

Aumento de casos de *Salmonella* Typhimurium em 2024: caracterização fenotípica e genotípica dos isolados

Increase in *Salmonella* Typhimurium cases in 2024: phenotypic and genotypic characterization of isolates

Alexandra Tomás, Ana Margarida Henriques, Raquel Caeiro, 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

Salmonelose é a segunda zoonose mais frequente a nível mundial. É causada por *Salmonella enterica*, sendo *S. Typhimurium* um dos serotipos mais reportados na União Europeia. Um dos maiores riscos para a saúde pública é a presença de *Salmonella* spp. em alimentos, e consequente associação a surtos que podem atingir uma dimensão transfronteiriça.

Este estudo teve como principal objetivo caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de *Salmonella* Typhimurium recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, na sequência do aumento considerável de isolados deste serotipo observado entre abril e maio de 2024.

Foram estudados 83 isolados, dos quais 64 integravam o mesmo cluster genético (77,1%), Cluster 1, identificado por *core genome multilocus sequence typing* (Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1). Todos os isolados pertenciam à sequência tipo 19. Foi identificada a presença dos genes de resistência *bla_{CARB-2}*, *sul1*, *aadA2*, *aac(6')-Iaa*, *tet(G)* e *floR* em 67 isolados, perfil concordante com o fenótipo encontrado, AMP-AMC-TET-CHL. A análise de cgMLST permitiu ainda identificar quatro isolados europeus que integravam o Cluster 1.

_Abstract

Salmonellosis is the second most frequent zoonosis worldwide. It is caused by *Salmonella enterica*, with *S. Typhimurium* being one of the most reported serotypes in the European Union. One of the major public health risks is the presence of *Salmonella* spp. in food, leading to outbreaks that can reach cross-border dimensions.

The main goal of this study was to characterise, phenotypically and genotypically, the *Salmonella* Typhimurium isolates received at the National Reference Laboratory for Gastrointestinal Infections of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, due to the considerable increase observed between April and May 2024.

In this work, 83 isolates were studied, of which 64 (77.1%) belonged to the same cluster, Cluster 1, identified by *core genome multilocus sequence typing* (Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1). All isolates belonged to sequence type 19. The resistance genes *bla_{CARB-2}*, *sul1*, *aadA2*, *aac(6')-Iaa*, *tet(G)* and *floR* were identified in 67 isolates, concordant with the phenotype detected, AMP-AMC-TET-CHL. Subsequent cgMLST analysis identified four isolates from other European countries that were also included in Cluster 1.

_Introdução

Salmonella spp. é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* (1). O género *Salmonella* compreende mais de 2600 serotipos, de acordo com o esquema de *Kauffman-White-Le Minor*, e agrupa duas espécies diferentes, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (1). Integrando o grupo de *Salmonella* não tifóide/paratifóide, *S. Typhimurium* é o segundo serotipo mais reportado na União Europeia, com uma percentagem de 11,4% (2).

Salmonelose, tipicamente caracterizada pelo aparecimento de sintomas gastrointestinais, é considerada a segunda zoonose mais frequente a nível mundial (2). É frequentemente associada a surtos de origem alimentar, podendo ser transmitida pelo consumo de alimentos contaminados, como carne de aves, laticínios, ovos, frutas e vegetais, entre outros (3). Adicionalmente, a existência de isolados resistentes a várias classes de antibióticos representa um grave problema para a saúde pública (3). Em Portugal, as resistências à ampicilina (31,3%), sulfametoxazol (52,1%), tetraciclina (27,1%) e à classe das fluoroquinolonas (27,1%) são as mais frequentes nas infeções por *S. Typhimurium*, podendo a percentagem de isolados multirresistentes atingir os 31,3% (4).

A vigilância epidemiológica laboratorial é uma componente essencial para a sinalização precoce de surtos, permitindo a adoção de medidas de prevenção e de controlo pelas autoridades competentes, de forma a minimizar o risco para a saúde pública.

_Objetivos

Este estudo tem como objetivo caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de *Salmonella* spp. recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), e serotipados como *S. Typhimurium*, entre janeiro e maio de 2024.

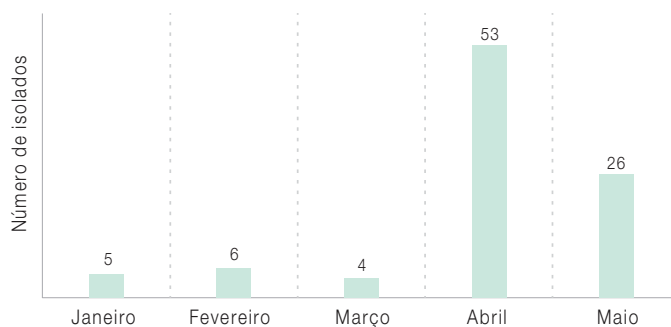
_Material e métodos

De um total de 285 isolados recebidos no INSA entre janeiro e maio de 2024, foram selecionados todos os isolados pertencentes ao serotipo *Typhimurium*. A serotipagem foi realizada com base no esquema de *Kauffman-White-Le Minor* (5) e a determinação do perfil de resistências aos antibióticos pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (6). Foi testado 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 submetidos a sequenciação total do genoma (WGS), utilizando a tecnologia Illumina. A análise genómica foi realizada com recurso às plataformas *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) e *Center for Genomic Epidemiology* (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>).

_Resultado

Dos 285 isolados de *Salmonella enterica* recebidos no INSA entre janeiro e maio de 2024, 29,1% (83/285) foram serotipados como *S. Typhimurium*, um número 4,2 vezes superior ao total de isolados de *S. Typhimurium* serotipados no ano de 2023 (6,9%; 46/668). De acordo com o gráfico 1, o maior número de isolados de *S. Typhimurium* foi observado no mês de abril (63,9%; n=53/83), sendo a maioria proveniente de duas regiões do país (Lisboa e Vale do Tejo e Alentejo).

Gráfico 1: Distribuição do número de isolados de *S. Typhimurium* serotipados no INSA, entre janeiro e maio de 2024.

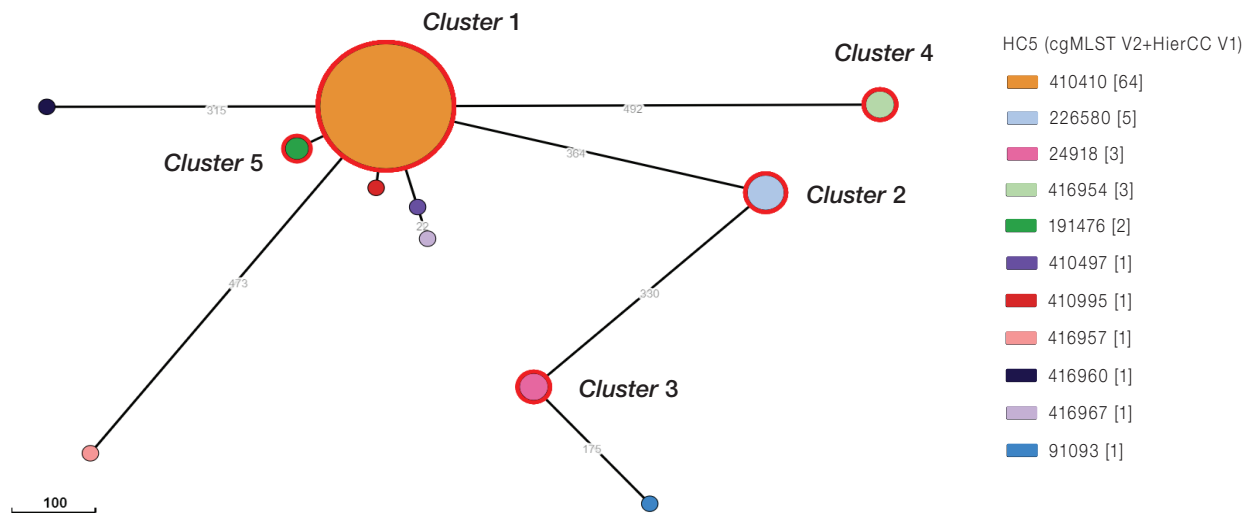


Relativamente aos testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA), 80,7% (67/83) dos isolados de *S. Typhimurium* apresentavam o mesmo perfil de resistência a antibióticos, AMP-AMC-TET-CHL. Nos restantes 16 isolados, 8,4% (7/83) eram suscetíveis, 6,0% (5/83) apresentavam o perfil de resistência AMP-TET-TMP-SXT e 1,2% (1/83), cada, os perfis AMP-AMC-TET-NAL-CHL-PEF, AMP-TMP-SXT, NAL-PEF e PEF.

Com o objetivo de avaliar a proximidade genética dos 83 isolados de *S. Typhimurium* sequenciados, recorreu-se a uma análise de *core genome multilocus sequence typing* (*Enterobase* cgMLST V2 + HierCC V1) considerando-se um *threshold* de cinco diferenças alélicas (HC5), tendo sido identificados cinco *clusters* genéticos.

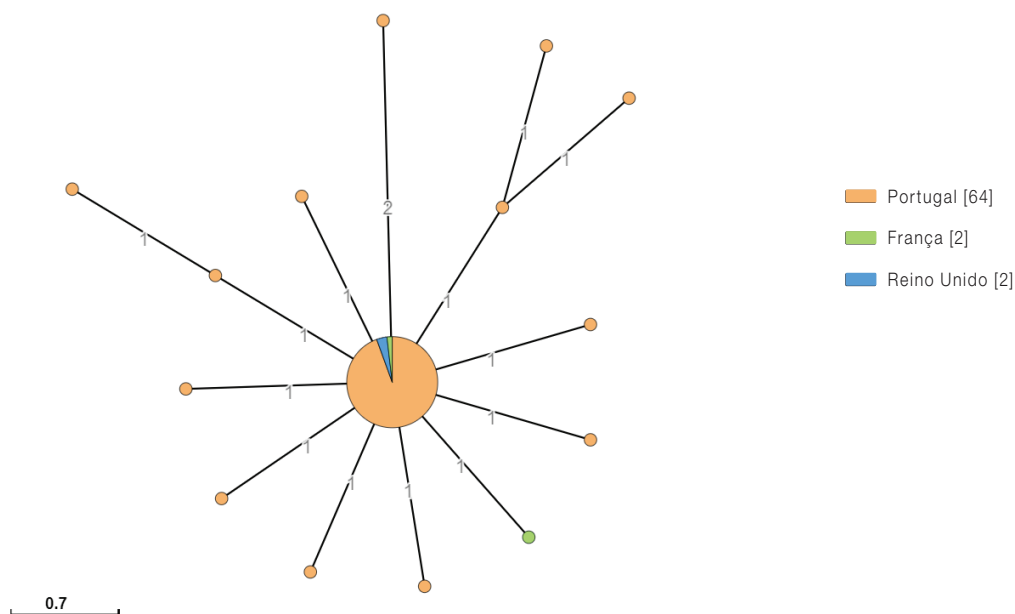
O *Cluster* 1 integra 77,1% (64/83) dos isolados sequenciados, com 0-2 diferenças alélicas, todos pertencentes à sequência tipo (ST) 19 (figura 1). Todos os isolados do *Cluster* 1, apresentam o perfil de resistência AMP-AMC-TET-CHL, tendo sido identificada a presença dos genes *bla_{CARB-2}*, *floR*, e *tet(G)*, preditivos deste fenótipo, e ainda a presença dos genes *aac(6^I)-Iaa* (críptico em *Salmonella* spp.), *aadA2* (estreptomicina) e *sul1* (sulfametoxazol). Este perfil de resistência a antibióticos foi igualmente observado em três outros isolados que não integram o *Cluster* 1.

Figura 1: Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *S. Typhimurium*, baseada no cgMLST de 83 isolados, 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 ≤ 5 diferenças alélicas entre os isolados.
O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados.

Figura 2: Análise filogenética (*minimum spanning tree*) baseada no cgMLST de todos os isolados do HC5 410410 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.

artigos breves_ n. 3

Para além do *Cluster 1*, foram identificados quatro *clusters* adicionais, embora de menores dimensões: o *Cluster 2*, que integra cinco isolados, com o perfil de resistência AMP-TET-TMP-SXT; os *Clusters 3 e 4*, com três isolados cada, suscetíveis aos antibióticos testados; e o *Cluster 5*, com dois isolados resistentes a, respetivamente, NAL-PEF e PEF. Os restantes seis isolados não integram nenhum *Cluster*.

Uma vez identificado o *Cluster 1*, pertencente ao HC5 410410, procedeu-se a uma nova análise de cgMLST, desta vez incluindo todos os isolados deste HC5 disponíveis na plataforma *Enterobase*, de forma a verificar se o *Cluster 1* integrava isolados internacionais (figura 2). Esta análise levou à identificação de quatro isolados europeus, dois isolados de França e dois isolados do Reino Unido, todos de 2024. O círculo de maiores dimensões engloba 51 isolados de Portugal, um de França e dois do Reino Unido, que apresentam zero diferenças alélicas entre si. Os restantes 13 isolados, apresentam cinco ou menos diferenças alélicas entre si.

_Discussão

S. Typhimurium é o segundo serotipo mais notificado a nível europeu (7), sendo, em Portugal o terceiro serotipo mais comum, depois de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* monofásica. Em abril de 2024, foi observado um aumento no número de isolados serotipados como *S. Typhimurium*, comparativamente ao ano de 2023. Simultaneamente, constatou-se que a maioria destes isolados estavam circunscritos a duas regiões de Portugal. Todos estes factos, indiciavam a possível existência de um *cluster* genético. De facto, 77,1% (64/83) dos isolados de *S. Typhimurium* recebidos de janeiro a maio de 2024, integraram o mesmo *cluster* genético, *Cluster 1* (HC5 410410). Este *cluster* integrou ainda quatro isolados europeus, dois de França e dois do Reino Unido. Todos os isolados do *Cluster 1* pertenciam ao ST19, ST do serotipo *Typhimurium* mais frequente a nível mundial (8). Estes dados reforçam a importância da vigilância laboratorial contínua e o seu papel na identificação de surtos, sendo cada vez mais comum a vigilância genómica o ponto de partida de investigação epidemiológica de surtos (9).

Adicionalmente, todos os isolados pertencentes ao *Cluster 1* apresentavam o mesmo perfil de resistência aos antibióticos (AMP-AMC-TET-CHL), perfil pouco comum em Portugal (dados não apresentados). Contudo, a resistência aos antibióticos ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol são das mais frequentes em *S. Typhimurium* a nível europeu (32,1%, 26,8%, 14,5% respetivamente) (4). As resistências fenotípicas foram suportadas a nível genómico pela presença dos genes *bla_{CARB-2}* (ampicilina e amoxicilina), *tet(G)* (tetraciclina) e *floR* (cloranfenicol). Adicionalmente, foram identificados os genes *sul1*, preditivo de resistência à classe das sulfonamidas, e *aadA2*, preditivo de resistência à estreptomicina. O perfil de resistência ACSSUT (ampicilina-cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina) é o perfil mais comum a nível europeu (4). A deteção simultânea destes genes foi associada a estirpes multirresistentes e virulentas de ST19 na Europa, Ásia e Estados Unidos da América (10). Importa ressaltar que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (11), alguns destes antibióticos estão classificados como antibióticos de importância crítica para a saúde humana.

_Conclusão

Este estudo destaca a importância da vigilância contínua e da caracterização detalhada de isolados de *Salmonella* para melhor compreender a dinâmica de surtos e a disseminação de estirpes multirresistentes.

A identificação precoce de *clusters* e a compreensão dos perfis de resistência são cruciais para implementar medidas de controlo efetivas e, assim, prevenir a disseminação de infeções.

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) Jajere SM. A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*. 2019;12(4):504-21. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- (2) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J*. 2022 Dec 13;20(12):e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- (3) Eng S-K, Pusparajah P, Mutalib, N-S, et al. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*;8(3):284-93. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- (4) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2021-2022. *EFSA J*. 2024 Feb 28;22(2):e8583. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8583>
- (5) 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
- (6) 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
- (7) Silveira L, Pista A, Machado Jorge. Caracterização fenotípica de isolados de Salmonella enterica recebidos no INSA entre 2014 e 2017. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2018;7(22):49-51. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5592>
- (8) Gómez-Baltazar A, Vázquez-Marrufo G, Astiazaran-García H, et al. Comparative virulence of the worldwide ST19 and emergent ST213 genotypes of Salmonella enterica serotype Typhimurium strains isolated from food. *Microbes Infect*. 2023 Jan-Feb;25(1-2):105019. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.105019>
- (9) European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority ; Van Walle I, Guerra B, Borges V, et al. EFSA and ECDC technical report on the collection and analysis of whole genome sequencing data from food-borne pathogens and other relevant microorganisms isolated from human, animal, food, feed and food/feed environmental samples in the joint ECDC-EFSA molecular typing database. *EFSA supporting publication*. 2019;16(5):EN-1337. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1337>
- (10) Monte DFM, Sellera FP, Lopes R, et al. Class 1 integron-borne cassettes harboring blaCARB-2 gene in multidrug-resistant and virulent Salmonella Typhimurium ST19 strains recovered from clinical human stool samples, United States. *PLoS One*. 2020 Oct 30;15(10):e0240978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240978>. Erratum in: *PLoS One*. 2021 Mar 29;16(3):e0249536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249536>
- (11) World Health Organization. *Critically important antimicrobials for human medicine: Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use*. 6th rev. Geneva: WHO, 2019. <https://iris.who.int/handle/10665/312266>