

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Salmonella* Typhi e Paratyphi em Portugal, entre janeiro de 1994 e maio de 2024

Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella Typhi and Paratyphi isolates in Portugal, between January 1994 and May 2024

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

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

Os serotipos Typhi e Paratyphi causam infeções sistémicas graves, sendo crucial a administração de antibioterapia adequada. No entanto, o aumento crescente da taxa de multirresistência aos antibióticos, especialmente no caso de *Salmonella* Typhi, dificulta a escolha dos antibióticos a administrar. Em Portugal, os casos de febre tifoide e paratifoide são raros.

Com este estudo pretendeu-se identificar e caracterizar os perfis de resistência aos antibióticos de isolados de *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A, B e C, entre janeiro de 1994 e maio de 2024, e avaliar a sua proximidade genética.

Após confirmação do serotipo, 86 isolados foram submetidos a testes de suscetibilidade aos antibióticos e sequenciação total do genoma. Neste estudo, 60,5% dos isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico, dos quais 15,4% eram multirresistentes. Entre 1994-2016 todos os isolados foram suscetíveis, mas a partir de 2017 foi possível observar uma tendência crescente na resistência aos antibióticos, especialmente para *S. Typhi*. A resistência à pefloxacina foi a mais frequente, seguida da resistência ao ácido nalidíxico, ampicilina, trimetoprim, sulfametoxazol e cloranfenicol. Dos diversos genes de resistência identificados, destaca-se a presença do gene *bla_{CTX-M-15}* num isolado de *Salmonella* Typhi de 2020, resistente a antibióticos de importância crítica.

Foram identificados 11 pequenos *clusters*. Apesar dos serotipos tifoídeos e paratifoídeos não serem endémicos em Portugal, é essencial manter uma vigilância laboratorial contínua, de forma a caracterizar os isolados circulantes em Portugal e detetar potenciais surtos.

Abstract

Typhi and Paratyphi serovars are responsible for severe systemic infections that require appropriate antimicrobial therapy. However, the increasing rate of multidrug resistance, particularly in Salmonella Typhi, complicates therapeutics. In Portugal, typhoid and paratyphoid fever cases are rare.

This study aimed to identify and to characterize the antibiotic resistance profiles of Salmonella Typhi and Salmonella Paratyphi A, B, and C isolates from 1994 to May 2024, and to assess their genetic proximity.

After serotyping confirmation, 86 isolates underwent antimicrobial susceptibility testing and Whole Genome Sequencing.

In this study, 60.5% of the isolates were resistant to at least one antibiotic, of which 15.4% were multidrug-resistant. Between 1994 and 2016, all isolates were susceptible, but an increasing trend in antibiotic resistance

was observed after 2017, particularly in S. Typhi. Resistance to pefloxacin was most frequent, followed by nalidixic acid, ampicillin, trimethoprim, sulphamethoxazole, and chloramphenicol. Among the resistance genes identified, bla_{CTX-M-15} gene was found in a S. Typhi isolate from 2020, resistant to critically important antibiotics. Eleven small clusters were identified. Although typhoid and paratyphoid serotypes are not endemic in Portugal, continuous laboratory surveillance is essential to characterize circulating isolates and to detect potential outbreaks.

Introdução

Anualmente, a febre tifoide e a paratifoide são responsáveis por cerca de 130 a 160 mil mortes a nível mundial e são causadas por *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B e Paratyphi C (1-6). A febre entérica é transmitida pela via fecal-oral, através da contaminação de água ou alimentos, ou por contacto direto pessoa a pessoa, especialmente em países endémicos, tais como países do sudeste asiático e África subsariana, entre outros (1,2,5,7). Na Europa, os casos de febre tifoide e paratifoide são relativamente raros e estão maioritariamente associados a viagens para países endémicos (1,3,7).

Os serotipos Typhi e Paratyphi, restritos ao hospedeiro humano, causam infeções sistémicas graves, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, sendo crucial a administração de antibioterapia adequada (8,9). Em caso de necessidade de terapêutica empírica, é recomendada, como primeira linha de tratamento, a administração de ciprofloxacina, ceftriaxone ou azitromicina (10). No entanto, o aumento crescente da taxa de multirresistência aos antibióticos, especialmente no caso de *S. Typhi*, limita a escolha dos antibióticos a administrar, sendo recomendada

adaptação relativamente aos padrões de resistência de cada país (5,6,10,11). Apesar de não ser uma doença endémica em Portugal, é importante caracterizar os isolados circulantes no nosso país, não só para detetar precocemente eventuais surtos, mas também para adequar o tratamento, visando minimizar os riscos para a saúde pública (5).

_Objetivos

Com este estudo pretendeu-se identificar os perfis de resistência aos antibióticos mais frequentes de isolados de *Salmonella* dos serotipos Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B e Paratyphi C, no período entre janeiro de 1994 e maio de 2024, bem como identificar os seus genes de resistência. Adicionalmente, foi avaliada a proximidade genética das estirpes em estudo.

_Materiais e métodos

Para realização deste trabalho, foram analisados isolados de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* e *C*, recebidos e identificados no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 1994 e maio de 2024. A serotipagem foi realizada de acordo com o esquema de *Kauffman-White-Le Minor* (12). 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) (13). Foi testado um painel de 18 antibióticos, que incluíam: ampicilina (AMP) (10 µg), amoxicilina+ácido clavulânico (AMC) (30 µg), tetraciclina (TET) (30 µg), cefoxitina (FOX) (30 µg), ceftazidima (CZD) (10 µg), cefepime (FEP) (30 µg), cefotaxima (COX) (5 µg), ceftriaxona (CRO) (30 µg), ácido nalidíxico (NAL) (30 µg), cloranfenicol (CHL) (30 µg), gentamicina (GMN) (10 µg), pefloxacina (PEF) (5 µg), trimetoprim (TMP) (5 µg), sulfametoxazol (SMX) (100 µg), meropenemo (MEM) (10 µg), azitromicina (AZM) (15 µg), tigeciclina (TGC) (15 µg) e amicacina (AKN) (30 µg). Uma estirpe foi considerada multirresistente quando apresentou resistência a três ou mais classes diferentes de antibióticos. Todos os isolados foram sujeitos a sequenciação total

do genoma (WGS), utilizando a tecnologia Illumina, e a análise genómica foi realizada recorrendo às plataformas *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>), *Center for Genomic Epidemiology* (<https://www.genomicepidemiology.org/services>) e *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (<https://card.mcmaster.ca>).

_Resultados

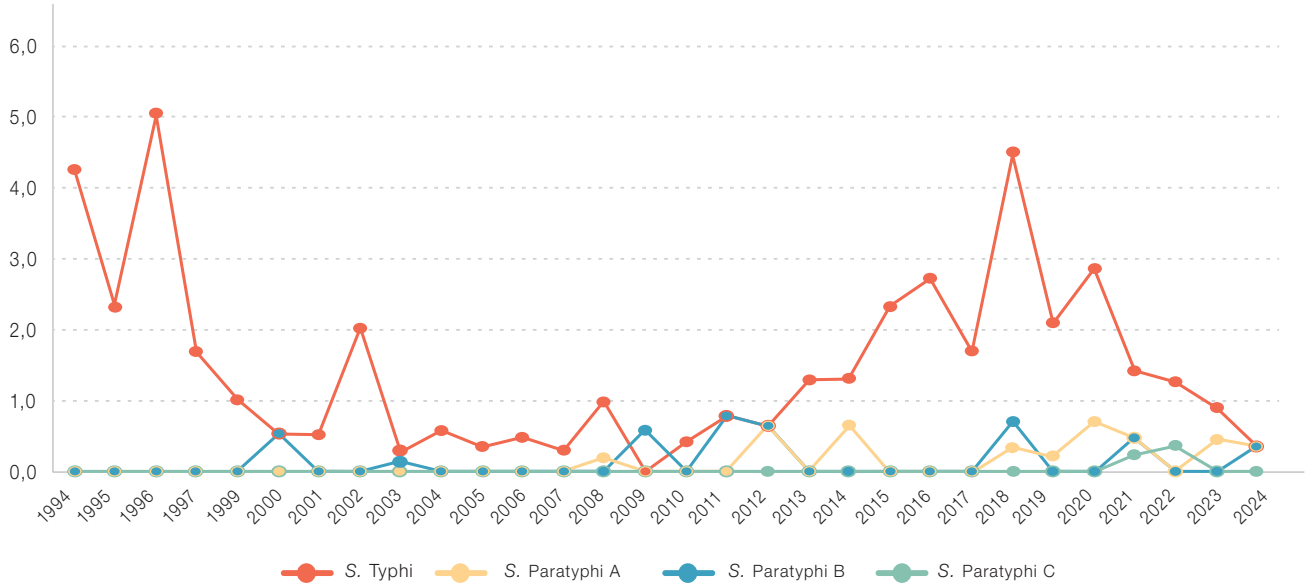
Entre janeiro de 1994 e maio de 2024 foram recebidos no INSA 168 isolados clínicos de *S. Typhi* (n=148), *S. Paratyphi A* (n=10), *B* (n=7) e *C* (n=3). No gráfico 1, é possível observar a distribuição temporal destes isolados.

Tendo em conta que 48,8% dos isolados (82/168) não se conseguiram recuperar para realização de testes de suscetibilidade aos antibióticos e WGS, neste estudo foram considerados 86 isolados: 66 isolados de *S. Typhi*, dez isolados de *S. Paratyphi A*, sete isolados de *S. Paratyphi B* e três isolados de *S. Paratyphi C*.

No total, 60,5% (52/86) dos isolados foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados, o que correspondeu a 60,6% (40/66) dos isolados de *S. Typhi*, 100% (10/10) dos isolados de *S. Paratyphi A* e 28,6% (2/7) dos isolados de *S. Paratyphi B*. Por outro lado, todos os isolados de *S. Paratyphi C* (n=3) apresentaram suscetibilidade aos antibióticos testados (gráfico 2), assim como todos os isolados (n=14) anteriores a 2017.

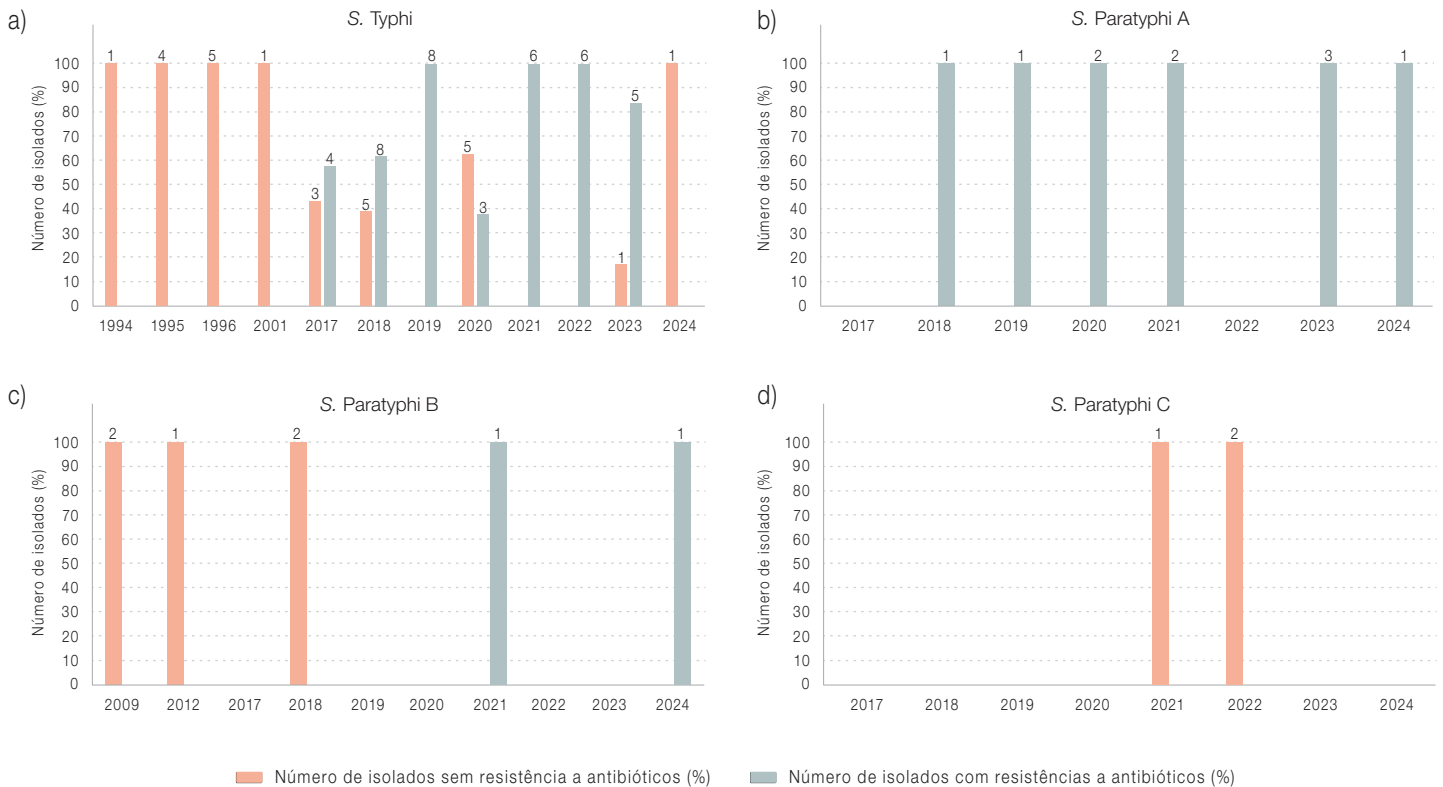
Foram identificados diversos perfis de resistência (gráfico 3), sendo o perfil mais comum a resistência à classe das (fluoro)quinolonas (NAL, PEF), observado em 90,0% (9/10) dos isolados de *S. Paratyphi A*, 31,8% (21/66) de *S. Typhi* e 14,3% (1/7) de *S. Paratyphi B*. A diversidade de perfis foi mais evidente nos isolados de *S. Typhi*. De referir que 15,4% (8/52) dos isolados de *S. Typhi* apresentaram perfil de multirresistência. A resistência à pefloxacina (76,9%; 40/52), ácido nalidíxico (69,2%; 36/52), ampicilina (28,8%; 15/52), trimetoprim (26,9%; 14/52), sulfametoxazol (23,1%; 12/52) e cloranfenicol (17,3%; 9/52), foram as mais frequentes. Todos os isolados foram suscetíveis à amicacina, azitromicina, cefoxitina, gentamicina, meropenemo e tigeciclina (100%; 52/52).

Gráfico 1: Distribuição temporal da percentagem de isolados (%) de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* e *C* serotipados no INSA entre janeiro de 1994 e maio de 2024.



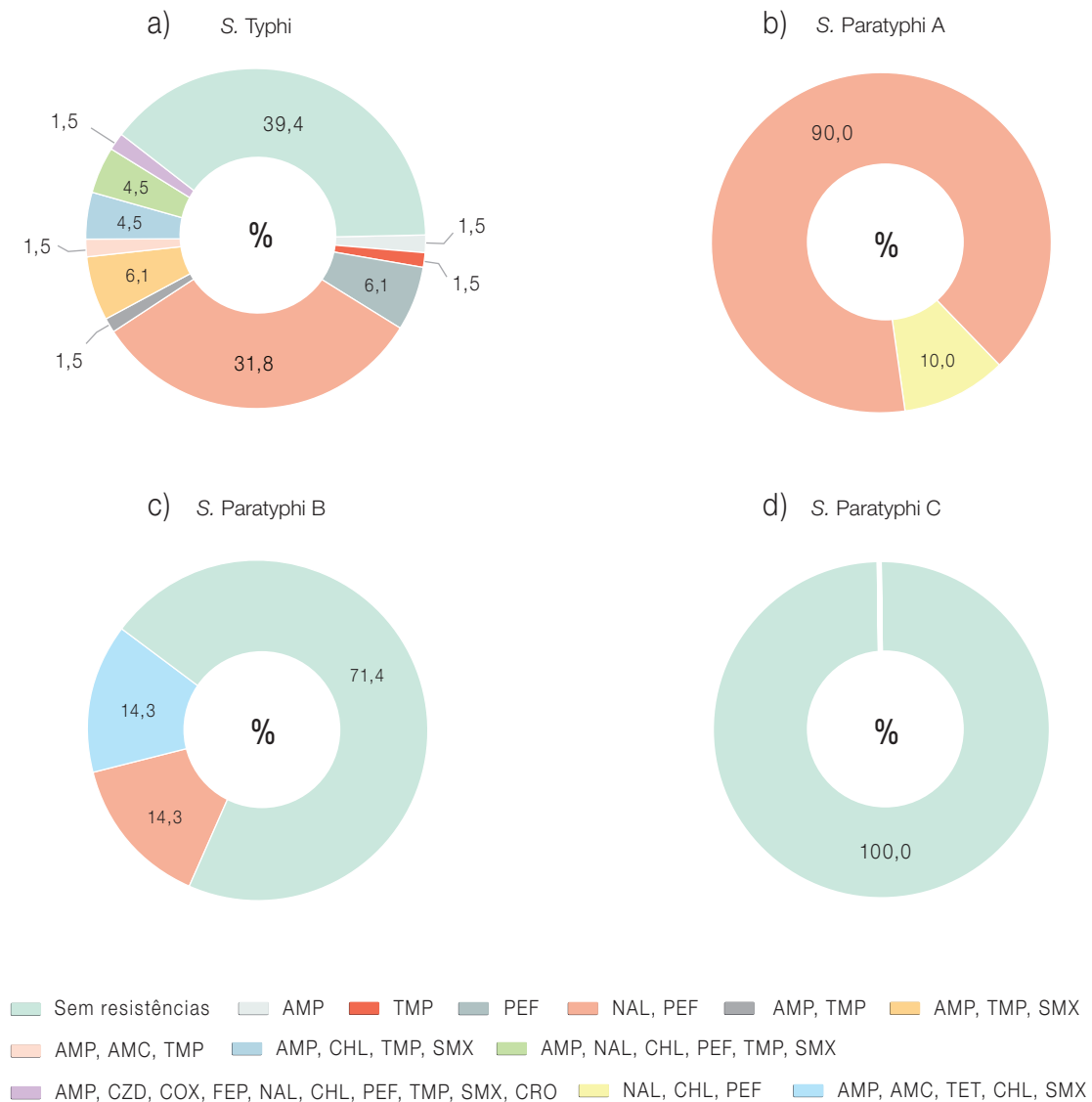
Foram omitidos os anos em que não foram identificados os serotipos em estudo.

Gráfico 2: Distribuição temporal do número de isolados (%) de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* e *S. Paratyphi C* resistentes e suscetíveis aos 18 antibióticos testados.



Foram omitidos os anos anteriores a 2017 em que não foram recuperados isolados.

Gráfico 3: Distribuição da suscetibilidade e dos perfis de resistência observados nos isolados de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* e *S. Paratyphi C*, entre janeiro de 1994 e maio de 2024.



Na **tabela 1** encontram-se descritos os perfis fenotípicos de resistência aos antibióticos testados, bem como os genes de resistência identificados após WGS. Todos os perfis fenotípicos de resistência aos antibióticos foram concordantes com a análise dos genes de resistência. Num isolado multirresistente de *S. Typhi*, de 2020, foi identificado o gene *bla_{CTX-M-15}*, uma β -lactamase de espectro alargado (ESBL).

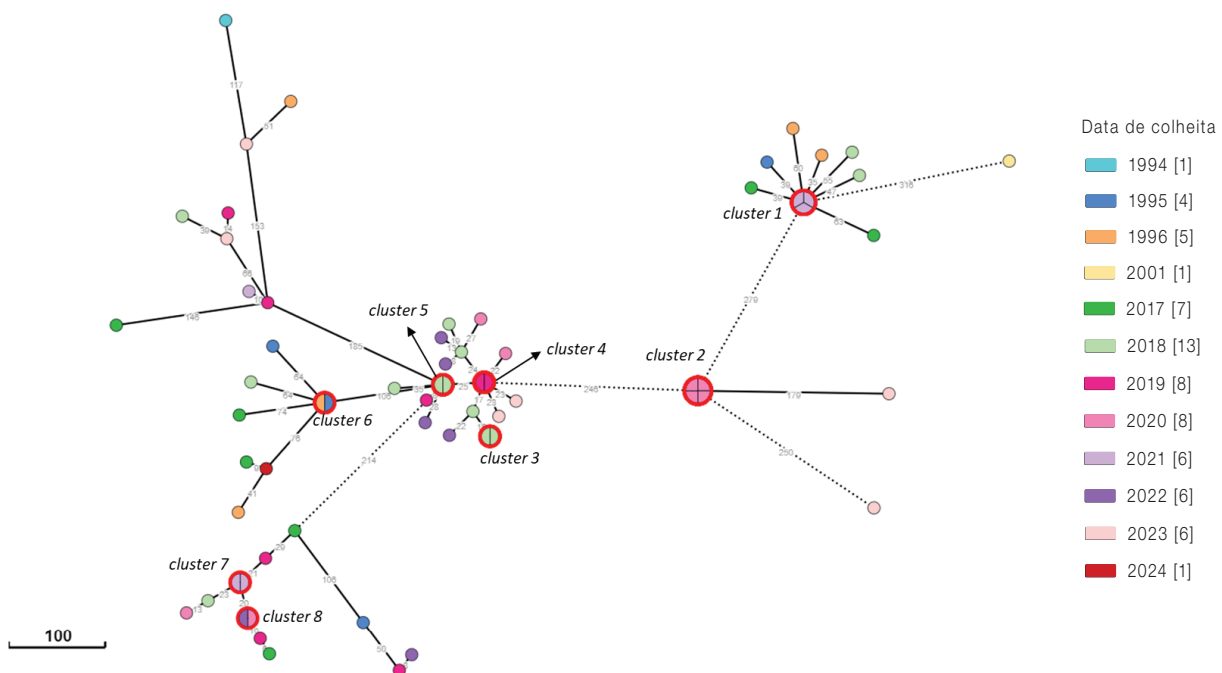
Através da análise de *core genome multilocus sequence typing* (*Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1*) dos 86 isolados estudados, recorrendo a um *threshold* de cinco diferenças alélicas (HC5), foi possível identificar oito *clusters* integrando isolados de *S. Typhi* (**figura 1**) e três *clusters* integrando, respetivamente, isolados de *S. Paratyphi A*, *B* e *C* (**figura 2**). Quatro *clusters* (*cluster 6, 8, A e C*) integram isolados de diferentes anos (**figura 1 e 2**).

Tabela 1: Genes de resistência e mutações pontuais associados aos perfis de resistência aos antibióticos observados nos isolados de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* e *C*, entre 1994 e maio de 2024.

Perfil fenotípico de resistência	Genes de resistência	Número de isolados (n=86)
Suscetível		34
Resistente		52
AMP	<i>bla</i> _{TEM-1B}	1
TMP	<i>dfrA7</i>	1
PEF	<i>gyrB</i> (p.S464F)	4
NAL, PEF	<i>gyrA</i> (p.D87N; p.S83F; p.S83Y), <i>parC</i> (p. T57S), <i>qnrB19</i>	31
AMP, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>dfrA7</i>	1
NAL, PEF, CHL	<i>gyrA</i> (p. S83Y), <i>parC</i> (p. T57S), <i>sdia</i>	1
AMP, SMX, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sul1</i> , <i>drfA7</i>	4
AMP, AMC, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>dfrA7</i>	1
AMP, CHL, SMX, TMP	<i>aph(6)-I_d</i> , <i>aph(3'')-I_b</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>catA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA7</i>	3
AMP, AMC, CHL, SMX, TET	<i>aadA2</i> , <i>bla</i> _{CARB-2} , <i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(G)</i>	1
AMP, NAL, PEF, CHL, SMX, TMP	<i>aph(6)-I_d</i> , <i>aph(3'')-I_b</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>gyrA</i> (p. S83F, p. S83Y; p.D87G), <i>parC</i> (p. S80I), <i>catA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA7</i>	3
AMP, COX, CRO, CZD, FEP, NAL, PEF, CHL, SMX, TMP	<i>aph(6)-I_d</i> , <i>aph(3'')-I_b</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>qnrS1</i> , <i>gyrA</i> (p. S83F), <i>catA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA7</i>	1

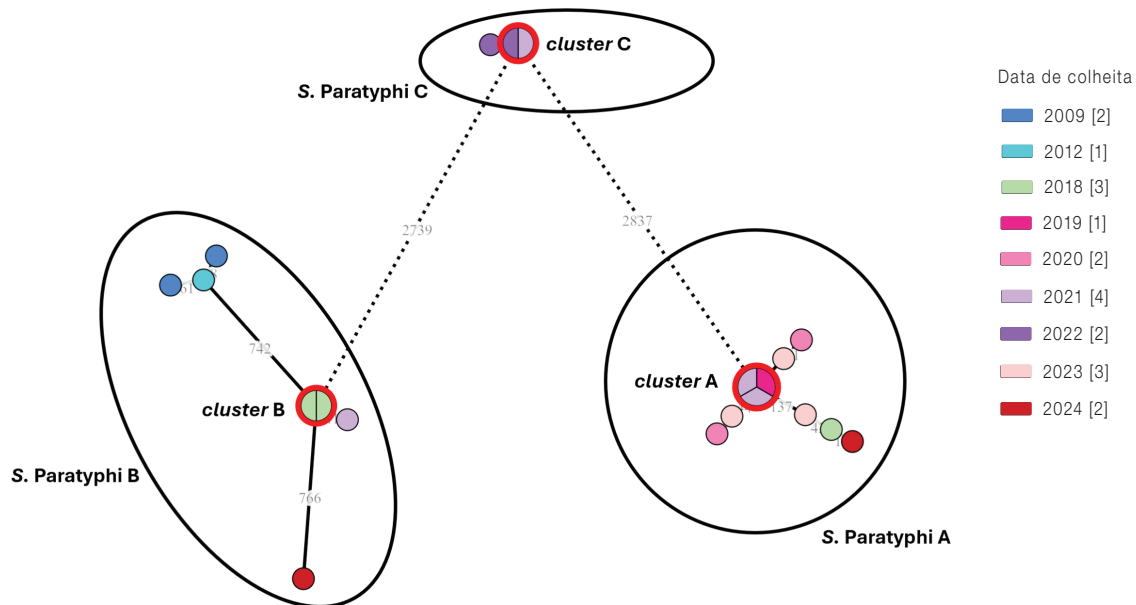
AMC, amoxicilina +ácido clavulânico; AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol; CZD, ceftazidima; COX, cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; FEP, cefepime; NAL, ácido nalidixico; PEF, pefloxacina; SMX, sulfametoxazol; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim.

Figura 1: Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *S. Typhi*, baseada no cgMLST de 66 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. 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 200.

Figura 2: Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *S. Paratyphi* A, B e C, baseada no cgMLST de 20 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. 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 2000.

_Discussão

No período entre janeiro de 1994 e maio de 2024 foram analisados 86 isolados clínicos. Destes, 66 foram serotipados como Typhi, dez como Paratyphi A, sete como Paratyphi B e três como Paratyphi C. Segundo o último relatório epidemiológico europeu de febre tifoide e paratifoide, o número de casos reportados de *S. Typhi* ($n=990$; 69%) foi significativamente superior aos de *S. Paratyphi A* ($n=318$; 22%), *S. Paratyphi B* ($n=91$; 6%) e *S. Paratyphi C* ($n=11$; 1%), tal como observado em anos anteriores (4,5). Na ausência de informações epidemiológicas complementares dos pacientes (país de origem, viagens recentes, entre outros) podemos apenas supor que estes casos tenham surgido em contexto familiar ou que tenham ocorrido após viagens a países onde a febre tifoide e paratifoide são endémicas, tal como acontece nos restantes países europeus.

Neste estudo, 60,5% dos isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico e, desses, 15,4% foram multirresistentes. Tal como reportado por outros países, a resistência aos antibióticos foi maior nos serotipos Typhi e Paratyphi A (5,6,11,14-18). Apesar do número reduzido de isolados incluídos neste estudo, foi possível observar uma tendência crescente na resistência aos antibióticos testados, especialmente no caso de *S. Typhi*, sendo que até 2017 todos os isolados analisados foram suscetíveis. Estes dados estão em consonância com os dados internacionais, que têm evidenciado um aumento do número de isolados resistentes e multirresistentes (7,11,16-18).

Globalmente, as resistências mais frequentes foram à pefloxacina (76,9%), ácido nalidíxico (69,2%), ampicilina (28,8%), trimetoprim (26,9%), sulfametoxazol (23,1%) e cloranfenicol (17,3%), tendo o perfil de resistência NAL-PEF

sido o mais observado em *S. Typhi* (31,8%) e *Paratyphi A* (90,0%). A sequenciação total do genoma permitiu identificar os genes de resistência preditivos dos perfis de resistência encontrados, destacando-se a presença dos genes *bla*_{CTX-M-15} (cefalosporinas), *bla*_{TEM-1B} (ampicilina), *catA1* (cloranfenicol), *dfrA7* (trimetoprim), *sul1/sul2* (sulfametoxazol), *qnrB19* e das mutações pontuais em *gyrA*, *gyrB* e *parC* (fluoroquinolonas). A identificação de um isolado de *S. Typhi* de 2020 extensivamente resistente aos antibióticos (XDR), com resistência a ampicilina, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, (fluoro)quinolonas, cloranfenicol, sulfametoxazole e trimetoprim, e com uma betalactamase de espectro alargado (*bla*_{CTX-M-15}) vem reforçar o conceito de que a escolha dos antibióticos a administrar é cada vez mais um desafio para a prática clínica (5,6,11,13,19). A resistência de *S. Typhi* a cada um destes antibióticos tem sido descrita em vários países ao longo dos anos (20).

A análise de cgMLST identificou oito pequenos *clusters* de *S. Typhi* e três pequenos *clusters* cada um integrando isolados de *S. Paratyphi A*, *B* e *C*. A existência destes *clusters* pressupõe uma provável origem comum dos isolados integrantes de cada *cluster*. No entanto, sem informação epidemiológica complementar, esta observação não passa de uma suposição.

Conclusão

Apesar de a febre tifóide/paratifóide ser uma doença de declaração obrigatória (DDO) em Portugal (21), a subnotificação de casos é um desafio, transversal aliás a todas as DDO (22,23).

Dada a importância das infeções causadas por serotipos *Typhi* e *Paratyphi*, estas não devem ser negligenciadas, mesmo não sendo endémicas em Portugal. Não só por causarem sintomas graves, levarem frequentemente ao internamento e até morte, que se traduz numa carga económica e de doença elevada, mas também devido ao aumento das resistências aos antibióticos, que constitui um verdadeiro desafio ao tratamento destas doenças.

Assim, não só é essencial a notificação clínica atempada de todos os casos, mas também é importante manter uma vigilância laboratorial contínua, que permita caracterizar os isolados circulantes em Portugal e detetar de forma precoce potenciais surtos, que deverão ser sempre suportados pela investigação epidemiológica conduzida pelas entidades competentes, de maneira a implementar medidas de prevenção e controlo eficazes.

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) World Health Organization. Typhoid vaccines: WHO position paper – March 2018. *Weekly Epidemiological Record*. 2018;93(13):153-72. <https://iris.who.int/handle/10665/272273>
- (2) Institute of Health Metrics and Evaluation. Global Burden of Disease Compare, 2021 [online]. [consult. 27/06/2024]. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
- (3) Sanderson KE, Liu S, Tang L, et al. Chapter 71 - Salmonella Typhi and Salmonella Paratyphi A. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, et al. (eds). *Molecular Medical Microbiology*. 2nd ed. Academic Press, pp. 1275–1306. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397169-2.00071-8>
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Typhoid and paratyphoid fever: Annual Epidemiological Report for 2018. Stockholm: ECDC, 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/-typhoid-paratyphoid-fever-annual-epidemiological-report-2018.pdf>
- (5) European Centre for Disease Prevention and Control. Typhoid and paratyphoid fever: Annual Epidemiological Report for 2019. Stockholm: ECDC, 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/-typhoid-paratyphoid-fever-annual-epidemiological-report-2019.pdf>
- (6) GRAM Typhoid Collaborators. Estimating the subnational prevalence of antimicrobial resistant Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi A infections in 75 endemic countries, 1990-2019: a modelling study. *Lancet Glob Health*. 2024 Mar;12(3):e406-e418. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00585-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00585-5)
- (7) Hendriksen RS, Leekitcharoenphon P, Lukjancenko O, et al. Genomic signature of multidrug-resistant Salmonella enterica serovar typhi isolates related to a massive outbreak in Zambia between 2010 and 2012. *J Clin Microbiol*. 2015 Jan;53(1):262-72. <https://doi.org/10.1128/JCM.02026-14>
- (8) J Barton A, Hill J, J Blohmke C, J Pollard A. Host restriction, pathogenesis and chronic carriage of typhoidal Salmonella. *FEMS Microbiol Rev*. 2021 Sep 8;45(5):-fuab014. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab014>

artigos breves_ n. 4

- (9) Ministério da Saúde. Serviço Nacional de Saúde. Febre tifoide [online]. [consult. 27/06/2024]. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/febre-tifoide/>
- (10) Moja L, Zanichelli V, Mertz D, et al. WHO's essential medicines and AWaRe: recommendations on first- and second-choice antibiotics for empiric treatment of clinical infections. *Clin Microbiol Infect.* 2024;30(Suppl 2):S1-S51. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2024.02.003>
- (11) Akram J, Khan AS, Khan HA, et al. Extensively Drug-Resistant (XDR) Typhoid: Evolution, Prevention, and Its Management. *Biomed Res Int.* 2020 May 2;2020:6432580. <https://doi.org/10.1155/2020/6432580>
- (12) 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
- (13) 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
- (14) 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>
- (15) Nuanmuang N, Leekitcharoenphon P, Njage PMK, et al. An Overview of Antimicrobial Resistance Profiles of Publicly Available Salmonella Genomes with Sufficient Quality and Metadata. *Foodborne Pathog Dis.* 2023 Sep;20(9):405-413. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0080>
- (16) Pfeifer Y, Matten J, Rabsch W. Salmonella enterica serovar Typhi with CTX-M beta-lactamase, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2009 Sep;15(9):1533-5. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090567>
- (17) Britto CD, Wong VK, Dougan G, et al. A systematic review of antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovar Typhi, the etiological agent of typhoid. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Oct 11;12(10):e0006779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006779>
- (18) WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean. Drug resistant Salmonella infections in Pakistan: update. *Weekly Epidemiological Monitor.* 2019;12(34). https://applications.emro.who.int/docs/epi/2019/Epi_Monitor_2019_12_34.pdf?ua=1
- (19) 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>
- (20) Walker J, Chaguza C, Grubaugh ND, et al. Assessing the global risk of typhoid outbreaks caused by extensively drug resistant Salmonella Typhi. *Nat Commun.* 2023 Oct 16;14(1):6502. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42353-9>
- (21) Despacho n.º 1150/2021, de 28 de janeiro. DR n.º 19/2021, Série II de 2021-01-28:137-90. Doenças de notificação obrigatória a notificar na plataforma de apoio ao SINAVE (Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica) ou no SI-Vida (Sistema de informação VIH/SIDA). <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/1150-2021-155575942>
- (22) Eufrásio R, Lopes F. Vigilância epidemiológica um desafio multidisciplinar in Riscos para a saúde em contexto pandémico: reflexões sobre o impacte da COVID-19. *Territorium: Revista Internacional de Riscos.* 2023;30(I). https://doi.org/10.14195/1647-7723_30-1_7
- (23) Puça FM. Auditoria Clínica às Doenças de Notificação Obrigatória. (Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2017). <https://hdl.handle.net/10216/109147>