

## Caracterização genómica de *Salmonella* Newport: identificação de clusters genéticos, janeiro 1991-maio 2024

Genomic characterization of *Salmonella* Newport: identification of genetic clusters, January 1991-May 2024

Raquel Caeiro, Alexandra Tomás, Ana Margarida Henriques, Angela Pista, Leonor Silveira

leonor.silveira@insa.min-saude.pt; angela.pista@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport (S. Newport) é um serotipo pouco frequente na União Europeia. No entanto, devido à sua associação com alguns surtos de origem alimentar, a sua importância não deve ser negligenciada. Em Portugal, os dados sobre a infeção por S. Newport são escassos.

Este estudo teve como principais objetivos caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados clínicos de S. Newport entre 1991 e maio de 2024, e identificar possíveis clusters genéticos.

Após serotipagem, 98 isolados foram submetidos a testes de suscetibilidade aos antibióticos e sequenciação total do genoma.

Apesar da maioria dos isolados estudados (96,9%) terem sido suscetíveis aos antibióticos testados, em 2024 foi identificado um isolado multirresistente, que, entre outros, continha o gene *bla*<sub>DHA-1</sub>. A análise *core genome multilocus sequence typing* (Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1), considerando um *threshold* de cinco diferenças alélicas, permitiu identificar oito clusters distintos, dois dos quais de maiores dimensões: o Cluster 1, com 32 isolados de 2019, e o Cluster 2, com quatro isolados de 2022 e 18 de 2023.

Embora S. Newport seja um serotipo pouco frequente em Portugal e não apresentar, na maioria dos casos, resistências aos antibióticos, é essencial manter uma vigilância laboratorial contínua, que permita de forma atempada implementar medidas de prevenção e controlo eficazes.

### \_Abstract

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport (S. Newport) is a relatively uncommon serotype within the European Union. Nevertheless, due to the relevance of some related outbreaks, its significance should not be underestimated. In Portugal, data on S. Newport infection is scarce.

The objectives of this study were to characterise clinical isolates of S. Newport received between January 1991 and May 2024, and to identify potential genetic clusters.

Following serotyping, 98 isolates were subjected to antibiotic susceptibility testing and whole genome sequencing.

Most of the isolates (96.9%) were susceptible to the tested antibiotics. However, a multidrug-resistant isolate was identified in 2024, which contained the *bla*<sub>DHA-1</sub> gene, among others. The core genome multilocus sequence typing analysis (Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1), with a threshold of five allelic differences, enabled the identification of eight clusters, two of them considered as major clusters: Cluster 1, comprising

32 isolates from 2019, and Cluster 2 including four isolates from 2022 and 18 from 2023.

Although S. Newport is an uncommon serotype in Portugal and most of the isolates do not exhibit antibiotic resistance, it is essential to maintain a continuous laboratory surveillance programme in order to implement effective prevention and control measures.

### \_Introdução

Salmonelose é a segunda zoonose mais frequente a nível europeu, estando *Salmonella* spp. associada a numerosos surtos de origem alimentar (1). De acordo com os dados mais recentes, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport (S. Newport) foi o quinto serotipo mais notificado na União Europeia em 2022 (1,1%; 522/47122) (1).

Conforme evidenciado por diversos estudos, os surtos de infeção por S. Newport têm sido associados ao consumo de queijo de leite cru, fruta, vegetais e marisco cozinhado e congelado, entre outros (2-5).

Apesar dos casos de infeção humana por este serotipo não serem frequentes, o aumento do número de isolados resistentes e multirresistentes aos antibióticos, nomeadamente aos antibióticos considerados de importância crítica (6), constituem um problema de saúde pública a nível mundial (7). Neste contexto, a vigilância laboratorial adquire um papel fundamental na identificação precoce de surtos e isolados multirresistentes.

Em Portugal, os dados disponíveis na literatura sobre a infeção por S. Newport são escassos.

## \_Objetivo

Este trabalho teve como principais objetivos caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados clínicos de *S. Newport*, recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 1991 e maio de 2024, e identificar possíveis *clusters* genéticos.

## \_Materiais e métodos

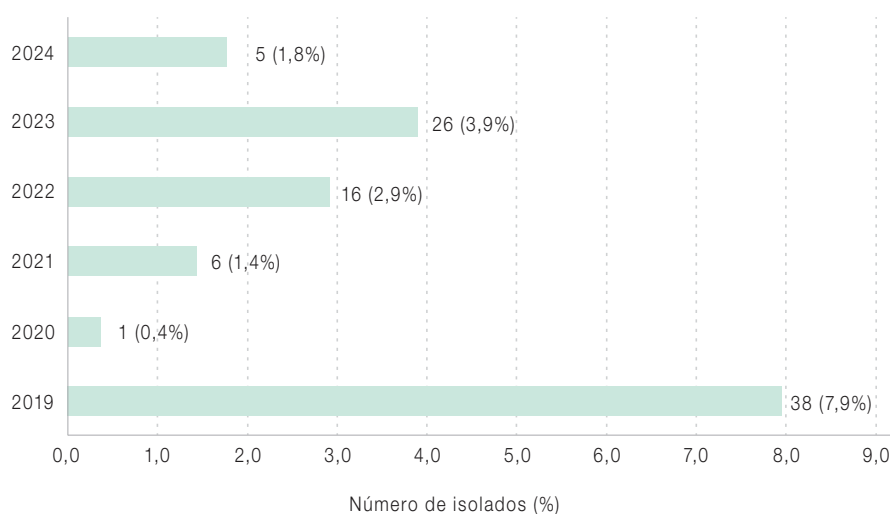
Foram considerados todos os isolados de *Salmonella* spp. recebidos no INSA entre janeiro de 1991 e maio de 2024 e serotipados como *S. Newport*, com base no esquema de *Kauffman-White-Le Minor* (8). A determinação do perfil fenotípico de resistência aos antibióticos foi realizada pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* (9), para um painel de 18 antibióticos: ácido nalidíxico (NAL), 30 µg; amicacina (AKN), 30 µg; amoxicilina+ácido clavulânico (AMC), 30 µg; ampicilina (AMP), 10 µg; azitromicina (AZM), 15 µg; cefepime (FEP), 30 µg; cefotaxima (COX), 5 µg; cefoxitina (FOX), 30 µg; ceftazidima (CAZ), 10 µg, ceftriaxona (CRO), 30 µg; cloranfenicol (CHL), 30 µg; gentamicina (GMN), 10 µg; meropenemo (MEM), 10

µg; pefloxacina (PEF), 5 µg; trimetoprim+sulfametoxazol (SXT), 25 µg; tetraciclina (TET), 30 µg; tigeciclina (TGC), 15 µg; e trimetoprim (TMP), 5 µg. Os isolados foram sujeitos a sequenciação total do genoma (WGS), com recurso à tecnologia Illumina, e a análise genómica foi realizada nas plataformas *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) e *Center for Genomic Epidemiology* (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>).

## \_Resultados

No período em estudo, foram identificados no INSA 128 isolados de *S. Newport*, tendo sido analisados para este trabalho 98 isolados. Destes, 92 pertenciam ao período entre 2019 e maio de 2024 e seis ao período entre 1991 e 2018 (apenas foram recuperados 6 isolados de um total de 36 recebidos neste período) (1991, n=1; 1996, n=1; 1997, n=2; 2005, n=1; 2018, n=1). A distribuição temporal dos casos de salmonelose por *S. Newport* entre 2019-2024 (n=92), encontra-se representada no **gráfico 1**. Como é possível constatar, a distribuição não foi uniforme, tendo havido um maior número de isolados em 2019 (7,9%, 38/478) e 2023 (3,9%, 26/668).

Gráfico 1: Distribuição temporal dos 92 isolados clínicos de *S. Newport*, recebidos entre janeiro de 2019 e maio de 2024.



A percentagem foi calculada em função do número total de isolados de *Salmonella* recebidos no INSA em cada ano.

Relativamente aos testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) realizados, 96,9% (95/98) dos isolados de *S. Newport* foram totalmente suscetíveis. No **gráfico 2** estão representados os perfis de resistência identificados (3,1%; 3/98). A resistência à ampicilina foi observada num isolado de 1991 e a resistência à tetraciclina num isolado de 2023, enquanto o perfil de multirresistência (AMP, AMC, TET, FOX, CZD, COX, FEP, SXT) foi identificado num isolado de 2024. Os genes preditivos da resistência fenotípica estão descritos no **gráfico 2B**.

Com o objetivo de avaliar a proximidade genética dos 98 isolados em estudo, recorreu-se a uma análise de *core genome multilocus sequence typing* (Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1), considerando um *threshold* de cinco diferenças alélicas (HC5). Foram identificados oito *clusters* distintos, dois dos quais de maiores dimensões (*Cluster 1* e *Cluster 2*), como se observa na **figura 1**. O *Cluster 1* integra 32 isolados de 2019 (32,7%; 32/98), enquanto o *Cluster 2* inclui 22 isolados de dois anos diferentes, 2022 (n=4) e 2023 (n=18). Todos os isolados pertencem à sequência tipo (ST) 118.

Considerando-se o HC5 associado ao *Cluster 1* (198011) e ao *Cluster 2* (338382), procedeu-se a uma nova análise de cgMLST, incluindo apenas os isolados destes HC5 disponíveis na plataforma Enterobase, de forma a verificar se os *clusters* integravam isolados internacionais. Relativamente ao *Cluster 1*, identificou-se um isolado proveniente de França e um isolado proveniente do Reino Unido (**figura 2**). O círculo de maiores dimensões engloba 11 dos 32 isolados de Portugal e um isolado de França, geneticamente iguais. Os restantes isolados apresentam 1-5 diferenças alélicas entre si.

No que se refere ao *Cluster 2*, foram integrados três isolados internacionais: um de França, um do Reino Unido e o terceiro dos Estados Unidos (**figura 3**). O círculo de maiores dimensões engloba 14 dos 22 isolados de Portugal, o isolado de França e o do Reino Unido, com 0 diferenças alélicas, enquanto os restantes isolados apresentam 1-5 diferenças alélicas entre si.

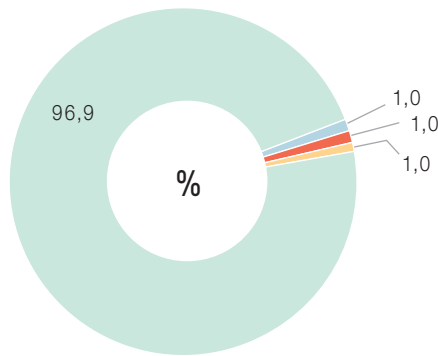
## \_Discussão

Apesar de *S. Newport* ser considerado um serotipo menos frequente na Europa (1), comparativamente a *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* monofásica, tem sido documentada a sua associação a uma diversidade de surtos ligados ao consumo de alimentos contaminados (2,4,5,10). Em Portugal, o número de isolados de *S. Newport* recebidos no INSA entre janeiro de 1991 a maio de 2024, foi também reduzido (1,1%; 134/12461). No entanto, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do número de isolados de *S. Newport* em 2019, o que indiciou a possibilidade de existirem *clusters* genéticos.

A análise fenotípica dos isolados, revelou que 96,9% eram suscetíveis aos antibióticos testados. Este resultado era expectável, uma vez que *S. Newport* está maioritariamente associada a baixas percentagens de resistência aos antibióticos (11). Dos três isolados resistentes (3,1%; 3/98), dois evidenciaram apenas a uma classe de antibióticos, um às penicilinas (ampicilina) e outra à tetraciclina, suportado pela presença dos genes *bla<sub>OXA-1</sub>* e *bla<sub>TEM-1B</sub>*, e *tet(A)*, respetivamente. O outro isolado apresentou um perfil de multirresistência à ampicilina, amoxicilina, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, tetraciclina, pefloxacina e trimetoprim+sulfametoxazol, conferido pela presença dos genes *bla<sub>DHA-1</sub>*, *tet(A)*, *qnrB4*, *sul1*, *sul2* e *dfrA12*, respetivamente. Apesar de ter sido identificado num único isolado, de 2024, importa destacar a importância deste último perfil, uma vez que a ocorrência simultânea de genes de resistência aos antibióticos da classe das (fluoro)quinolonas e do gene *bla<sub>DHA-1</sub>*, que codifica uma  $\beta$ -lactamase de espectro alargado (ESBL), é preocupante, dado que as cefalosporinas de 3ª geração e as (fluoro)quinolonas são recomendadas para o tratamento de infeções graves (1,6,11).

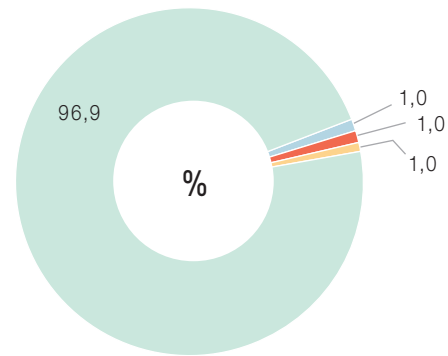
Gráfico 2: ▾ Distribuição dos perfis fenotípicos observados nos 98 isolados de *S. Newport* em análise (A) e dos genes de resistência identificados por WGS em quatro isolados (B), no período em estudo.

a) Perfil fenotípico de isolados de *S. Newport* (n=98)



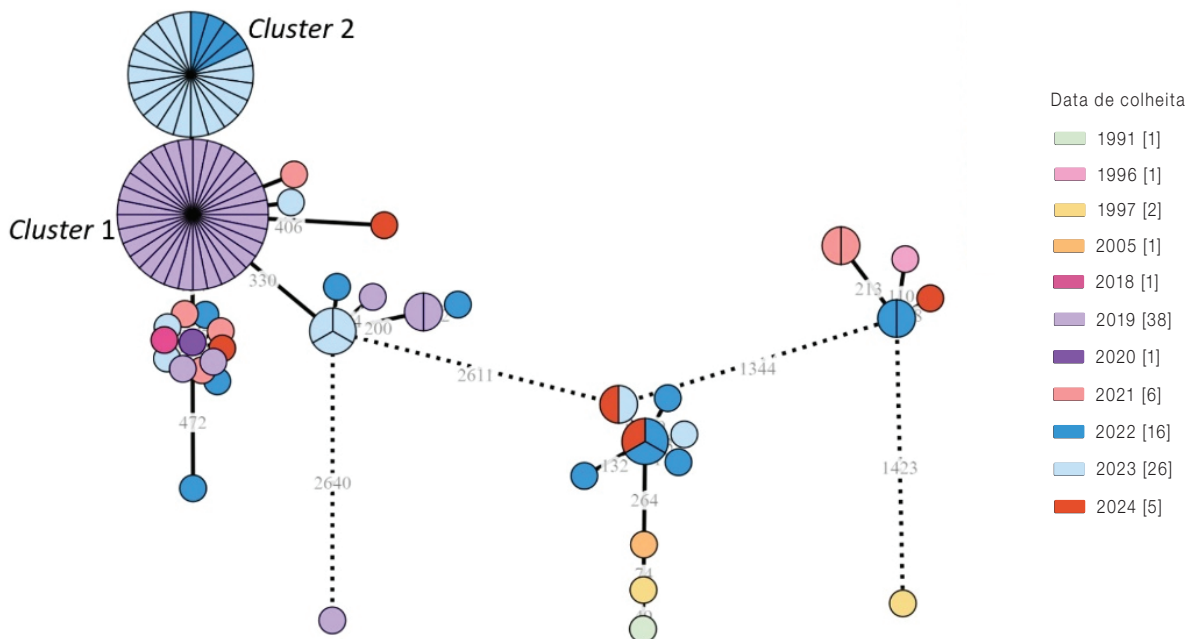
Sem resistências (n=95)  
AMP (n=1)  
TET (n=1)  
AMP,AMC,TET,FOX,CZD,COX,PEF,SXT (n=1)

b) Genes de resistência de isolados de *S. Newport* (n=98)



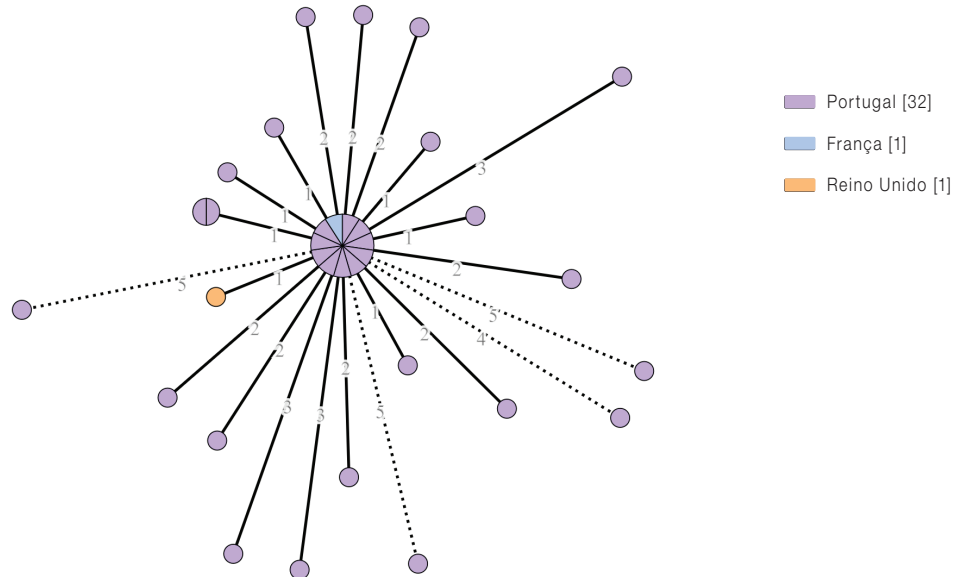
Sem genes (n=95)  
bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, sul1 (n=1)  
tet(A) (n=1)  
aph(6)-Id, aadA2, aph(3')-Ia, aph(3')-Ib, blaDHA-1, qnrB4, sul1, sul2, tet(A), dfrA12 (n=1)

Figura 1: ▾ Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *S. Newport*, baseada no cgMLST dos 98 isolados e utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 loci, disponível na plataforma *Enterobase*.



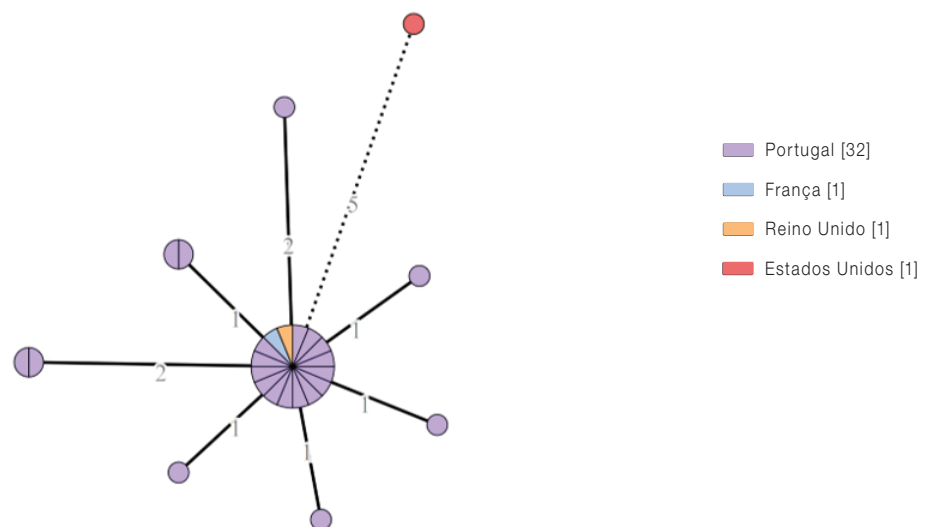
Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados. Os clusters são formados com  $\leq 5$  diferenças alélicas entre os isolados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. As linhas contínuas são proporcionais à distância entre os isolados, enquanto as linhas a tracejado são indicativas de ausência de proporcionalidade na distância entre os isolados, tendo sido efetuada uma redução para distâncias superiores a 1000.

Figura 2: ↓ Análise filogenética (*minimum spanning tree*) baseada no cgMLST de todos os isolados do HC5 198011 disponíveis na plataforma *Enterobase*, utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 *loci*.



Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. As linhas contínuas são proporcionais à distância entre os isolados, enquanto as linhas a tracejado são indicativas de ausência de proporcionalidade na distância entre os isolados, tendo sido efetuada uma redução para distâncias superiores a 3.

Figura 3: ↓ Análise filogenética (*minimum spanning tree*) baseada no cgMLST de todos os isolados do HC5 338382 disponíveis na plataforma *Enterobase*, utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 *loci*.



Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. As linhas contínuas são proporcionais à distância entre os isolados, enquanto as linhas a tracejado são indicativas de ausência de proporcionalidade na distância entre os isolados, tendo sido efetuada uma redução para distâncias superiores a 3.

Através da análise de cgMLST foi possível identificar vários *clusters* genéticos, nomeadamente dois grandes *clusters*, que também integravam isolados internacionais.

Nos últimos anos, a sequenciação genómica tem desempenhado um papel fundamental na vigilância laboratorial, permitindo identificar precocemente *clusters* genéticos e servindo de base à investigação epidemiológica (12).

### Conclusão

Apesar de a maioria dos isolados de *S. Newport* identificados em Portugal não serem resistentes aos antibióticos, a importância deste serotipo para a saúde pública não deve ser negligenciada, devido à sua potencial ligação a surtos, quer nacionais quer internacionais, de acordo com o evidenciado pela análise genómica realizada no presente estudo.

Destaca-se ainda a existência de estirpes de *S. Newport* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espetro alargado em Portugal, o que reforça a necessidade de uma vigilância laboratorial contínua, que permita a monitorização destes isolados e a deteção precoce de surtos.

### Agradecimentos:

Os autores agradecem a colaboração de todos os Serviços de Patologia Clínica e Laboratórios de Análises Clínicas que enviaram isolados ao INSA, no âmbito da vigilância epidemiológica. Agradecem igualmente à Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA, pela realização da sequenciação genómica.

### Referências bibliográficas:

- (1) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA J.* 2023 Dec 12;21(12):e8442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- (2) Robinson E, Travanut M, Fabre L, et al. Outbreak of Salmonella Newport associated with internationally distributed raw goats' milk cheese, France, 2018. *Epidemiol Infect.* 2020 May 4;148:e180. <https://doi.org/10.1017/S0950268820000904>
- (3) Byrne L, Fisher I, Peters T, et al. A multi-country outbreak of Salmonella Newport gastroenteritis in Europe associated with watermelon from Brazil, confirmed by whole genome sequencing: October 2011 to January 2012. *Euro Surveill.* 2014 Aug 7;19(31):6-13. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.31.20866>
- (4) Bayer C, Bernard H, Prager R, et al. An outbreak of Salmonella Newport associated with mung bean sprouts in Germany and the Netherlands, October to November 2011. *Euro Surveill.* 2014 Jan 9;19(1):20665. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.1.20665>. Erratum in: *Euro Surveill.* 2013;19(2):pii/20676.
- (5) Jansson Mörk M, Karamehmedovic N, Hansen A, et al. Outbreak of Salmonella Newport linked to imported frozen cooked crayfish in dill brine, Sweden, July to November 2019. *Euro Surveill.* 2022 Jun;27(22):2100918. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.22.2100918>
- (6) World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th rev. Geneva: WHO, 2019. <https://iris.who.int/handle/10665/312266>
- (7) Pan H, Paudyal N, Li X, et al. Multiple Food-Animal-Borne Route in Transmission of Antibiotic-Resistant Salmonella Newport to Humans. *Front Microbiol.* 2018 Jan 23;9:23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00023>
- (8) Grimont PAD, Weill F-X ; WHO collaborating center for reference and research on Salmonella (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*. 9th ed. Paris: Institute Pasteur, 2007. [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf)
- (9) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Test Methodology [online]. [consult. 25/06/2024]. [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology)
- (10) Osimani A, Aquilanti L, Clementi F. Salmonellosis associated with mass catering: a survey of European Union cases over a 15-year period. *Epidemiol Infect.* 2016 Oct;144(14):3000-3012. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001540>
- (11) Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS): Human Isolates Final Report, 2015 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services- CDC, 2018. [https://stacks.cdc.gov/view/cdc/152381/cdc\\_152381\\_DS1.pdf](https://stacks.cdc.gov/view/cdc/152381/cdc_152381_DS1.pdf)
- (12) European Centre for Disease Prevention and Control. Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. Stockholm: ECDC, 2016. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/whole-genome-sequencing-for-public-health-surveillance.pdf>