana os pacientes podem ver agravados os sintomas e as complicações desenvolvem-se. Muitas destas complicações foram descritas, das quais sangramento gastrointestinal, perfuração intestinal e encefalopatia tifoide estão mais intimamente associadas ao risco de morte. Outras complicações incluem distúrbios psiquiátricos e pneumonia (Gal-Mor *et al.*, 2014; Crump *et al.*, 2015; Lokken *et al.*, 2016; Masuet-Aumatell *et al.*, 2021).

A maioria dos pacientes recupera das infecções após o tratamento. No entanto, 3% a 5% dos pacientes tornam-se portadores crônicos, com infecção crônica na vesícula biliar e eliminam intermitentemente as bactérias através das fezes e urina. Tal se deve, aos humanos serem o único reservatório de *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi*. Assim, são responsáveis pela disseminação da febre entérica em regiões endêmicas, pois a via de transmissão comum é a ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes de portadores crônicos (Eng *et al.*, 2015; Li, 2022).

Em contraste com a febre entérica, os indivíduos infetados por NTS, geralmente apresentam gastroenterite autolimitada, caracterizada por diarreia, cólicas abdominais, náuseas, vômitos e febre. Com baixa frequência, a bactéria pode espalhar-se além do intestino, dando origem a infecções focais ou bacteremia, que ocorrem principalmente em crianças, idosos ou pacientes imunocomprometidos. A apresentação clínica da bacteremia é caracterizada por febre, enquanto a diarreia é comumente ausente. Estas infecções disseminadas também são referidas na literatura clínica como NTS invasiva. Quase todos os sorovares de NTS podem causar bacteremia, em particular *Salmonella Dublin* e *Salmonella Choleraesuis*, são duas estirpes invasivas altamente associadas às manifestações de bacteremia. Em condições graves, a resposta imune desencadeada pela bacteremia pode levar ao choque séptico, com alta taxa de mortalidade (Eng *et al.*, 2015; Lokken *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2018; Rincón-Gamboa *et al.*, 2021).

5.2. Antibioterapia

A salmonelose resultante da infecção por NTS é, geralmente, uma doença autolimitada que não requer tratamento com antibióticos, nem hospitalização, exceto a reposição de água e eletrólitos, a fim de evitar a desidratação. No entanto, o uso de antibióticos pode ser necessário no tratamento de infecção invasiva por NTS e febre tifoide (Michael *et al.*, 2016; Gut *et al.*, 2018).

Tradicionalmente, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol, eram usados para tratar esses casos graves, mas o número crescente de cepas de *Salmonella* multirresistentes (MDR), isto é, resistência a três ou mais classes de antibióticos, levou a uma diminuição na eficácia deste tratamento. Atualmente, as fluorquinolonas (ciprofloxacina) e as cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona) são as drogas de escolha para o tratamento de adultos e crianças. A azitromicina também pode ser usada como alternativa. A resistência a estes antibióticos recomendados é, no entanto, cada vez mais descrita em *Salmonella*, com a evolução de MDR para estirpes extensivamente resistentes (XDR), ou seja, que exibem resistência à ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, bem como, fluorquinolonas e cefalosporinas de terceira geração. As tendências crescentes de casos de XDR, levou à introdução de carbapenêmicos e colistina, como antibióticos críticos de último recurso (Alcaine *et al.*, 2005; Cuypers *et al.*, 2018; Akram *et al.*, 2020; Masuet-Aumatell *et al.*, 2021).

6. Mecanismos de Disseminação de Genes de Resistência em *Salmonella*

Um efeito paralelo inelutável do uso de antibióticos na medicina clínica e veterinária, por via da adaptabilidade das bactérias e evolução do genoma microbiano, é o surgimento e disseminação de bactérias resistentes, não apenas em bactérias patogênicas, mas também na flora endógena do homem e dos animais. Os antibióticos, por si só, não causam resistência, mas a exposição frequente e elevada das bactérias aos antibióticos, cria uma pressão seletiva que desencadeia estratégias de resistência por parte das bactérias. A aquisição de genes de resistência pelas bactérias, é o fator predominante associado à emergência, evolução e disseminação desses marcadores genéticos (Philippe *et al.*, 2005; Miriagou *et al.*, 2006; Sultan *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2021).

Em *Salmonella*, assim como noutras bactérias, a resistência aos antibióticos (RA) pode ser mediada, em menor grau, por mutações em diferentes loci cromossômicos que fazem parte de um conjunto central de genes pré-existentes e depois são transmitidas à prole, através da transferência vertical de genes (Figura 3a) (Sommer *et al.*, 2017; Castro-Vargas *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2020).

Além disso, bactérias comensais de animais de produção que apresentam resistências a antibióticos podem contaminar produtos cárneos, atingindo assim o trato intestinal de humanos. Genes de resistência, a antibióticos que são ou foram usados apenas em animais logo após sua introdução, foram encontrados na flora comensal de humanos, em patógenos zoonóticos como *Salmonella* e em patógenos estritamente humanos, como *Shigella*. São evidências que não ocorre apenas a disseminação vertical de genes de resistência. Inclusive, a RA pode ser compartilhada entre bactérias de diferentes ou do mesmo gênero, por meio de transferência horizontal de genes (THG) (Figura 3b), com a aquisição de novos genes de resistência alojados em elementos genéticos móveis (MGEs), como plasmídeos, transposões e integrões (Philippe *et al.*, 2005; Harbottle *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2020; Castro-Vargas *et al.*, 2021; Ramatla *et al.*, 2021).

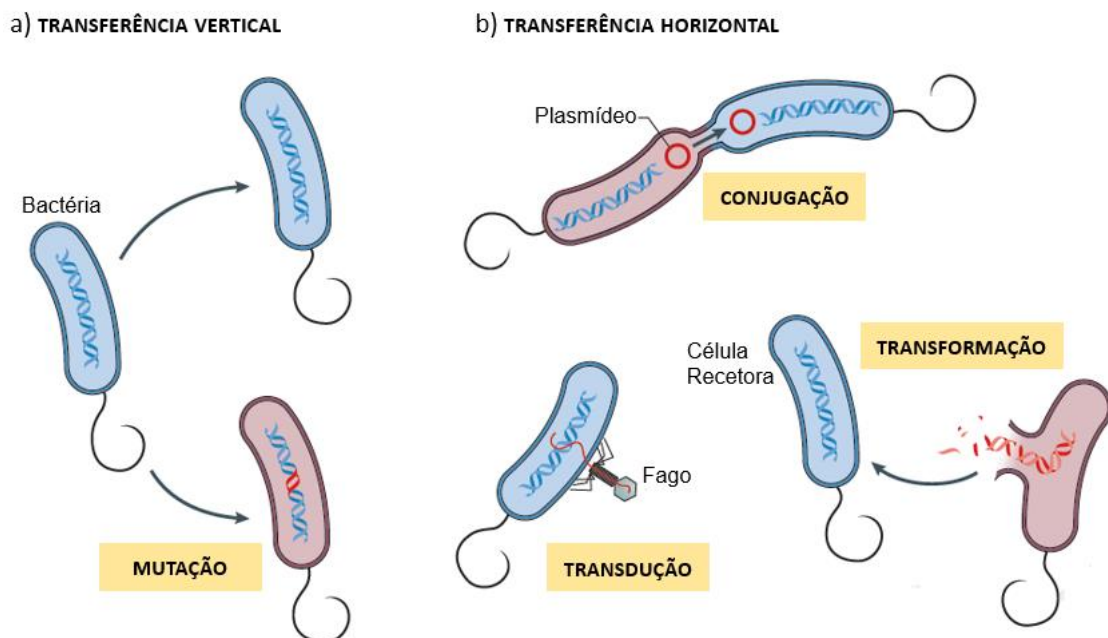


Figura 3 - Evolução da resistência. A resistência pode evoluir através de dois mecanismos básicos, transferência vertical de genes (a) e transferência horizontal de genes (b). Adaptado de (Sommer *et al.*, 2017).

6.1. Transferência Horizontal de Genes

A primeira descrição de uma transferência horizontal de genes foi um grande avanço na biologia molecular. Griffith, em 1928, demonstrou que as bactérias pneumocócicas não virulentas podem tornar-se patogênicas simplesmente pelo contato com bactérias virulentas, mesmo bactérias destruídas pelo calor. Mostrou que existe um princípio termoestável, capaz de modificar a hereditariedade. Esse princípio seria identificado anos depois como DNA, capaz de produzir variantes fenotípicas espontaneamente. A microbiologia médica identificou o problema crescente do aumento de RA de bactérias patogênicas, estimulando pesquisas em genética bacteriana que revelaram que, a THG está envolvida em algumas das variações genéticas que causam RA (Arber, 2014; Daubin *et al.*, 2016).

A THG de resistência é um mecanismo antigo e a taxa a que ocorre tem aumentado significativamente ao longo do tempo. Tem sido relatado que uma porção considerável da maioria dos genomas bacterianos consiste em genes adquiridos horizontalmente, associados a MGEs, que são regiões discretas de DNA definidas pela capacidade de se mover dentro e/ou entre as células bacterianas. Entre os MGEs destacam-se os plasmídeos, ou quais podem transportar outros elementos móveis, como transposões e integrões (Tanner *et al.*, 2018; Castro-Vargas *et al.*, 2020; Johansson *et al.*, 2021; Zarei-Baygi *et al.*, 2021).

As bactérias a partir dos MGEs, podem transferir material genético entre elas, tendo por base mecanismos de conjugação, transformação e transdução mediada por fagos (Figura 3b). A conjugação bacteriana medeia a aquisição de plasmídeos conjugativos e ocorre por meio do contato direto entre as células bacterianas doadoras e receptoras. A transformação natural ocorre quando o DNA é libertado pela lise das células doadoras e é posteriormente absorvido pela célula bacteriana receptora. Já a transdução de fagos, é o processo pelo qual um bacteriófago se liga a uma célula bacteriana receptora e injeta o seu DNA viral (Sommer *et al.*, 2017; Tanner *et al.*, 2018; McMillan *et al.*, 2020).

Em *Salmonella*, a disseminação de genes de resistência pode ocorrer entre os diferentes sorovares, ou de outras espécies bacterianas para *Salmonella* (Alcaine *et al.*, 2007; Oladeinde *et al.*, 2019).

6.1.1. Plasmídeos

Os plasmídeos são segmentos de DNA extracromossômico que se replicam independentemente do cromossoma e podem ser trocados entre bactérias. Em geral, não são essenciais para a sobrevivência, mas normalmente carregam genes que conferem alguma vantagem seletiva à bactéria hospedeira, como determinantes de virulência, aderências e genes de resistência antimicrobiana, inclusive, podem servir de veículo para outros elementos de resistência, como transposões e integrões (Mc Dermott *et al.*, 2003; Harbottle *et al.*, 2006; Castro-Vargas *et al.*, 2021).

De acordo com a sua transmissibilidade, os plasmídeos classificam-se em duas classes. Plasmídeos conjugativos, que contêm um conjunto completo de genes de conjugação, e plasmídeos mobilizáveis, que contêm apenas um conjunto mínimo de genes que permitem que sejam mobilizados por conjugação quando coexistem na mesma célula doadora com um plasmídeo conjugativo. Ambos os plasmídeos, conjugativos e mobilizáveis, podem codificar genes de RA e transferi-los para um novo hospedeiro (Harbottle *et al.*, 2006; Algarni *et al.*, 2022).

Os plasmídeos são também classificados em grupos de incompatibilidade (Inc), definidos como a incapacidade de dois plasmídeos se propagarem de forma estável na mesma linhagem celular. Vários grupos de incompatibilidade diferentes têm sido associados a múltiplos genes de RA em *Salmonella* e outras bactérias. Por exemplo, plasmídeos IncA/C isolados de *Salmonella* têm sido associados a genes que conferem resistência a aminoglicosídeos, β -lactâmicos, quinolonas, cloranfenicol, sulfisoxazol, tetraciclina e trimetoprim. Pesquisas sobre plasmídeos IncA/C conjugados, determinaram que estes plasmídeos desempenham um papel fulcral na disseminação de MDR entre as espécies de *Enterobacteriaceae*, incluindo *Salmonella enterica*. É o caso da estirpe MDR de *Salmonella* Typhimurium ST213 no México, que foi associada ao transporte de plasmídeos IncA/C, com genes *bla_{CMY-2}* que codifica a resistência a cefalosporinas de espectro estendido. Estes plasmídeos, são considerados de ampla gama de hospedeiros devido à sua capacidade de se disseminarem por transferência conjugativa entre as comunidades bacterianas (McMillan *et al.*, 2019; Algarni *et al.*, 2022).

6.1.2. Integrões

Os integrões são elementos de DNA móveis com a capacidade de capturar genes, em particular aqueles que codificam resistência a antibióticos. Podem ser encontrados em plasmídeos, transposões e cromossomas. Estes elementos móveis são compostos por três elementos principais, o gene que codifica a integrase (*IntI*), enzima que garante a integração dos genes no esqueleto genético do hospedeiro, o sítio de recombinação (*attI*), que serve como o sítio primário para capturar as cassetes de genes de resistência, e um promotor para a transcrição de genes capturados. Estes arranjos promovem eficientemente a aquisição de genes exógenos, como genes resistentes a antibióticos no genoma bacteriano (Abatcha *et al.*, 2014; Afolami *et al.*, 2018; Divek *et al.*, 2018; Castro-Vargas *et al.*, 2020; Algarni *et al.*, 2022).

Foram definidas quatro classes de integrões, com base na homologia das proteínas da integrase *IntI*. Assim, os portadores de *IntI1* são referidos como classe 1, *IntI2* como classe 2, *IntI3* como classe 3 e assim sucessivamente. Genes de Integrase *IntI1*, *IntI2* e *IntI3* foram encontradas associadas a elementos genéticos móveis, enquanto que, genes *IntI4* foram encontrados ligados a integrões cromossômicos (Carattoli, 2003; Sultan *et al.*, 2018).

A presença de integrões de classe 1 e 2 foi relatada em sorovares de *Salmonella*, isolados de humanos, produtos alimentares e meio ambiente. Um exemplo de rápida disseminação de genes de RA associados a integrões, é o fago de *Salmonella* Typhimurium DT104. Este integrão é caracterizado por resistência a mais de 5 antibióticos, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina, também conhecido como R-type ACSSuT. Os determinantes genéticos para este tipo R estão contidos na ilha genómica 1 de *Salmonella* (SGI1), composta por integrões contendo os genes ASu (*bla_{CARB-2}* e *sulI*) e SSp (*aadA2*), com genes derivados de plasmídeos que codificam resistência a florfenicol (*flo*) e tetraciclina (*tetG*). Todos os isolados de DT104 multirresistente com o fenótipo ACSSuT, mostraram conter as mesmas cassetes de genes, independentemente do país de origem e da fonte (Harbottle *et al.*, 2006; Abatcha *et al.*, 2014).

6.1.3. Transposições

Transposições são sequências de genes que se podem mover de um local no cromossoma para outro, ou do cromossoma para um plasmídeo transmissível e muitas vezes carregam genes de RA. São constituídos por uma transposase e sequências repetidas invertidas (IRs) nas suas extremidades. As IRs podem acelerar o reconhecimento e a recombinação do alvo, enquanto a transposase catalisa o movimento de segmentos de DNA para outra parte do genoma por um mecanismo de recortar e colar, ou por um mecanismo de transposição replicativa (Mc Dermott *et al.*, 2003; Harbottle *et al.*, 2006; Algarni *et al.*, 2022).

A forma mais simples de um transposição, consiste em sequências de inserção (ISs) contendo apenas os genes necessários para a transposição. Um avanço no modelo de IS é visto em transposições compostas, que consistem numa região central contendo genes diferentes dos necessários para a transposição, por exemplo, genes RA flanqueados em ambos os lados por ISs. Um grande número de determinantes de resistência em muitas espécies bacterianas diferentes, são transmitidos por meio de transposições compostas. Em *Salmonella enterica*, sorovares como Typhimurium e Choleraesuis, possuem transposições compostas em plasmídeos conjugativos, responsáveis pela disseminação de genes RA (Mc Dermott *et al.*, 2003; Harbottle *et al.*, 2006; Algarni *et al.*, 2022).

6.1.4. Mecanismos de Transferência Horizontal de Genes

As bactérias possuem extrema habilidade na aquisição de informação genética necessária para sobreviver em ambientes marcados pela presença de antibióticos. O movimento de elementos móveis de DNA entre as bactérias é uma consequência da troca genética. Assim, três principais mecanismos evolutivos de THG são atualmente reconhecidos, conjugação, transformação e transdução. Estes mecanismos juntos, permitem que os elementos móveis de DNA se espalhem facilmente entre géneros bacterianos distantes e produzam o consequente surgimento e disseminação de múltiplas resistências a antibióticos, testemunhadas em muitas espécies bacterianas (Mc Dermott *et al.*, 2003; Durão *et al.*, 2018).

6.1.4.1. Conjugação

A conjugação é o mecanismo de THG mais estudado e é comumente associado a plasmídeos. Consiste na transmissão unidirecional de DNA de uma célula para outra via pili ou via adesinas e um poro (junção interbacteriana), pelo qual o DNA é transportado (Figura 4). A bactéria doadora é descrita como F+, enquanto a bactéria recetora é chamada F-. A conjugação pode ocorrer entre a mesma espécie bacteriana, mas também pode ocorrer entre populações não relacionadas com distância taxonómica substancial, embora com menor frequência. Trata-se do mecanismo mais importante de transferência horizontal, o qual está amplamente presente nas bactérias (Daubin *et al.*, 2016; Sultan *et al.*, 2018; Zarei-Baygi *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2022).

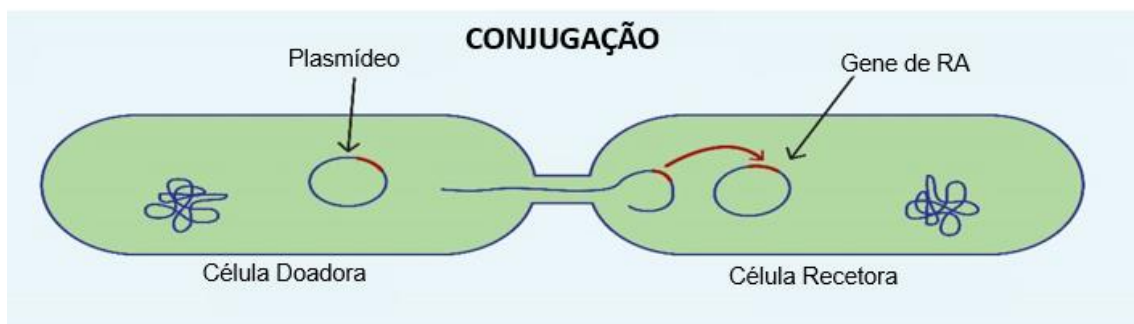


Figura 4 - Mecanismo de transferência horizontal de genes - Conjugação. Adaptado de (Mutuku *et al.*, 2022)

6.1.4.2. Transformação

A transformação ocorre através da absorção direta de DNA extracelular da bactéria doadora lisada, pela bactéria recetora, integrando-o no seu genoma de modo a adquirir novas características (Figura 5). O DNA extracelular é principalmente DNA plasmidial e DNA fragmentado, libertado durante a secreção ativa ou por lise de bactérias, muitas vezes carregando genes de RA (Zarei-Baygi *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2022).

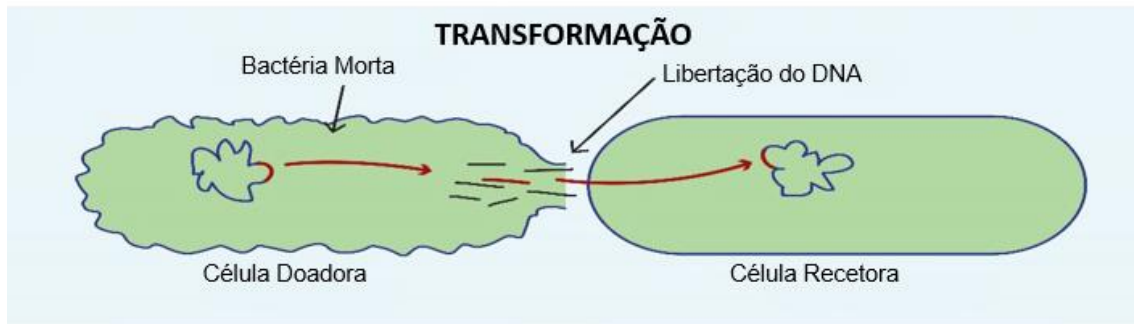


Figura 5 - Mecanismo de transferência horizontal de genes - Transformação. Adaptado de (Mutuku *et al.*, 2022)

6.1.4.3. Transdução

A transdução é um tipo de transferência genética que ocorre através de um bacteriófago que transmite DNA cromossômico ou plasmidial, de uma célula para outra (Figura 6). Bacteriófagos (ou simplesmente fagos), são vírus bacterianos que captam e transferem genes que são vantajosos para o seu hospedeiro microbiano. Os fagos podem coexistir com genes de resistência no mesmo ambiente ecológico e na mesma bactéria, logo, desempenham um papel importante na disseminação de genes de RA (Daubin *et al.*, 2016; Zarei-Baygi *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2022).

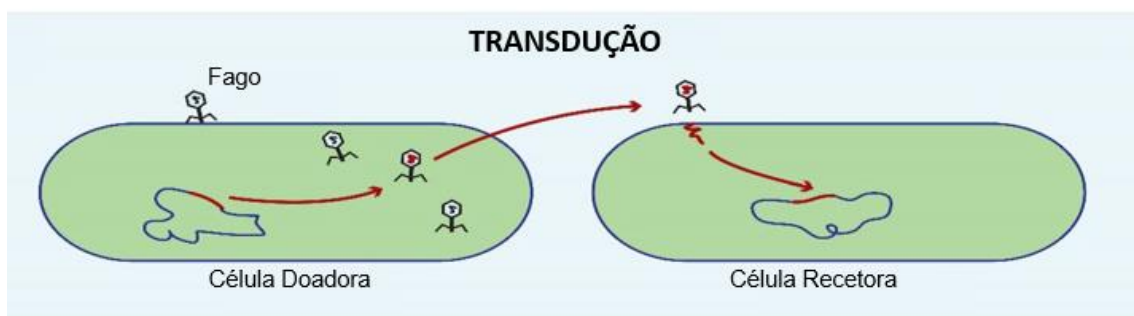


Figura 6 - Mecanismo de transferência horizontal de genes - Transdução. Adaptado de (Mutuku *et al.*, 2022)

7. Mecanismos de Resistência a Antibióticos

Ao longo da sua evolução, a *Salmonella* acumulou um grande número de mecanismos metabólicos e protetores, incluindo a resistência a antibióticos. A resistência a antibióticos em *Salmonella* é atribuída a vários mecanismos, como inativação do antibiótico, alteração do local de ação, diminuição da permeabilidade da membrana externa e ativação de bombas de efluxo (Figura 7) (Abatcha *et al.*, 2014; Castro-Vargas *et al.*, 2020; Chaudhari *et al.*, 2022).

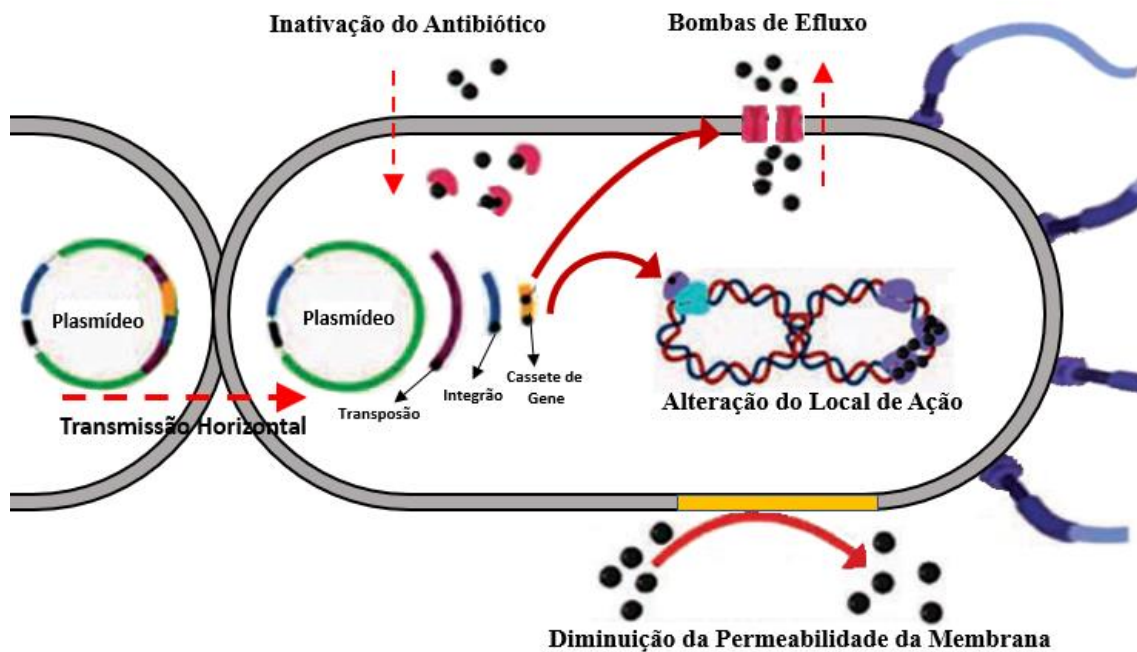


Figura 7 - Mecanismos de resistência aos antibióticos em *Salmonella*. Adaptado de (Castro-Vargas *et al.*, 2020)

7.1. Inativação do Antibiótico

Este é o mecanismo mais comum de resistência, no qual a *Salmonella* altera a substância ativa dos antibióticos, por hidrólise ou através de modificações químicas mediadas pela ação de várias enzimas bacterianas e que catalisam reações de acetilação, fosforilação, adenilação e ribosilação (Castro-Vargas *et al.*, 2020; Chaudhari *et al.*, 2022).

7.2. Alteração do Local de Ação

A *Salmonella* pode adquirir resistência protegendo ou modificando o sítio alvo do antibiótico, que pode ser uma enzima ou uma estrutura celular específica, de modo a que não seja mais suscetível ao medicamento (Ugboko *et al.*, 2014; Castro-Vargas *et al.*, 2020).

7.3. Diminuição da Permeabilidade da Membrana Externa

As bactérias Gram-negativas, incluindo *Salmonella*, comparativamente com as bactérias Gram-positivas têm uma permeabilidade intrínseca mais baixa aos antibióticos. A constituição da membrana externa, composta por fosfolípidos, lipopolissacarídeos e proteínas de membrana, desempenha um papel crucial na redução da entrada dos antibióticos (Chaudhari *et al.*, 2022).

A diminuição da permeabilidade da membrana ocorre quando novas informações genéticas alteram a natureza das proteínas na membrana. Consequentemente, há alteração dos canais de porina do sistema de transporte da membrana, impedindo a passagem de antibióticos (Ugboko *et al.*, 2014; Castro-Vargas *et al.*, 2020).

7.4. Bombas de Efluxo

As bactérias possuem bombas de efluxo, um mecanismo primário e comum de resistência a agentes antimicrobianos. Desempenham um papel significativo na retirada de antibióticos estruturalmente diversos e alguns metabolitos para fora da célula bacteriana.

Os antibióticos entram na célula bacteriana e atingem o citoplasma através da membrana externa, via canais de porina. De seguida, as bombas de efluxo expõem os antibióticos do periplasma para o meio externo (Wójcicki *et al.*, 2021; Alenazy, 2022; Chaudhari *et al.*, 2022).

As bombas de efluxo são proteínas de transporte, codificadas por genes localizados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos. Estas são induzidas sob certos estímulos ambientais, na presença de um substrato adequado ou podem ser expressas constitutivamente (Algarni *et al.*, 2022).

7.5. Mecanismos de Resistência em *Salmonella* por Classe de Antibióticos

Historicamente, os antibióticos têm sido usados como promotores de crescimento desde que se descobriu que pequenas quantidades subterapêuticas de antibióticos administradas a animais na alimentação, poderiam aumentar o peso de aves, suínos e bovinos. O primeiro relato de resistência foi ao cloranfenicol dois anos após a sua introdução no mercado e ocorreu em *Salmonella* Typhi. Desde então, estirpes resistentes a antibióticos foram isoladas em todo o mundo (Figura 8) (Castro-Vargas *et al.*, 2020).

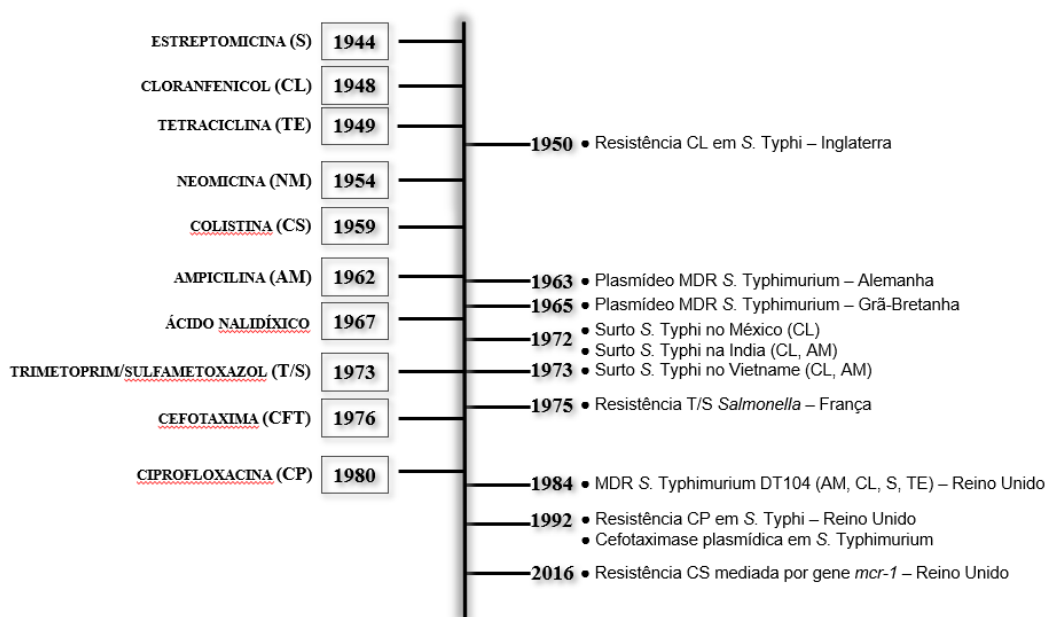


Figura 8 - Linha do tempo representando a implantação de antibióticos e resistências ocorridas em *Salmonella* para esses antibióticos. Adaptado de (Castro-Vargas *et al.*, 2020).

7.5.1. Tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro, que apresentam atividade contra muitas das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, quer sejam aeróbias ou anaeróbias. Atuam por inibição da síntese proteica bacteriana, pois impedem a ligação do tRNA à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, impossibilitando assim a adição de aminoácidos (Abatcha *et al.*, 2014; Pavelquesi *et al.*, 2021).

A atividade de amplo espectro e baixa toxicidade das tetraciclinas levou ao seu uso intensivo na terapia de infecções humanas e animais, desde a sua introdução em 1950. Também, desde então, têm sido usadas por agricultores na criação de animais como promotores de crescimento. Este uso extensivo propiciou o surgimento de resistência às tetraciclinas num grupo diversificado de bactérias o que provocou restrições na sua utilidade clínica (Pavelquesi *et al.*, 2021).

Na maioria das bactérias a resistência às tetraciclinas deve-se à aquisição de elementos genéticos móveis, mutações no local de ligação ribossômica e mutações cromossômicas. Estas resistências levam ao aumento da expressão de mecanismos de resistência às tetraciclinas, como bombas de efluxo dependentes de energia, proteínas de proteção ribossomal ou inativação enzimática (Sultan *et al.*, 2018; Pavelquesi *et al.*, 2021).

Diferentes *tet* genes, *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(G)* e *tet(H)*, foram descritos com capacidade para conferir resistência a tetraciclinas, em sorovares de *Salmonella enterica* não tifoide. Genes *tet(A)* são encontrados em plasmídeos, integrões e cromossomas, enquanto, Genes *tet(B)* são detetados em plasmídeos transferíveis e cromossomas. Os genes que codificam mecanismos de efluxo dependentes de energia são os mais comuns (Abatcha *et al.*, 2014; Divek *et al.*, 2018).

7.5.2. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos estão entre os antibióticos ativos contra bacilos Gram-negativos e geralmente, são usados em associação com outros antibióticos de modo a garantir um amplo espectro de ação. O principal mecanismo de ação envolve a ligação do antibiótico a sequências conservadas dentro do rRNA 16S, da subunidade ribossomal 30S, ligação

que leva à inibição da tradução (Alcaine *et al.*, 2007; Abatcha *et al.*, 2014; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

A resistência aos aminoglicosídeos em *Salmonella* está associada a genes responsáveis pela inativação enzimática do antibiótico, por meio de modificação química. Estes genes estão frequentemente localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposões, o que permite que eles se disseminem entre as bactérias. Relativamente às enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, dividem-se em três grupos denominados de acordo com os tipos de reações que catalisam: acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases (Alcaine *et al.*, 2007; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

As aminoglicosídeos acetiltransferases são codificadas por genes designados *aac*, e normalmente estão localizados em ilhas genômicas de *Salmonella*, integrões e plasmídeos. Essas acetiltransferases conferem resistência aos principais antibióticos deste grupo, como gentamicina e canamicina, catalisando a acetilação dos seus grupos amina. Quanto ao grupo das aminoglicosídeos fosfotransferases, os genes codificantes são conhecidos como *aph (3'')-Ib* e *aph (6)-Id*, também denominados como *strA* e *strB*, respectivamente. São genes encontrados em plasmídeos, abrigados por vários sorovares de *Salmonella* e fornecem resistência à estreptomicina, canamicina e neomicina ao catalisar a fosforilação, dependente de ATP, dos grupos hidroxilo. As nucleotidiltransferases são as últimas do grupo de enzimas que fornece resistência aos aminoglicosídeos, que tal como as fosfotransferases, fosforilam os grupos hidroxilo num processo dependente de ATP. Os genes que codificam estas enzimas são designados como *aad*, também conhecidos como *ant* e foram encontrados em cassetes de genes de integrões. O gene *aadA*, referido como *ant (3'')*, confere resistência à estreptomicina em *Salmonella*, enquanto o gene *aadB*, ou *ant (2')-Ia*, atribui resistência à tobramicina e gentamicina (Abatcha *et al.*, 2014; Divek *et al.*, 2018).

7.5.3. Sulfonamidas e Trimetoprim

Desde o final da década de 60 do século passado, que as sulfonamidas e o trimetoprim têm sido usados em combinação para o tratamento de infecções bacterianas, embora inicialmente, fossem prescritos em separado. Na medicina veterinária, as sulfonamidas

foram os primeiros antibióticos a ser utilizadas em doses terapêuticas. São antibióticos bacteriostáticos, que atuam por inibição competitiva das enzimas envolvidas na síntese do ácido tetrahidrofólico. As sulfonamidas inibem a dihidropteroato sintetase (DHPS) e o trimetoprim inibe a dihidrofolato redutase (DHFR). No entanto, o seu uso excessivo impôs pressões seletivas generalizadas sobre as bactérias, particularmente em bactérias Gram-negativas, isoladas de animais e humanos em todo o mundo (Alcaine *et al.*, 2007; Abatcha *et al.*, 2014; Pavelquesi *et al.*, 2021; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

A resistência às sulfonamidas em bactérias Gram-negativas está associada à presença de genes *sul*, isto é, genes *sul1*, *sul2*, *sul3* e *sul4*, que codificam a DHPS de modo a que, não seja inibida pelo antibiótico. Da mesma forma, a resistência ao trimetoprim é mediada por variantes dos genes *dhfr* e *dfr*, como *dhfr1*, *dfrA1* e *dhfr12*, que codificam a DHFR. A resistência às sulfonamidas e ao trimetoprim também pode ser mediada por mutação cromossômica no gene que codifica as enzimas DHPS e DHFR, respetivamente (Alcaine *et al.*, 2007; Ugboko *et al.*, 2014; Pavelquesi *et al.*, 2021; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Genes *sul1*, *sul2* e *sul3* são os mais comuns nos vários sorovares de *Salmonella*, podem ser transferidos entre bactérias via integrões, transposões, ilhas genómicas de *Salmonella*, ou plasmídeos transferíveis. Já os genes *dhfr* e *dfr*, foram encontrados como parte de cassetes de genes de integrões, também associados com genes *sul1* e *sul3*, em plasmídeos transferíveis carregando outros genes de resistência e em ilhas genómicas de *Salmonella* (Alcaine *et al.*, 2007; Divek *et al.*, 2018; Pavelquesi *et al.*, 2021).

7.5.4. Anfenicóis

Nesta classe de antibióticos estão incluídos o cloranfenicol, outrora fármaco de escolha no tratamento da febre tifoide, e o florfenicol. A produção do cloranfenicol por *Streptomyces venezuelae*, foi descoberta em 1947. O cloranfenicol atua ligando-se ao centro da peptidiltransferase da unidade ribossômica 50s, impedindo a formação de ligações peptídicas. É um antibiótico de amplo espectro contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e a sua eficácia e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica torna-o num fármaco de escolha no tratamento de infeções sistémicas. O desenvolvimento do florfenicol para uso na pecuária, teve como objetivo diminuir a resistência ao

cloranfenicol em humanos, este que foi banido do uso veterinário na Europa em 1994 (Alcaine *et al.*, 2007; Abatcha *et al.*, 2014; Cosby *et al.*, 2015).

Em *Salmonella*, existem dois mecanismos principais de resistência ao cloranfenicol, a inativação enzimática do antibiótico pela cloranfenicol O-acetiltransferase e remoção do antibiótico por bombas de efluxo. A enzima cloranfenicol O-acetiltransferase não tem capacidade de inativar o florfenicol, uma vez que, a posição C3 fluorada no florfenicol não aceita grupos acetilo. Outros mecanismos de resistência ao cloranfenicol em *Salmonella* são descritos, como alteração da permeabilidade da membrana celular externa e mutações cromossômicas que alteram a proteína da subunidade ribossomal 50S (Cosby *et al.*, 2015; Divek *et al.*, 2018; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Os genes que codificam a cloranfenicol O-acetiltransferase são designados, genes *cat*. Os genes *cat1* e *cat2* foram isolados de vários sorovares de *Salmonella* e encontram-se principalmente associados a plasmídeos, transposões ou cassetes de genes. Genes como *cmlA* e *floR* que codificam bombas de efluxo para cloranfenicol e florfenicol, também foram descritos em *Salmonella*, embora o gene *cmlA* não tenha a mesma distribuição. Já o gene *flor*, é amplamente difundido em ilhas genômicas de *Salmonella*, bem como, em muitos plasmídeos diferentes e intimamente associado a multirresistência (Abatcha *et al.*, 2014; Divek *et al.*, 2018; Urban-Chmiel *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022).

7.5.5. Beta-Lactâmicos

Os β -lactâmicos são compostos por 4 grupos principais, as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams. O mecanismo de ação destes antibióticos é mediado pela capacidade de interferirem nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs), envolvidas na síntese do peptidoglicano, um componente da parede celular bacteriana. Os β -lactâmicos são geralmente bactericidas, mas a atividade varia entre os β -lactâmicos, organismos e PBPs alvo. Em *Salmonella*, a inibição das PBPs leva à atividade bactericida (Abatcha *et al.*, 2014; Cosby *et al.*, 2015).

O mecanismo mais comum de resistência aos β -lactâmicos em *Salmonella*, é a secreção de β -lactamases, enzimas que hidrolisam a estrutura do anel β -lactâmico, produzindo β -aminoácidos sem atividade antimicrobiana. Existem vários esquemas de classificação

para β -lactamases. A classificação de Ambler é a mais utilizada, divide as β -lactamases em quatro classes, A, B, C e D, com base nas suas sequências de aminoácidos (Alcaine *et al.*, 2007).

Em geral, as β -lactamases de classe A são as mais relatadas em *Salmonella*, codificadas por genes encontrados em plasmídeos que conferem uma gama de resistência contra penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos. Na classe A, a família de enzimas do tipo TEM é a mais prevalente em *Salmonella*. Estas são codificadas por genes como *bla_{TEM-1}* e *bla_{TEM-52}*. Outros genes foram encontrados, como *bla_{KPC-2}* que confere resistência ao imipenemo. Ainda o gene *bla_{PSE-1}*, igualmente conhecido na literatura como *bla_{CARB-2}*, também identificado em vários sorovares de *Salmonella*, tal como, o surgimento de genes *bla_{CTX-M}*, que conferem resistência à ampicilina e cefalosporinas (Alcaine *et al.*, 2007; Abatcha *et al.*, 2014).

As β -lactamases de classe C, são a segunda classe mais comum em *Salmonella* que propicia resistência contra cefalosporinas, como cefoxitina e ceftiofur. Estas β -lactamases denominam-se AmpC e são mediadas por plasmídeos, já que a *Salmonella* não transporta o gene AmpC cromossômico. Entre as β -lactamases AmpC mediadas por plasmídeos, as CMY codificadas pelo gene *bla_{CMY-2}*, têm sido associadas à resistência ao ceftiofur e desta forma, mediar a resistência cruzada, ou reduzir a suscetibilidade à ceftriaxona, antibiótico de escolha para o tratamento de infeções por *Salmonella* em crianças. Outros genes que codificam β -lactamases de classe C, como *bla_{CMY-4}* e *bla_{CMY-7}*, também foram encontrados em alguns sorovares de *Salmonella* (Philippe *et al.*, 2005; Alcaine *et al.*, 2007; Abatcha *et al.*, 2014; Crump *et al.*, 2015).

A classe B, corresponde às metalo- β -lactamases, enzimas que conferem resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos e que não são comumente encontradas em *Salmonella*. Contudo, foram já identificadas β -lactamases de classe B mediadas por plasmídeos em diferentes sorovares de *Salmonella*, codificadas por genes *bla_{VIM-1}* e *bla_{NDM-5}* (Abatcha *et al.*, 2014; Mthembu *et al.*, 2021).

Por fim, as β -lactamases de classe D, do tipo OXA. Enzimas ligadas à resistência à ampicilina, cefalocitina e que possuem forte atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina. Apesar de serem incomuns, alguns sorovares de *Salmonella* já foram

identificados na presença de genes *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-30}* e *bla_{OXA-48}* (Abatcha *et al.*, 2014; Divek *et al.*, 2018).

7.5.6. Quinolonas

Quinolonas e fluorquinolonas são antibióticos sintéticos bactericidas, que contêm um núcleo de quinolona ou naftiridona. O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona aprovada para uso médico. Várias gerações de quinolonas foram desenvolvidas com base na modificação do ácido nalidíxico e resultou na introdução das fluorquinolonas, a primeira das quais a norfloxacin, através da conjugação de um átomo de flúor na posição C6 (Alcaine *et al.*, 2007; Cosby *et al.*, 2015; Shaheen *et al.*, 2021).

As quinolonas funcionam bloqueando a replicação e a transcrição do DNA bacteriano, ambas necessárias para o funcionamento adequado da célula. Têm como alvo as topoisomerase bacterianas do tipo II, em específico, a DNA girase e a DNA topoisomerase IV, as quais são codificadas pelos genes *gyrA*, *gyrB* e *parC*, *parE*, respectivamente. Assim, a inibição destas enzimas pelas quinolonas, resulta na morte bacteriana (Cuypers *et al.*, 2018; Ndako *et al.*, 2022).

A pressão de seleção imposta pelo uso de antibióticos como as quinolonas, levou bactérias, incluindo *Salmonella*, a desenvolver uma variedade de mecanismos de evasão, como expressão de proteínas cromossômicas e codificadas por plasmídeos. A resistência às quinolonas em *Salmonella*, tem sido associada a dois mecanismos. O mecanismo regularmente identificado, é mediado por mutações alvo na região determinante da resistência às quinolonas (QRDR), nos genes *gyrA*, *gyrB* e *parC*. O segundo mecanismo, envolve alterações na expressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC, como resultado de mutações nos seus genes reguladores. A superexpressão deste sistema de efluxo, resulta na diminuição da sensibilidade da bactéria às quinolonas (Alcaine *et al.*, 2007; Shaheen *et al.*, 2021; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Além dos mecanismos mutacionais, genes de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR), também ocorrem em *Salmonella*. São isolados com alta frequência genes *qnrD*, bem como as variantes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, que codificam proteínas protetoras de ligação à topoisomerase do DNA. Os genes *qepA* e *qxAB* codificam bombas de efluxo

específicas de quinolonas. Referência também para o gene *aac(6')-Ib-cr* encontrado em *Salmonella*, o qual codifica uma enzima que diminui a atividade das quinolonas (Michael *et al.*, 2016; Cuypers *et al.*, 2018; Divek *et al.*, 2018).

7.5.7. Macrólidos

Os antibióticos da classe dos macrólidos inibem a síntese de proteínas bacterianas pela ligação ao rRNA 23S, na grande subunidade ribossomal 50S. A exemplo do que sucede em outras classes de antibióticos, vários mecanismos de resistência aos macrólidos têm sido identificados em diferentes espécies bacterianas (Fyfe *et al.*, 2016; Hooda *et al.*, 2020).

Relativamente à *Salmonella*, esta é intrinsecamente resistente à eritromicina através da bomba de efluxo AcrAB, mas naturalmente suscetível à azitromicina. No entanto, a resistência emergente contra a azitromicina, o único antibiótico oral remanescente para tratar a febre tifoide extensivamente resistente (XDR), tem suscitado preocupação. Desde o primeiro relato de resistência à azitromicina no Bangladesh em 2019, outros casos foram relatados no Nepal, Índia e Paquistão. A base genética desta resistência é uma mutação pontual na posição do aminoácido 717 (R717Q/L), na bomba de efluxo codificada pelo gene *acrB* (Gunell *et al.*, 2010; Sajib *et al.*, 2021).

Outros mecanismos de resistência à azitromicina em *Salmonella*, estão ligados a mutações nos nucleótidos A2058 e A2059 do 23S rRNA, inclusive, mutações nos genes *rlpD* e *rlpV* que codificam, respetivamente, a alteração das proteínas L4 e L22 da subunidade ribossomal 50S (Heidary *et al.*, 2022).

7.5.8. Colistina

A colistina é um antibiótico polipeptídico pertencente à classe das polimixinas, classe com atividade contra a generalidade das bactérias Gram-negativas. É composta pelas polimixinas A, B, C, D e E, das quais, apenas a colistina (polimixina E) e a polimixina B são utilizadas na prática clínica. A colistina desloca competitivamente os cátions divalentes dos lípidos da membrana, ligando-se ao lípido A do lipopolissacarídeo (LPS),

na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Esta interação eletrostática entre a colistina catiónica e o LPS carregado negativamente, leva à desorganização da membrana externa, com o consequente vazamento do conteúdo bacteriano e morte celular (Apostolakos *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Mthembu *et al.*, 2021).

Em *Salmonella enterica*, a resistência cromossômica à colistina envolve a ativação dos sistemas reguladores de dois componentes PmrA/PmrB e PhoP/PhoQ, responsáveis pela biossíntese de L-Ara4N e PEtn. A ativação é feita por estímulos ambientais ou por mutações específicas, nesses mesmos sistemas reguladores de dois componentes que codificam genes. Estas mutações levam à expressão constitutiva de PmrA/PmrB e PhoP/PhoQ, com consequente adição permanente de L-Ara4N e PEtn, ao lípido A do LPS. Desta forma, há redução da afinidade da colistina para a superfície bacteriana (Apostolakos *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019).

Também a resistência à colistina mediada por plasmídeos, conferida por genes *mcr*, foi identificada em diferentes sorovares de *Salmonella enterica*. Além disso, os genes *mcr* podem ser localizados em plasmídeos que codificam outros genes de resistência, como *bla_{CTX-M}*, *floR* e *qnr*, originando cepas multirresistentes. Em novembro de 2015, foi relatado na China o surgimento de um gene de resistência mediado num plasmídeo transferível, chamado *mcr-1*, o qual mudou a resistência à colistina de um problema contido, para uma questão global. Também na China, foi detetado o gene *mcr-1* em *Salmonella* Indiana, que expressou co-resistência à ciprofloxacina, cefotaxima e colistina. Inclusive, este mesmo gene transferível de resistência à colistina, *mcr-1*, foi já detetado em isolados de *Salmonella* no Reino Unido, Espanha, Portugal e França (Michael *et al.*, 2016; Apostolakos *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2022).

8. Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Salmonella*

A caracterização de uma bactéria além do nível de espécie e/ou subespécie define-se como subtipagem bacteriana (Ferrari *et al.*, 2017). Assim, o desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis para a caracterização de *Salmonella*, tem impacto significativo em qualquer etapa da produção de alimentos e no controlo de infeções causadas por esta bactéria (Wattiau *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2019).

Os métodos tradicionais de subtipagem incluem abordagens com base no fenótipo, como sorotipagem, fagotipagem e perfil de resistência antimicrobiana, nos quais os organismos são agrupados de acordo com o resultado da expressão do seu genótipo (Ferrari *et al.*, 2017). No entanto, durante as últimas décadas assistiu-se ao desenvolvimento de métodos moleculares alternativos, a maioria deles baseados nas diferenças entre genomas bacterianos em vez das suas características fenotípicas e com maior sensibilidade de subtipagem. Como métodos de genotipagem destacam-se, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), análise de repetição em tandem de número variável de múltiplos locus (MLVA), tipagem de sequência multilocus (MLST), repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR), ribotipagem, sequenciação do genoma completo (WGS), identificação de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (Wattiau *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2017; Mthembu *et al.*, 2021).

Tais métodos podem preencher a lacuna deixada pelas abordagens fenotípicas e fornecer maior precisão, crucial para investigações epidemiológicas. Logo, devem ser capazes de diferenciar estirpes não relacionadas entre si, permitindo agrupar todos os isolados associados à mesma fonte, mantendo-se assim o mais próximo possível a classificação atual de *Salmonella* em subespécies e sorovares (Wattiau *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2017). Nos pontos a seguir, serão descritos os métodos fenotípicos e genotípicos acima referidos, usados na subtipagem de *Salmonella*.

8.1. Métodos Fenotípicos

Embora hoje em dia a genotipagem se tenha tornado rotina, métodos fenotípicos, como sorotipagem e fagotipagem, por vezes combinados com perfil de resistência antimicrobiana, são as técnicas de escolha para a atribuição clássica de fontes de *Salmonella*. Em alguns casos particulares, estas abordagens possuem poder discriminatório suficiente para explorar a origem das diferentes estirpes (Ferrari *et al.*, 2017).

8.1.1. Sorotipagem

Nos últimos 90 anos, a subtipagem de *Salmonella enterica* tem sido realizada rotineiramente por sorotipagem. Com base no esquema de White-Kauffmann-Le Minor, este método classifica o género *Salmonella* em sorovares a partir dos antígenos de superfície, os antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Estes são altamente variáveis, com 67 O e 114 H identificados através de reações de aglutinação com antissoros específicos. Na superfície de uma única célula podem ser expressos vários antígenos O, por contraste, apenas uma única proteína flagelar é expressa de cada vez, apesar da maioria dos sorovares de *Salmonella* possuir duas cópias diferentes do gene que codifica a proteína flagelar. A maioria destes isolados são, portanto, denominados difásicos, H1 e H2 relativamente aos antígenos flagelares (Grimont *et al.*, 2007; Wattiau *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2019).

Todas estas variações tornam a sorotipagem de *Salmonella* um processo complexo, pois os sorovares são determinados pela combinação dos antígenos O, H1 e H2. Logo, devido à grande variedade de sorovares, um laboratório necessita manter mais de 250 antissoros de tipagem de alta qualidade e 350 antígenos diferentes para sorotipagem convencional de *Salmonella*. O tempo de resposta para a sorotipagem de um único isolado é habitualmente superior a 3 dias, noutros casos, pode demorar muito mais tempo, pois várias reações de aglutinação podem ser necessárias. A sorotipagem tradicional é, portanto, demorada, trabalhosa, exige técnicos bem treinados e experientes. Não fornece informações sobre parentesco genético e perspectivas evolutivas entre os sorovares de *Salmonella*, no entanto, ainda é definido como o método de referência e comumente usado como triagem inicial, seguido de subtipagem molecular para identificar cepas relacionadas num determinado surto (Wattiau *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2019; Wan Makhtar *et al.*, 2021).

8.1.2. Fagotipagem

Desde meados da década de 90, a tipagem fágica provou ser uma valiosa ferramenta na caracterização de estirpes de *Salmonella*, para atribuição de fontes e investigações de surtos. Os bacteriófagos são predominantes na natureza, definem-se como vírus com

capacidade para infectar e lisar bactérias. A fagotipagem é usada para discriminar estirpes de *Salmonella* pertencentes ao mesmo sorovar, com base na capacidade de um determinado fago para lisar seletivamente a estirpe investigada. Inicialmente, esta técnica foi projetada para *Salmonella enterica* sorovar Typhi, *Salmonella enterica* sorovar Paratyphi A e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, que são conhecidos por serem bastante monofiléticos, embora posteriormente, o método tenha sido estendido para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e alguns outros sorovares (Wattiau *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2019).

Este método é limitado, devido ao baixo número de fagos disponíveis, necessita de padronização para garantir a comparação entre os laboratórios e reprodutibilidade do ensaio. Além disso, a tipagem de fagos requer experiência na interpretação dos resultados, uma biblioteca de fagos e metodologia precisa. A vantagem da fagotipagem reside na simplicidade da sua implementação, técnica na qual, apenas são necessários equipamentos básicos de laboratório (Wattiau *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2017).

8.1.3. Perfil de Resistência Antimicrobiana

Os perfis de resistência obtidos pelo método de Kirby-Bauer combinados com a análise de cluster, podem fornecer dados de tipagem valiosos, complementares a outras abordagens. Apesar de alguns mecanismos de resistência serem muito estáveis, como algumas mutações situadas em genes cromossômicos, a transferência horizontal de genes entre estirpes, reduz a relevância deste método para fins epidemiológicos, isto porque, diferentes linhagens podem ao mesmo tempo desenvolver padrões de resistência semelhantes, assim como, isolados pertencentes a uma mesma linhagem podem diferir no perfil de sensibilidade. Assim, o perfil de resistência antimicrobiana tem sido usado com menos frequência como uma abordagem de subtipagem para estudar a correlação entre estirpes de *Salmonella* e não é um indicador adequado para análise de surtos quando usado sozinho (Ferrari *et al.*, 2017).

8.2. Métodos Genotípicos

Os métodos genotípicos acedem aos elementos genéticos do DNA cromossômico e/ou extracromossômico, o que permite a diferenciação entre linhagens intimamente relacionadas. O alto nível de discriminação entre espécies relacionadas obtidas por abordagens genômicas, gera resultados completos e por isso, são ferramentas valiosas para rastrear a presença de *Salmonella*, os genes resistentes a antimicrobianos associados e explicar como as características fenotípicas evoluem nos microrganismos ao longo do tempo. É, portanto, vital incluir estes métodos na monitorização e caracterização de *Salmonella* (Ferrari et al., 2017; Mthembu et al., 2021).

8.2.1. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O método de PFGE foi descrito pela primeira vez em 1984 e desenvolvido como método de subtipagem para *Salmonella* na década de 90. Tem sido usado por autoridades de saúde pública e entidades reguladoras alimentares para investigações de surtos e rastreio de fontes a nível global (Ferrari et al., 2017; Tang et al., 2019).

Esta técnica tem por base, o uso enzimas de restrição que reconhecem locais específicos ao longo do DNA genômico e fragmentam esse DNA em tamanhos diferentes. Os fragmentos são depois separados em gel de agarose, onde é aplicado um campo pulsado. A interpretação dos resultados é baseada num protocolo padronizado e permite a comparação do padrão PFGE de um determinado isolado, através de um banco de dados formado por padrões PFGE coletados num país ou região (Wattiau et al., 2011; Tang et al., 2019; Mthembu et al., 2021).

Embora a PFGE seja usada com sucesso há mais de três décadas na subtipagem de *Salmonella* em humanos, alimentos e animais de produção, esta abordagem é demorada, além de que, não revela nenhuma informação genética, como potencial de virulência ou presença de genes de resistência antimicrobiana, pois os fragmentos de DNA são separados por tamanho e não por sequência. Outra limitação relacionada com a capacidade discriminatória, prende-se com ocorrências genéticas únicas, como integração, polimorfismos de nucleótido único, eventos de recombinação ou deleção, que

podem resultar em diferenças nas impressões digitais do DNA (Ferrari *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2019).

8.2.2. Análise de Repetição em Tandem de Número Variável de Múltiplos Locus (MLVA)

A MLVA é um dos métodos de subtipagem mais populares usados na vigilância da saúde pública e investigação de surtos de *Salmonella*, especialmente na Europa. A MLVA, geralmente, é realizada após sorotipagem ou PFGE para vigilância de rotina como técnica complementar na caracterização de *Salmonella* (Tang *et al.*, 2019).

Este método baseia-se na determinação da variação do número de sequências de DNA repetidas em tandem, referidas como repetições em tandem de número variável (VNTR), em várias regiões do genoma bacteriano de modo a caracterizar isolados bacterianos. As VNTR podem variar em tamanho, como em sequência de nucleotídeos, mesmo entre estirpes da mesma espécie e sorovar (Ferrari *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2019).

O método provou ser muito útil para detetar e investigar surtos, pois tem a capacidade de diferenciar estirpes estreitamente relacionadas. É tecnicamente simples, rápido e barato de executar em comparação com outros métodos. Além disso, a MLVA demonstra boa repetibilidade e reprodutibilidade internacional para sorovares específicos, como *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. Uma grande desvantagem da MLVA para subtipagem de *Salmonella* é que, os protocolos de MLVA mais eficazes descritos até agora são específicos para um sorovar, portanto, os isolados devem ser sorotipados antes de selecionar um esquema de MLVA específico para subtipagem adicional (Wattiau *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2019).

8.2.3. Tipagem de Sequência Multilocus (MLST)

Um primeiro esquema de MLST foi desenvolvido em 2002 para estudar a clonalidade de *Salmonella* Typhi e a sua divergência com as demais subespécies de *Salmonella enterica*. Posteriormente, em 2012, foi estendido a todos os outros sorovares (Wattiau *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2019).

É uma abordagem baseada nas variações que ocorrem naturalmente na sequência de DNA de sete genes housekeeping, *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA*, geralmente usando a tecnologia de sequenciação de Sanger. É usado principalmente em estudos de pesquisa, avaliando a genética populacional e evolução da *Salmonella* (Ferrari *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2019).

Um grande benefício do uso da MLST é que, além da subtipagem de bactérias, fornece inúmeras sequências que podem ser analisadas de diferentes maneiras para estudo da estrutura da população e evolução de estirpes bacterianas. Além disso, esta técnica é altamente reprodutível e possui uma nomenclatura padronizada internacionalmente, permitindo gerar resultados inequívocos. No entanto, é uma técnica com alto custo, é extremamente trabalhosa, demorada e pode até ser insuficientemente discriminatória para uso rotineiro em investigações de surtos e vigilância de uma bactéria em específico (Achtman *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2017).

8.2.4. Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR)

Foi identificada em algumas espécies bacterianas, incluindo *Salmonella*, uma nova família de sequências curtas repetidas (SSRs) no DNA. Estas SSRs foram chamadas de CRISPR e são formadas por DNA conservado em repetições diretas, separado por sequências variáveis, designadas espaçadores. Estes contêm comprimentos variáveis e são obtidos de ácidos nucleicos estranhos de plasmídeos ou bacteriófagos. É precisamente nos espaçadores das CRISPR que reside a base desta técnica, na medida em que, estes são adquiridos ou perdidos durante a evolução da bactéria ao longo do tempo de maneira sequencial, construindo assim um conjunto único de padrões de sequência de DNA, de modo a fornecer resolução suficiente para a subtipagem bacteriana (Ferrari *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2019).

Este método tem-se mostrado viável na subtipagem de *Salmonella*, afirmando-se pela robustez, rapidez e alto rendimento. No entanto, é uma técnica cara, pouco usada a nível internacional, pois não possui protocolo padronizado e depende de bases de dados interlaboratoriais (Ferrari *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2019).

8.2.5. Ribotipagem

A ribotipagem, é também conhecida como método de análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP). O princípio da técnica assenta nos operões de ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) bacterianos altamente conservados, os quais são flanqueados por regiões de DNA variáveis. Através da enzima de restrição PvuII, geralmente usada em *Salmonella*, o DNA bacteriano é digerido. Após eletroforese em gel e transferência dos fragmentos para uma membrana, eles são sondados com uma região do operão de rRNA para revelar os padrões de genes rRNA, a fim de serem interpretados. Nesse sentido, o uso da enzima de restrição PvuII aumenta a incidência desses mesmo padrões de ribotipagem, para os sorovares de *Salmonella* mais comuns (Bailey *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2017).

Devido à sua complexidade técnica, este método não é escolha habitual na subtipagem bacteriana, até porque, são raros os resultados equivalentes entre diferentes laboratórios. Além disso, a ribotipagem não pode ser usada na subtipagem massiva de *Salmonella* para estudos de atribuição de fonte, devido ao seu baixo poder discriminatório (Ferrari *et al.*, 2017).

8.2.6. Sequenciação do genoma completo (WGS)

Antes da maturação da WGS eram maioritariamente usadas as técnicas já citadas, as quais apresentam dificuldade na padronização e resolução mais baixa. A WGS veio em muito melhorar o espectro analítico e resolução dos dados obtidos, o que permite um melhor rastreio de isolados no suprimento de alimentos e aumento de rastreios epidemiológicos durante situações de surto. Logo, tornou-se um método de sequenciação muito mais rotineiro e o mais avançado da última década (Bell *et al.*, 2016; Ricke *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020).

A partir desta técnica, é possível sequenciar todo o genoma bacteriano em questão de horas e detetar diferenças apenas de nucleótidos únicos no genoma, o que permite a distinção de cepas de alta clonalidade em surtos de origem alimentar de *Salmonella* até ao nível da origem de produção (Bell *et al.*, 2016; Ferrari *et al.*, 2017).

Assim a WGS, simplifica os testes laboratoriais, suplantando esquemas de tipagem fenotípicos e genotípicos menos robustos. Prediz com precisão os padrões de suscetibilidade antimicrobiana, determina o sorotipo e fornece vários perfis de virulência para uma única estirpe de *Salmonella*, viabilizando como nenhuma outra técnica a realização de estudos epidemiológicos logo que ocorre um surto. A WGS terá cada vez mais peso na investigação de incidentes por contaminação na indústria alimentícia, pelo aumento da facilidade de uso e pela diminuição do custo (Bell *et al.*, 2016; Ferrari *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2019).

8.2.7. Identificação de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs)

Uma abordagem frequentemente usada para explorar dados de WGS é a identificação de SNPs. A concepção de que, os SNPs podem ser usados para traçar algumas diferenças taxonômicas em *Salmonella* não é nova e tem sido avaliada (Ricke *et al.*, 2018; Gal-Mor, 2019).

A análise de SNPs, utiliza alterações de nucleótidos em posições específicas no genoma bacteriano para a discriminação entre estirpes. Os SNPs, muitas vezes são estáveis no genoma bacteriano e como tal, são analisados comparando os dados de sequência de isolados de interesse contra um genoma de referência. Podem ser usados para capturar o aspecto microevolutivo das diferenças de sequência bastante mínimas em genes únicos, distinguir isolados e rastrear surtos. Trata-se, portanto, de outra abordagem valiosa e poderosa para subtipagem de *Salmonella* (Ricke *et al.*, 2018; Gal-Mor, 2019; Mthembu *et al.*, 2021).

8.2.8. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica desenvolvida na década 80 que revolucionou a biologia molecular, permitindo a amplificação rápida e exponencial de sequências de DNA alvo, usando um primer de PCR direto e reverso e uma enzima conhecida como DNA polimerase. A PCR convencional compreende três etapas: (i) desnaturação do DNA de fita dupla a 95°C, (ii) associação dos primers de PCR entre 50° a 60°C e (iii) síntese do DNA a 72°C. A PCR é

usada rotineiramente em laboratórios de microbiologia para detectar quaisquer genes que possam estar presentes nas bactérias. O produto do gene amplificado por PCR pode ser visualizado executando géis de agarose e outros corantes fluorescentes quelantes de DNA (Anjum *et al.*, 2017; Green *et al.*, 2019).

Desde o desenvolvimento da PCR, houve vários avanços, que incluem a PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa (qPCR). A principal diferença entre a PCR convencional e a PCR em tempo real é que nesta última, a amplificação da sequência de DNA alvo é monitorizada em tempo real à medida que ocorre, e não no final, devido à presença de corantes fluorescentes na reação. Os ensaios de PCR convencionais são adequados para detectar a presença ou ausência de genes (de resistência), mas são menos adequados para a detecção de mutações pontuais nos genes alvo (Anjum *et al.*, 2017).

O avanço para a detecção mais rápida de *Salmonella* tem estado no reino da biologia molecular, onde PCR e qPCR estão a ser predominantemente aplicados como métodos de escolha para a etapa de caracterização entre sorovares. Embora as vantagens óbvias dos ensaios de PCR/qPCR sejam a rapidez na obtenção do resultado, sensibilidade e especificidade da detecção, também existem desvantagens. Estas incluem a necessidade de equipamentos caros e pessoal treinado, a purificação do DNA para a reação de PCR/qPCR e a necessidade de cultivar as amostras para atingir o limite de detecção (Bell *et al.*, 2016; Guyassa *et al.*, 2022).

III. CONCLUSÃO

Com esta dissertação tinha-se como objetivo, compreender a gênese da resistência aos antibióticos em *Salmonella*, identificando os mecanismos de disseminação de genes de resistência, o modo pelo qual estes influenciam a ação da bactéria na presença de diferentes classes de antibióticos, bem como, a existência de métodos de caracterização fenotípica e genotípica cruciais para se entender o comportamento da *Salmonella*.

Após esta revisão bibliográfica, fica perceptível que ao longo dos anos o tratamento de primeira linha para infecções provocadas por *Salmonella* esgotou-se. Antibióticos como, ampicilina, cloranfenicol ou trimetoprim-sulfametoxazol, eram inicialmente utilizados. As opções alternativas recaíram na ciprofloxacina (fluorquinolona) ou ceftriaxona (cefalosporina de 3.^a geração). No entanto, dados comprovam a existências de falhas no tratamento de infecções por *Salmonella*, com estes dois antibióticos. Isto sucede porque a *Salmonella*, tal como as demais bactérias, tem a capacidade de integrar no seu genoma novas informações genéticas, através de mutações cromossômicas, mas sobretudo, pela aquisição de genes por transferência horizontal, veiculados em elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposões e integrões.

Estes genes adquiridos, podem ser genes que codificam resistência a antibióticos e assim alteram o fenótipo bacteriano. É neste sentido, que atualmente, há cada vez mais sorovares de *Salmonella* a expressarem fenótipos de multirresistência, isto é, resistência a pelo menos três classes de antibióticos, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol. Além disso, estão a surgir com frequência, sorovares extensivamente resistentes, pois além de expressarem multirresistência, exibem resistência acrescida para mais duas classes de antibióticos, as fluorquinolonas e cefalosporinas.

Assim, o surgimento de técnicas genotípicas, mais do que as técnicas fenotípicas, foram um grande avanço no sentido da caracterização genética bacteriana. Em particular, a sequenciação do genoma completo fornece informações relativas a alterações do genoma, permitindo explicar ao pormenor o motivo pelo qual surgem os fenótipos de resistência a antibióticos.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Abatcha, M. *et al.* (2014). Review Article: A trends of Salmonella and antibiotic resistance. *Advances in Life Science and Technology*, 17, pp. 9–21.
- Achtman, M. *et al.* (2012). Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLOS Pathogens*, 8(6), pp. 1–19.
- Afolami, O. I. e Onifade, A. K. (2018). Antibiotic Resistant *Salmonella* spp: Mechanism of Drug Resistance, Gene Variations and Clinical Implications. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 4(4), pp. 1–6.
- Agbaje, M. *et al.* (2011). Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol (Praha)*, 56(6), pp. 497–503.
- Akram, J. *et al.* (2020). Extensively Drug-Resistant (XDR) Typhoid: Evolution, Prevention, and Its Management. *Biomed Res Int*, 2020, pp. 1–7.
- Alcaine, S. D. *et al.* (2005). Ceftiofur-resistant *Salmonella* strains isolated from dairy farms represent multiple widely distributed subtypes that evolved by independent horizontal gene transfer. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(10), pp. 4061–4067.
- Alcaine, S. D., Warnick, L. D. e Wiedmann, M. (2007). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *J Food Prot*, 70(3), pp. 780–790.
- Alenazy, R. (2022). Antibiotic resistance in *Salmonella*: Targeting multidrug resistance by understanding efflux pumps, regulators and the inhibitors. *Journal of King Saud University - Science*, 34(7), pp. 1–8.
- Algarni, S. *et al.* (2022). The Dynamics of the Antimicrobial Resistance Mobilome of *Salmonella enterica* and Related Enteric Bacteria. *Front Microbiol*, 13, pp. 1–19.
- Anjum, M. F., Zankari, E. e Hasman, H. (2017). Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. *Microbiol Spectr*, 5(6), pp. 1–17.

- Apostolakos, I. e Piccirillo, A. (2018). A review on the current situation and challenges of colistin resistance in poultry production. *Avian Pathol*, 47(6), pp. 546-558.
- Arber, W. (2014). Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *Life (Basel)*, 4(2), pp. 217–224.
- Bailey, J. S. *et al.* (2002). Serotyping and Ribotyping of Salmonella Using Restriction Enzyme PvuII. *Journal of Food Protection*, 65(6), pp. 1005–1007.
- Bell, R. L. *et al.* (2016). Recent and emerging innovations in Salmonella detection: a food and environmental perspective. *Microb Biotechnol*, 9(3), pp. 279–292.
- Campos, J. *et al.* (2019). Non-typhoidal Salmonella in the Pig Production Chain: A Comprehensive Analysis of Its Impact on Human Health. *Pathogens*, 8(1), pp. 1–28.
- Carattoli, A. (2003). Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Issues Mol Biol*, 5(4), pp. 113–122.
- Castro-Vargas, R. E. *et al.* (2020). Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. *Vet World*, 13(10), pp. 2070–2084.
- Castro-Vargas, R. E., Herrera-Sánchez, M. P. e Rondón-Barragán, I. S. (2021). Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Class 1 Integron in *Salmonella* Heidelberg Isolated from Poultry Farms in Santander - Colombia. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 23, pp. 1–8.
- Chandankhede, S. A. *et al.* (2022). A review on typhoid infectious bacterial disease. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 11(17), pp. 669–680.
- Chaudhari, R., Singh, K. e Kodgire, P. (2022). Biochemical and molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Salmonella* spp. *Res Microbiol*, 174(1-2), pp. 1–16.
- Chen, J., Karanth, S. e Pradhan, A. K. (2020). Quantitative microbial risk assessment for *Salmonella*: Inclusion of whole genome sequencing and genomic epidemiological studies, and advances in the bioinformatics pipeline. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, pp. 1–16.

- Cosby, D. E. *et al.* (2015). Salmonella and antimicrobial resistance in broilers: A review. *Journal of Applied Poultry Research*, 24(3), pp. 408–426.
- Crump, J. A. *et al.* (2015). Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections. *Clin Microbiol Rev*, 28(4), pp. 901–937.
- Cuypers, W. L. *et al.* (2018). Fluoroquinolone resistance in Salmonella: insights by whole-genome sequencing. *Microb Genom*, 4(7), pp. 1–9.
- Daubin, V. e Szöllösi, G. J. (2016). Horizontal Gene Transfer and the History of Life. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(4), pp. 1–11.
- Deng, X. *et al.* (2015). Comparative analysis of subtyping methods against a whole-genome-sequencing standard for *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *J Clin Microbiol*, 53(1), pp. 212–218.
- Divek, V. T. N., Venkitanarayanan, K. e Kollanoor Johny, A. (2018). Antibiotic-Resistant Salmonella in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Foods*, 7(10), pp. 1–24.
- Durão, P., Balbontín, R. e Gordo, I. (2018). Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol*, 26(8), pp. 677–691.
- ECDC (2020). Typhoid and paratyphoid fevers. In: *ECDC Annual epidemiological report for 2017*. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control.
- EFSA/ECDC (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. Parma, Italy, European Food Safety Authority/ European Centre for Disease Prevention and Control.
- Eng, S. K. *et al.* (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), pp. 284–293.
- Evangelopoulou, G. D., Bourriel, A. e Spyrou, V. (2018). A concise history of *Salmonella* spp. nomenclature. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61(4), pp. 323–329.

- Fernández, J., Guerra, B. e Rodicio, M. R. (2018). Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food. *Vet Sci*, 5(2), pp. 1–13.
- Ferrari, R. G., Panzenhagen, P. H. N. e Conte-Junior, C. A. (2017). Phenotypic and Genotypic Eligible Methods for *Salmonella* Typhimurium Source Tracking. *Front Microbiol*, 8, pp. 1–21.
- Fyfe, C. *et al.* (2016). Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(10), pp. 1–37.
- Gal-Mor, O. (2019). Persistent Infection and Long-Term Carriage of Typhoidal and Nontyphoidal *Salmonellae*. *Clin Microbiol Rev*, 32(1), pp. 1–31.
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C. e Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front Microbiol*, 5, pp. 01–10.
- Gharieb, R. M., Tartor, Y. H. e Khedr, M. H. (2015). Non-Typhoidal *Salmonella* in poultry meat and diarrhoeic patients: prevalence, antibiogram, virulotyping, molecular detection and sequencing of class I integrons in multidrug resistant strains. *Gut Pathog*, 7(34), pp. 01–11.
- Green, M. R. e Sambrook, J. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc*, 2019(6), pp. 1–22.
- Grimont, P. A. D. e Weill, F. X. (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars, 9th Edition. *World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella*. Institut Pasteur, Paris.
- Guard, J. (2022). Through the Looking Glass: Genome, Phenome, and Interactome of *Salmonella enterica*. *Pathogens*, 11(5), pp. 1–13.
- Gunell, M. *et al.* (2010). In vitro activity of azithromycin against nontyphoidal *Salmonella enterica*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(8), pp. 3498–3501.
- Gut, A. M. *et al.* (2018). *Salmonella* infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology (Reading)*, 164(11), pp. 1327–1344.

- Guyassa, C. e Dima, C. (2022). A short review on Salmonella detection methods. *Microbiology Research International*, 10(3), pp. 32–39.
- Harbottle, H. *et al.* (2006). Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol*, 17(2), pp. 111–124.
- Heidary, M. *et al.* (2022). Mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of azithromycin. *J Clin Lab Anal*, 36(6), pp. 1–16.
- Hooda, Y. *et al.* (2020). Mass azithromycin administration: considerations in an increasingly resistant world. *BMJ Global Health*, 5(6), pp. 1–4.
- Hu, Y. *et al.* (2022). Antimicrobial resistance of Salmonella Indiana from retail chickens in China and emergence of an mcr-1-harboring isolate with concurrent resistance to ciprofloxacin, cefotaxime, and colistin. *Front Microbiol*, 13, pp. 1–13.
- Huang, L. *et al.* (2021). The Effects of Natural Products and Environmental Conditions on Antimicrobial Resistance. *Molecules*, 26(14), pp. 1–18.
- Hurley, D. *et al.* (2014). Salmonella-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol*, 5, pp. 1–11.
- Jajere, S. M. (2019). A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*, 12(4), pp. 504–521.
- Johansson, M. H. K. *et al.* (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in Salmonella enterica using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), pp. 101–109.
- Jones, M. (2013). *Fimbriae and flagella of Salmonella enterica*. CABI Books, CABI International.
- Kaur, J. e Jain, S. K. (2012). Role of antigens and virulence factors of Salmonella enterica serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiol Res*, 167(4), pp. 199–210.

- Lamas, A. *et al.* (2016). Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from northwestern Spanish broiler flocks (2011-2015). *Poult Sci*, 95(9), pp. 2097–2105.
- Lamas, A. *et al.* (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiol Res*, 206, pp. 60–73.
- Li, Q. (2022). Mechanisms for the Invasion and Dissemination of *Salmonella*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2022, pp. 1–12.
- Lima, T., Domingues, S. e Da Silva, G. J. (2019). Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*, 7(2), pp. 1–17.
- Lokken, K. L., Walker, G. T. e Tsohis, R. M. (2016). Disseminated infections with antibiotic-resistant non-typhoidal *Salmonella* strains: contributions of host and pathogen factors. *Pathog Dis*, 74(8), pp. 1–9.
- Marineli, F. *et al.* (2013). Mary Mallon (1869-1938) and the history of typhoid fever. *Ann Gastroenterol*, 26(2), pp. 132–134.
- Masuet-Aumatell, C. e Atouguia, J. (2021). Typhoid fever infection - Antibiotic resistance and vaccination strategies: A narrative review. *Travel Med Infect Dis*, 40, pp. 1–15.
- Mc Dermott, P. F., Walker, R. D. e White, D. G. (2003). Antimicrobials: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. *International Journal of Toxicology*, 22(2), pp. 135–143.
- McMillan, E. A. *et al.* (2019). Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated With United States Food Animals. *Front Microbiol*, 10, pp. 1–18.
- McMillan, E. A., Jackson, C. R. e Frye, J. G. (2020). Transferable Plasmids of *Salmonella enterica* Associated With Antibiotic Resistance Genes. *Front Microbiol*, 11, pp. 1–9.
- Michael, G. B. e Schwarz, S. (2016). Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend? *Clin Microbiol Infect*, 22(12), pp. 968–974.

- Miriagou, V., Carattoli, A. e Fanning, S. (2006). Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect*, 8(7), pp. 1923–1930.
- Monte, D. F. e Sellera, F. (2020). *Salmonella*. *Emerging Infectious Disease journal*, 26(12), pp. 1.
- Mthembu, T. P., Zishiri, O. T. e El Zowalaty, M. E. (2021). Genomic Characterization of Antimicrobial Resistance in Food Chain and Livestock-Associated *Salmonella* Species. *Animals (Basel)*, 11(3), pp. 1–16.
- Mutuku, C., Gazdag, Z. e Melegh, S. (2022). Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. *World J Microbiol Biotechnol*, 38(9), pp. 1–28.
- Ndako, A. *et al.* (2022). Fluoroquinolone Resistant *Salmonella* Species. *Journal of Advances in Microbiology*, pp. 29–36.
- Oladeinde, A. *et al.* (2019). Horizontal Gene Transfer and Acquired Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg following In Vitro Incubation in Broiler Ceca. *Appl Environ Microbiol*, 85(22), pp. 1–16.
- Oliveira, A. P. *et al.* (2013). *Salmonella enterica*: Genes de virulência e Ilhas de patogencidade. *Centro Científico Conhecer*, 9(16), pp. 1–26.
- Oludairo, O. *et al.* (2022). Review of *Salmonella* Characteristics, History, Taxonomy, Nomenclature, Non Typhoidal Salmonellosis (NTS) and Typhoidal Salmonellosis (TS). *Zagazig Veterinary Journal*, 50, pp. 160–171.
- Pavelquesi, S. L. S. *et al.* (2021). Presence of Tetracycline and Sulfonamide Resistance Genes in *Salmonella* spp.: Literature Review. *Antibiotics (Basel)*, 10(11), pp. 1–20.
- Philippe, V., Axel, C. e Paul, B. (2005). Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet. Res.*, 36(3), pp. 267–288.

- Pradhan, D. e Devi Negi, V. (2019). Stress-induced adaptations in Salmonella: A ground for shaping its pathogenesis. *Microbiol Res*, 229, pp. 1–12.
- Pund, S. *et al.* (2022). Nanomedicine in Treatment of Typhoid Fever: A Review. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 34(24A), pp. 16–28.
- Rabsch, W., Simon, S. e Humphrey, T. (2013). *Public health aspects of Salmonella infections*. CABI Books, CABI International.
- Raffatellu, M. *et al.* (2008). Clinical pathogenesis of typhoid fever. *J Infect Dev Ctries*, 2(4), pp. 260–266.
- Rahman, H., Mahmoud, B. e Othman, H. (2018). A Review of History, Definition, Classification, Source, Transmission, and Pathogenesis of Salmonella: A Model for Human Infection. *Journal of Zankoy Sulaimani - Part A*, 20, pp. 11–20.
- Ramatla, T. *et al.* (2021). Prevalence of Antibiotic Resistance in Salmonella Serotypes Concurrently Isolated from the Environment, Animals, and Humans in South Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics (Basel)*, 10(12), pp. 01–14.
- Ricke, S. C. *et al.* (2018). Molecular-based identification and detection of Salmonella in food production systems: current perspectives. *J Appl Microbiol*, 125(2), pp. 313–327.
- Rincón-Gamboa, S. M., Poutou-Piñales, R. A. e Carrascal-Camacho, A. K. (2021). Antimicrobial Resistance of Non-Typhoid Salmonella in Meat and Meat Products. *Foods*, 10(8), pp. 1–27.
- Rodrigues, G. L. *et al.* (2020). Frequency of Antimicrobial Resistance Genes in Salmonella From Brazil by in silico Whole-Genome Sequencing Analysis: An Overview of the Last Four Decades. *Frontiers in Microbiology*, 11, pp. 1–13.
- Ryan, M. P., O'Dwyer, J. e Adley, C. C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella. *Biomed Res Int*, 2017, pp. 1–6.

- Sajib, M. S. I. *et al.* (2021). Tracking the Emergence of Azithromycin Resistance in Multiple Genotypes of Typhoidal Salmonella. *mBio*, 12(1), pp. 1–12.
- Shaheen, A. *et al.* (2021). Mutational Diversity in the Quinolone Resistance-Determining Regions of Type-II Topoisomerases of Salmonella Serovars. *Antibiotics (Basel)*, 10(12), pp. 1–26.
- Shinohara, N. K. *et al.* (2008). Salmonella spp. important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. *Cien Saude Colet*, 13(5), pp. 1675–1683.
- Sommer, M. O. A. *et al.* (2017). Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nature Reviews Microbiology*, 15(11), pp. 689–696.
- Su, L. H. e Chiu, C. H. (2007). Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J*, 30(3), pp. 210–219.
- Sultan, I. *et al.* (2018). Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Front Microbiol*, 9, pp. 1–16.
- Tang, S. *et al.* (2019). Assessment and Comparison of Molecular Subtyping and Characterization Methods for Salmonella. *Front Microbiol*, 10, pp. 1–23.
- Tanner, J. R. e Kingsley, R. A. (2018). Evolution of Salmonella within Hosts. *Trends Microbiol*, 26(12), pp. 986–998.
- Tao, S. *et al.* (2022). The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2022, pp. 01–11.
- Ugboko, H. e Nandita, D. (2014). Mechanisms of Antibiotic resistance in Salmonella typhi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(12), pp. 461–476.
- Urban-Chmiel, R. *et al.* (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria - A Review. *Antibiotics (Basel)*, 11(8), pp. 1–40.
- Vieira, M. A. M. (2009). Ilhas de patogenicidade. *O Mundo da Saúde*, 33(4), pp. 406–414.

- Wales, A. e Davies, R. (2013). *Environmental aspects of Salmonella*. CABI Books, CABI International.
- Wan Makhtar, W. R. W. *et al.* (2021). Whole Genome Sequencing Analysis of *Salmonella enterica* Serovar Typhi: History and Current Approaches. *Microorganisms*, 9(10), pp. 1–15.
- Wang, Y. *et al.* (2022). Research progress on antibiotic resistance of *Salmonella*. *Food Quality and Safety*, 6, pp. 1–10.
- Wattiau, P., Boland, C. e Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Appl Environ Microbiol*, 77(22), pp. 7877–7885.
- Wei, S. *et al.* (2019). Bacteriophages as Potential Tools for Detection and Control of *Salmonella* spp. in Food Systems. *Microorganisms*, 7(11), pp. 1–22.
- WHO (2018). Weekly Epidemiological Record [full issue]. *Weekly Epidemiological Record*, 93(13), pp. 153–172.
- Wójcicki, M. *et al.* (2021). Transcriptional Regulation of the Multiple Resistance Mechanisms in *Salmonella*-A Review. *Pathogens*, 10(7), pp. 1–25.
- Yin, Y. e Zhou, D. (2018). Organoid and Enteroid Modeling of *Salmonella* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, pp. 1–13.
- Yue, M. *et al.* (2020). Serotypes, antibiotic resistance, and virulence genes of *Salmonella* in children with diarrhea. *J Clin Lab Anal*, 34(12), pp. 1–8.
- Zarei-Baygi, A. e Smith, A. L. (2021). Intracellular versus extracellular antibiotic resistance genes in the environment: Prevalence, horizontal transfer, and mitigation strategies. *Bioresource Technology*, 319, pp. 1–15.