Salmonella enterica serótipo 4,[5],12:i:-, um perigo emergente de segurança alimentar

Joana Mourão[1], Laura Dias[1,2], Liliana Ferreira[1,2], Tatiana Alves[1], Jorge Machado[3], Carla Novais[4], Luísa Peixe[1] e Patrícia Antunes[1,2]

[1] REQUIMTE. Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal
[2] Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Portugal
[3] Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal
[4] CEBIMED. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal

Introdução

- *Salmonella enterica* é um dos agentes zoonóticos mais importantes e uma das causas mais frequentes de doença de origem alimentar[1]. Esta espécie inclui mais de 2500 serótipos e a emergência de novos serótipos e estirpes patogénicas de *Salmonella* representa um importante problema de Saúde Pública.
- *Salmonella enterica* serótipo 4,[5],12:i:- tornou-se nos últimos anos um dos serótipos mais frequentes associados com infecção humana e transmissão pela cadeia alimentar, com distribuição mundial, indiciando uma fácil adaptabilidade a condições adversas e infecciosidade dessas estirpes[1,2]. Este serótipo é considerado uma variante monofásica do serótipo *S.* Typhimurium (4,[5],12:i:1,2) um serótipo de reconhecida patogenicidade[3,4,5].
- De acordo com a EFSA, na Europa este serótipo teve um aumento exponencial de 367 casos em 2007 para 1416 casos em 2009[1] **(Figura 1)**. Em Portugal, segundo o Centro Nacional de *Salmonella*, o serótipo 4,[5],12:i:- foi considerado como o terceiro mais frequentemente isolado em casos de salmonelose humana nos últimos 5 anos (dados não publicados).
- No entanto, dificuldades na correcta identificação deste serótipo têm impedido o seu adequado seguimento epidemiológico.

Figura 1 – Números de casos reportados de *Salmonella enterica* serótipo 4,[5],12:i:-, na União Europeia desde 2007 a 2009 [1].

Objectivos

1. Implementação e respectiva validação, de metodologia genotípica para identificação do serótipo *S.* 4,[5],12:i:-
2. Caracterização fenotípica e genotípica da resistência aos antibióticos e avaliação das relações clonais entre isolados deste serótipo obtidos em Portugal de diferentes origens (humana, animal, alimentos e ambiente)

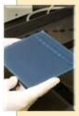
Material e Métodos

Isolados. Foram incluídos 165 isolados identificados serologicamente como *Salmonella enterica* serótipo 4,[5],12:i:-, obtidos entre 2002-2010, de várias regiões do país e de diferentes fontes: isolados clínicos humanos (n=146), produtos alimentares (n=10), ambiente (n=5) e suiniculturas (n=4).

Susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Determinada pelo método de difusão em agar com discos de acordo com o preconizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute*[6]. Em todos os isolados resistentes à amoxicilina foi feito o teste do duplo sinergismo para detecção de beta-lactamases de especto alargado (ESBL)[6].

Confirmação do serótipo 4,[5],12:i:-. Efectuada por PCR (região intergénica *fliA-fliB* e gene *fljB*), com algumas modificações ao originalmente proposto pela *European Food Safety Authority* (EFSA)[3,7].

Caracterização genotípica. A pesquisa de genes de resistência a antibióticos e de integrões de classe 1 foi feita por PCR, RFLP e sequenciação conforme descrito anteriormente[8,9].



Relação Clonal e Análise da Estrutura Populacional. O estudo da relação clonal entre os isolados foi feito por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) com digestão do DNA genómico pela enzima *Xba*I[8,9]. O *Multilocus sequence typing* (MLST) foi realizado utilizando *primers* específicos para amplificação dos 7 genes *housekeeping* (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA*), de acordo com a base de dados de MLST (http://mlst.ucc.ie/mlst).

Conclusões

- **Os nossos resultados, os primeiros em Portugal, mostram que os perfis de resistência aos antibióticos dos isolados correspondem a agentes antimicrobianos frequentemente utilizados na produção animal.**
- **Este estudo demonstra também que a emergência de *Salmonella* do serótipo 4,[5],12:i:- em humanos está associada à disseminação de linhagens clonais mundialmente reconhecidas com perfis de multi-resistência e com origem em suiniculturas e alimentos de origem animal.**

Resultados

Figura 2 – Percentagens de resistências aos diferentes antibióticos testados.

- Apenas 132 isolados foram confirmados como *S.* 4,[5],12:i:- e seleccionados para estudos posteriores. Todos os isolados com excepção de 2 (99%) foram resistentes a pelo menos 1 antibiótico, sendo 93% multi-resistentes (MDR, variando de 2-8 antibioticos). As principais resistências foram: sulfametoxazole (Su/92%), tetraciclina (T/91%), estreptomicina (S/88%), amoxicilina (A/67%), cloranfenicol (C/45%), trimetropim (Tr/35%) e gentamicina (G/27%) **(Figura 2)**.

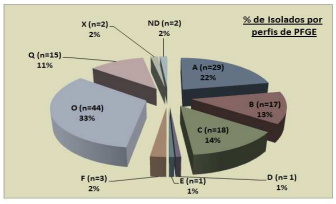


Figura 3 – Distribuição dos isolados por clones de PFGE.

Figura 4 – Fenótipos de resistência aos agentes antimicrobianos

- No estudo da relação clonal por PFGE foram identificados 9 clones **(Figura 3)** associados a diferentes perfis de MDR **(Figura 4, Tabela 1)** e genótipos, sendo três predominantes:
  i) Perfil ASSuT (n=48; *bla*TEM, *strA-strB*, *sul2* e *tetB)*, associado a 4 clones e ao ST34 (SLV do ST19), também conhecido como "**clone Europeu**"[10];
  ii) Perfil MDR (n=45), sendo a maioria do fenótipo ACGSSuTTr (n=27; *bla*TEM, *cmlA1*, *aac(3)-IV*, *aadA*, *sul1-sul2-sul3*, *tetA* e *dfrA12*), pertencentes ao clone O/X, e ao mundialmente disseminado ST19 e fagotipo DT104/U302, denominado "**clone Espanhol**"[11];
  iii) Perfil CSSuTTr (n=15; *cmlA1*, *aadA*, *sul3*, *tetB* e *dfrA12*) associado a um clone (Q) e ao ST19.

Tabela 1 – Caracterização genotípica e fenotípica de isolados de *Salmonella* 4,[5],12:i:- de Portugal

Serótipo* (Fagotipo)	Tipo PFGE[B]	MLST-ST (Nº isolados)	Origem nº de isolados	Ano/Região	Fenótipo de Resistência[A] / genótipo	Integrão de classe 1[C] genes (bp)
S. Typhimurium 4,5:i:- (DT104/U302)	O	ST19 (n=5)	Clínica = 30 Ambiente = 4 Alimento = 7 Suinicultura = 2	2004-2010 / Norte; Sul	S, C, Su (G, K, A, T, Tr, NA) *aadA12, cmlA1, sul1-sul2-sul3 (floR, aac(3)-IV, blaTEM, tetA-tetB, dfrA12)*	*intI1. sul1. aacE Δ1 dfrA12-orf-aadA2 (2000bp)* Type III - *sul3 (intI1. su3. aacH)*
	X		Clínica = 2		A, S, G, T, C, Su, Tr *blaTEM, aadA, aac(3)-IV, tetA, cmlA1, sul1-sul2-sul3, dfrA12*	
S. Typhimurium 4,5:i:-	Q	ST19 (n=3)	Clínica = 14 Alimento = 1	2003-2010 / Norte; Sul	C, T, Su, Tr, S) *cmlA1, tetB, sul3 (dfrA12, aadA)*	Type I - *sul3 (intI1,sul3,aacH)*
S. Typhimurium 4,5:i:-	A	ST34 (n=4)	Clínica = 27 Ambiente = 1 Suinicultura = 2	2003-2010 / Norte; Sul	A, S, Su, T (Tr) *blaTEM, strA-strB, sul2, tetB (aadA, dfrA1)*	-
	B		Clínica = 17		A, S, Su, T (G, C, Tr) *blaTEM, strA-strB, sul2, tetB (floR, dfrA12)*	
	C		nd[F]		A, S, Su, T (K) *blaTEM, strA-strB, sul2, tetB (aadA)*	
	D		Clínica = 1		A, S, Su, T *blaTEM, strA-strB, sul2, tetB*	
	E		nd[F]		-	-
	F		Clínica = 3	2004-2009 / Norte; Sul	T *tetB*	-
	nd[F]	nd[F]	Clínica = 2		T (S, Su) *tetB, (sul2)*	-

[B] PCR para a identificação de *Salmonella enterica* serótipo Typhimurium fagotipos DT104 e U302
[C] Os tipo de PFGE que aparecem a negrito representam clones persistentes e disseminados
[A] A, amoxicilina; C, cloranfenicol; G, gentamicina; K, canamicina; NA, ácido nalidíxico; S, estreptomicina; Su, sulfametazole; T, tetraciclina; Tr, trimetoprim
[C] integrões atípicos caracterizados: Tipo I-sul3 (5'CS-dfrA12-orf-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-tnpA-sul3-tnp); Tipo III-sul3 (5'CS-estX-psp-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-tnpA-sul3-tnp)
[F] não determinado

BIBLIOGRAFIA:

[1] – EFSA. European Food Safety Authority. 2011. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2009, The EFSA Journal 9(3):2090.
[2] – Hauser E. *et al.* Pork Contaminated with *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:-, an Emerging Health Risk for Humans. *Applied and Environmental Microbiology*. July 2010. 76:4601-4610.
[3] - EFSA. European Food Safety Authority. 2010. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "*Salmonella* Typhimurium-like" strains. The EFSA Journal 8: 1826.
[4] - Dionisi A *et al.* Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Strains of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and Monophasic Variant (S. 4,[5],12:i:-) Isolated from Human Infections in Italy. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2009. 6:711-717.
[5] – Prichett LC. Konkel ME. Gay JM. Besser TE. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enteric* Serotype Typhimurium isolates by PCR. *J Clin Microbiol*. 2000. 38:3484-3488.
[6] - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeen Informational Supplement M100-S17*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2007.
[7] – Tennant S. Diallo S. Levy H. Livio S. Sow S. *et al.* Identification by PCR of Non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars Associated with Invasive Infections among Febrile Patients in Mali. 2010. 9:621.
[8] - Antunes P, Machado J, Peixe L. 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. J Antimicrob Chemother 58:297-304.
[9] - Antunes P, Machado J, Peixe L. 2007. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. Antimicrob Agents Chemother 51:1545-1548.
[10] – Lucarelli C. Dionisi A. Torpdahal M. *et al.* Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark and the United Kingdom. *J. Clin. Microb.* 2010. 48:2103-2109.
[11] – Garcia P. Guerra B. Bances M. Mendoza M. Rodicio M. IncA/C plasmids mediate antimicrobial resistance linked to virulence genes in the Spanish clone of the emerging *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:-, *Journal Antimicrob Chemother*. December 2010. 66:543-9.

AGRADECIMENTOS: Projecto Financiado pela Universidade do Porto / Santander Totta "Projectos Pluridisciplinares 2010"