

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Escola de Veterinária da UFMG  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Letícia Cury Rocha Veloso Arantes

**DELEÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS ANTI-  
INFLAMATÓRIAS EM *Salmonella Pullorum*: impacto sobre a persistência e a virulência  
em *Gallus gallus domesticus***

Belo Horizonte  
2024

Letícia Cury Rocha Veloso Arantes

**DELEÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS ANTI-  
INFLAMATÓRIAS EM *Salmonella Pullorum*: impacto sobre a persistência e a virulência  
em *Gallus gallus domesticus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Oliveiro Caetano de Freitas Neto

Coorientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

Belo Horizonte  
2024

A662d Arantes, Letícia Cury Rocha Veloso, 1995 -  
Deleção de genes codificadores de proteínas anti-inflamatórias em *Salmonella Pullorum*: impacto sobre a persistência e a virulência em Gallus Domesticus/ Letícia Cury Rocha Veloso Arantes.- 2024.  
50f: il.

Orientador: Oliveiro Caetano de Freitas Neto  
Coorientador: Renato de Lima Santos  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.  
Bibliografia: f. 46 – 50.

1. Salmonelose em animais - Teses - 2. Ave doméstica – Doenças - Teses - I. De Freitas Neto, Oliveiro Caetano – II. Santos, Renato de Lima – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.508 96



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

### FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA CURY ROCHA VELOSO ARANTES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 02 de fevereiro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto - Orientador

Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva

Dr. Celso José Bruno de Oliveira



Documento assinado eletronicamente por Oliveira Caetano de Freitas Neto, Professor do Magistério Superior, em 02/02/2024, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Celso José Bruno de Oliveira, Usuário Externo, em 05/02/2024, às 14:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Mauro de Mesquita Souza Saraiva, Usuário Externo, em 05/02/2024, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2987604 e o código CRC C3B5C9C9.

Dedico este trabalho com todo carinho à minha mãe, Eliane, e aos meus irmãos, Mariana e Fabiano, fontes de força e motivação, que estiveram incessantemente ao meu lado, oferecendo suporte na jornada para a realização dos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que me acompanha incondicionalmente, permitindo que eu tenha saúde e força para cumprir meus propósitos.

À minha amada mãe, Eliane, que sempre me apoia na jornada acadêmica e pessoal, ajudando-me a superar os momentos de adversidade e fortalecendo-me com suas orações. Aos meus irmãos Mariana e Fabiano, que representam um porto seguro na minha caminhada, e cuja euforia por cada uma das minhas conquistas é expressa com tanta sinceridade. Aos meus sobrinhos, Francesco, Marina, Ana Tereza e Melissa por serem uma fonte inesgotável de alegria na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Oliveiro Caetano de Freitas Neto, pela confiança depositada em minha capacidade, pelo apoio nos momentos desafiadores e por compartilhar suas experiências, que tanto enriqueceram minha jornada acadêmica.

Ao meu coorientador, Prof. Renato de Lima Santos, pelo seu profissionalismo e pela oportunidade de aprender com sua equipe.

À Victória, minha amiga e companheira de estudos, por suas valiosas contribuições a este trabalho. Ao William, por ter me encorajado a ingressar no mestrado e pela constante confiança na minha capacidade. Aos colegas do setor de patologia Eric, Maira e Marcelo que participaram das coletas com leveza e alegria. À Thaís, que com muito bom humor compartilhou experiências e técnicas de biologia molecular. Às IC's do nosso grupo de pesquisa, Larissa e Julia, pelo cuidado com as aves. Às residentes Camilla e Júlia, e à toda equipe do Laboratório de Doenças das Aves pelo suporte.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelos ensinamentos essenciais para o sucesso deste trabalho e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade. Agradeço também à Universidade Federal de Minas Gerais e a Escola de Veterinária por todo conhecimento que alcancei durante a execução deste trabalho.

Aos animais utilizados, reconheço e valorizo a importância de cada um deles em contribuir para a ciência.

Ao órgão de fomento CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos. À banca examinadora por estarem presentes e terem aceitado o convite de avaliação do meu trabalho.

## RESUMO

A pulorose (PD) é uma enfermidade avícola não zoonótica provocada por *Salmonella Pullorum* (SP). Essa bactéria pode ser transmitida verticalmente e gerar elevadas taxas de mortalidade em lotes de aves. Uma das suas características é o desencadeamento de infecção persistente em parte do plantel. Alguns estudos têm investigado a persistência de SP em aves. No entanto, os mecanismos envolvidos na sobrevivência de SP e sua evasão do sistema imunológico da ave ainda carecem de esclarecimento. No presente estudo objetivou-se investigar se proteínas efetoras com propriedades anti-inflamatórias teriam relação com a persistência e patogenicidade de SP em aves. Para isso, foram realizadas deleções nos genes *avrA*, *gtgA*, *pipA* e *sseL* em uma estirpe selvagem de SP e geradas quatro estirpes mutantes (SP $\Delta$ *avrA*, SP $\Delta$ *gtgA*, SP $\Delta$ *pipA* e SP $\Delta$ *sseL*). Posteriormente, aves susceptíveis à PD foram separadas em grupos, conforme descrição a seguir. Grupo A (aves inoculadas com SP $\Delta$ *avrA*), B (com SP $\Delta$ *gtgA*), C (com SP $\Delta$ *pipA*), D (com SP $\Delta$ *sseL*), E (com SP), F (aves desafiadas com *Salmonella Gallinarum* para comparação de possível aumento de patogenicidade nas estirpes mutantes) e G (aves sem inoculação). Aos 7 dias de idade as aves receberam por via oral um inóculo contendo a estirpe desafio e foram avaliadas por 10 semanas. Foram realizadas coletas aos 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias pós-infecção (dpi) para avaliar a presença de *Salmonella* spp. em baço e fígado, sinais clínicos e alterações macroscópicas nos órgãos. Aos 7 dpi SP foi detectada em maior quantidade no baço e fígado que as estirpes mutantes. A frequência de detecção de SP e das demais mutantes foi semelhante ao longo do estudo. As aves desafiadas com SP $\Delta$ *avrA* apresentaram sinais clínicos mais intensos da infecção. Não houve diferença estatística nas frequências de alterações macroscópicas entre as aves dos grupos desafiados. De modo geral, os resultados indicaram que não houve diferença na patogenicidade e persistência entre as estirpes mutantes e selvagem de SP.

Palavras-chave: mutagênese; pulorose; persistência; avicultura; proteínas efetoras.

## ABSTRACT

Pullorum disease (PD) is a non-zoonotic poultry disease caused by *Salmonella Pullorum* (SP). This bacterium can be vertically transmitted, resulting in high mortality rates in poultry flocks. One of its characteristics is the induction of persistent infection in part of the flock. Several studies have investigated the persistence of SP in chicks. However, the mechanisms involved in the survival of SP and its evasion from the chick's immune system remains to be clarified. The present study aimed to investigate whether effector proteins with anti-inflammatory properties are related to the persistence and pathogenicity of SP in male layer chickens. For this purpose, deletions were made in the *avrA*, *gtgA*, *pipA*, and *sseL* genes in a wild strain of SP, resulting in four mutant strains (SP $\Delta$ *avrA*, SP $\Delta$ *gtgA*, SP $\Delta$ *pipA*, and SP $\Delta$ *sseL*). Subsequently, PD-susceptible chicks were distributed into the following groups: Group A (chicks inoculated with SP $\Delta$ *avrA*), B (with SP $\Delta$ *gtgA*), C (with SP $\Delta$ *pipA*), D (with SP $\Delta$ *sseL*), E (with SP), F (chicks challenged with *Salmonella Gallinarum* for comparison of possible increased pathogenicity in mutant strains), and G (chicks without inoculation). At 7 days old, the chicks were orally administered a challenge strain and were evaluated over 10 weeks. Samples were collected at 7, 14, 21, 35, 49, and 63 days post-infection (dpi) to assess the presence of *Salmonella* spp. in spleen and liver, clinical signs, and macroscopic changes in the organs. At 7 dpi, a larger quantity of SP was detected in the spleen and liver than the mutant strains. The detection frequency of SP and the other mutants was similar across the groups throughout the study. Chicks challenged with SP $\Delta$ *avrA* showed more intense clinical signs of infection. There was no statistical difference in the frequencies of macroscopic changes among the chicks in the challenged groups. Overall, the results indicated that there were no differences in pathogenicity and persistence between the mutant and wild strains of SP.

Keywords: mutagenesis; pullorum disease; persistence; poultry farming; effector proteins.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo de ativação da via NF- $\kappa$ B (TIZARD, 2014).....	19
Figura 2 – Esquema representativo dos plasmídios pKD3 e pKD46. ....	25
Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % da estirpe receptora do cassete de resistência ao cloranfenicol.....	35
Figura 5 – Lesões macroscópicas encontradas ao longo das coletas. ....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras, plasmídios e iniciadores utilizados.....	24
Tabela 2 – Antibióticos utilizados para clonagem dos plasmídios de mutagênese.....	25
Tabela 3 – Reagentes utilizados para amplificação dos fragmentos de mutagênese.....	28
Tabela 4 – Condições de ciclagem utilizadas no termociclador para amplificar os fragmentos de mutagênese.....	28
Tabela 5 – Iniciadores de verificação da deleção.....	31
Tabela 6 – Reagentes utilizados para amplificação dos fragmentos de mutagênese.....	31
Tabela 7 – Unidades formadoras de colônia UFC/mL dos inóculos por estirpe de <i>S. Pullorum</i> e <i>S. Gallinarum</i> .....	32
Tabela 8 – Médias das contagens de estirpes de <i>Salmonella</i> spp. em baço e fígado das aves aos 7 dias pós-infecção (dpi).....	36
Tabela 9 – Recuperação de estirpes de <i>Salmonella</i> spp. de aves por meio de coleta de órgãos colhidos aos 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias pós-infecção (dpi).....	37
Tabela 10 – Frequências de alterações macroscópicas observadas em aves desafiadas com estirpes de <i>Salmonella</i> spp. ao longo de 65 dias pós-infecção (dpi).....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Amp <sup>r</sup>	Resistência a ampicilina
AVB	Ágar Verde Brilhante
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cf <sup>r</sup>	Resistência ao cloranfenicol
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dpi	Dias Pós-infecção
h	Hora
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IN	Instrução Normativa
JNK	c-Jun N-terminal kinases
IκBα	Inibidor do fator de transcrição nuclear kappa B Alfa
Kb	Kilopares de bases
kV	Kilovolts
LA	Ágar de Lisogenia
LB	Caldo lisogenia
rpm	rotações por minuto
M	Molar
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	Nuclear Factor κB
OMSA	Organização Mundial de Saúde Animal
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PD	Pulorose

PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucleico Mensageiro
<i>S. Abortusovis</i>	<i>Salmonella</i> Abortusovis
<i>S. Dublin</i>	<i>Salmonella</i> Dublin
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> Gallinarum
<i>S. Pullorum</i>	<i>Salmonella</i> Pullorum
<i>S. Typhi</i>	<i>Salmonella</i> Typhi
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
SG	<i>Salmonella</i> Gallinarum SG287/91
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SOB	Super Optimal Broth
SP	<i>Salmonella</i> Pullorum ATCC 9120
SPI	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>
SPI-1	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> 1
SPI-2	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> 2
SPI-5	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> 5
spp.	Espécie
SVO	Serviço Veterinário Oficial
T CD8 <sup>+</sup>	Resposta T citotóxica
T3SS	Sistema de Secreção do Tipo Três
T3SS-2	Sistema de Secreção do Tipo Três da SPI-2
Ta1	Resposta T auxiliar 1
Ta2	Resposta T auxiliar 2
TLRs	Receptores Toll Like
TNF	Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2. <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
2.1. Importância das salmoneloses na avicultura industrial.....	14
2.2. Sorotipos adaptados ao hospedeiro e o desencadeamento de infecção persistente .....	15
2.3. Características fenotípicas e genotípicas de <i>Salmonella Pullorum</i> .....	16
2.4. Imunopatogenia da pulorose .....	17
2.5. Proteínas anti-inflamatórias .....	18
2.6. Regulação dos genes codificadores das proteínas AvrA, SseL, GtgA e pipA.....	21
3. <b>OBJETIVOS</b> .....	22
3.1. Objetivo geral .....	22
3.2. Objetivos específicos .....	22
4. <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1. Considerações iniciais.....	23
4.2. Estirpes utilizadas .....	23
4.3. Construção das estirpes mutantes .....	23
4.3.1. Purificação dos plasmídios utilizados na mutagênese.....	24
4.3.2. Eletroporação do pKD46 em <i>S. Pullorum</i> ATCC 9120 .....	26
4.3.2.1. Teste de rugosidade.....	27
4.3.3. Amplificação dos fragmentos de mutagênese .....	27
4.3.4. Eletroporação dos fragmentos de mutagênese .....	29
4.3.5. Extração de DNA e confirmação da deleção por PCR.....	30
4.4. Preparo do inóculo .....	32
4.5. Ensaio <i>in vivo</i> e avaliação da patogenia.....	33
4.6. Contagem bacteriana.....	33
4.7. Análise Estatística.....	33
5. <b>RESULTADOS</b> .....	34
5.1. Verificação da deleção nas estirpes de <i>S. Pullorum</i> .....	34
5.2. Bacteriologia.....	35
5.3. Avaliação da patogenicidade e achados anatomopatológicos .....	37
6. <b>DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45

## 1. INTRODUÇÃO

A pulorose (PD), causada por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (*S. Pullorum*), é uma enfermidade avícola não zoonótica. Ainda que não associada a surtos alimentares em humanos, a presença deste e outros sorotipos de *Salmonella* em lotes de aves comerciais repercute negativamente no mercado interno e pode afetar as exportações de produtos avícolas (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020).

A Instrução Normativa (IN) 78, parte do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), estabelece medidas para resguardar a indústria avícola nacional diante da detecção de sorotipos específicos de *Salmonella* em lotes de aves reprodutoras (BRASIL, 2003). Casos confirmados devem ser prontamente notificados ao Serviço Veterinário Oficial (SVO), em lotes que testam positivo para *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. A normativa preconiza o sacrifício dos animais e a destruição completa dos ovos do núcleo, ocasionando significativas perdas econômicas para a indústria avícola (BRASIL, 2003). A Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH, 2018) classifica a PD como uma enfermidade de relevância global devido à sua capacidade de transmissão vertical, por provocar infecção persistente em parte dos infectados e pela possibilidade de provocar taxa de mortalidade elevada no plantel.

A infecção persistente observada na pulorose influencia na sua epidemiologia, pois favorece a contínua circulação do patógeno nos plantéis avícolas, além de ser a chave para a transmissão vertical. Essa característica não é exclusiva de *S. Pullorum*, uma vez que outras salmonelas, como *S. Typhi*, *S. Dublin* e *S. Typhimurium*, também exibem essa capacidade (GUNN et al., 2014). Evidências indicam que os microrganismos podem modular o perfil de resposta imune do hospedeiro, afastando-o da resposta do tipo T auxiliar 1 (Ta1), geralmente associada à depuração imunológica de uma infecção aguda, para o tipo T auxiliar 2 (Ta2) ou a uma resposta anti-inflamatória. Além disso, há evidências de que essas bactérias têm a capacidade de modular a transformação de macrófagos do tipo M1 para M2 (TANG et al., 2018).

A capacidade de *S. Pullorum* de manter-se de forma insidiosa no interior dos macrófagos reflete a complexidade das interações patógeno-hospedeiro e reforça a importância de investigar a fundo os mecanismos de sobrevivência e evasão do sistema imune. Durante a infecção por *Salmonella*, diversos mecanismos podem ser empregados pela bactéria para evitar a detecção e neutralização pelo sistema imunológico do hospedeiro. Dentre estes, merece destaque a

estimulação de resposta anti-inflamatória por meio da síntese de proteínas efetoras secretadas pelo sistema de secreção do tipo três (T3SS) (TAKEMURA et al., 2021).

No presente estudo objetivou-se investigar o efeito de proteínas efetoras com propriedades anti-inflamatórias na persistência de *S. Pullorum* em aves. Para isso, foram realizadas deleções dos genes *sseL*, *avrA*, *gtgA* e *pipA* por meio da técnica do *Lambda Red*. As aves foram desafiadas com as estirpes selvagens e mutantes, posteriormente foram avaliadas quanto a sinais clínicos, alterações macroscópicas em órgãos e presença de *Salmonella* em baço e fígado.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Importância das salmoneloses na avicultura industrial

Em 2022, foram produzidas 14,5 milhões de toneladas de carne de frango, deste volume, 67% abasteceram o mercado interno e 33% foram destinados à exportação, o que manteve o país na posição de maior exportador de carne de frango do mundo. Além disso, no mesmo ano, foram produzidos 52 bilhões de ovos, e o consumo do alimento atingiu a marca de 241 unidades *per capita* (ABPA, 2023). Para atender essas demandas, a avicultura industrial vem sendo intensificada (MOTTET; TEMPIO, 2017).

Em sistemas avícolas com alta densidade e medidas de biosseguridade rigorosas, a propagação de patógenos é uma preocupação constante (SANNI et al., 2022). As bactérias do gênero *Salmonella* spp. são especialmente relevantes nesses sistemas e podem causar doenças graves nas aves. Além das implicações para a avicultura, alguns sorotipos de *Salmonella* também são patogênicos para humanos, causando doenças gastrointestinais e sistêmicas (WHO, 2018). Ocorrências confirmadas de infecção podem levar ao fechamento de granjas e à imposição de embargos às exportações, resultando em impactos econômicos diretos (BRASIL, 2003).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e é composto pelas espécies *enterica* e *bongori*. A espécie *enterica* é predominante. Dos 2.659 sorotipos catalogados, 2.637 pertencem à espécie *enterica* e apenas 22 à espécie *bongori* (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). A espécie *enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Nas aves, as enfermidades provocadas por *Salmonella* se dividem em três tipos, a pulorose causada por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar

Gallinarum biovar Pullorum (*S. Pullorum*), o tifo aviário cujo agente é *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) e o paratifo aviário causado por qualquer outro sorotipo (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020). Os avanços na indústria avícola e a execução de programas de erradicação têm mantido a pulrose sob controle, tornando-a uma preocupação secundária nos países desenvolvidos (WOAH, 2018). Contudo, essa doença ainda prevalece em várias nações em desenvolvimento, causando significativas perdas econômicas (BARBOUR et al., 2015; ZHOU et al., 2022).

## 2.2. Sorotipos adaptados ao hospedeiro e o desencadeamento de infecção persistente

Alguns sorotipos de *Salmonella* spp. são capazes de desencadear infecção persistente. Nestes casos os hospedeiros tornam-se persistentemente infectados e assintomáticos, podendo eliminar a bactéria no ambiente de modo intermitente ou transmiti-la para os susceptíveis, principalmente em situações de estresse (WIGLEY et al., 2001). A condição de infecção persistente foi descrita para *S. Typhi* em humanos, *S. Dublin* em ruminantes, *S. Abortusovis* em ovinos, *S. Typhimurium* em murinos e *S. Pullorum* em aves (FOSTER et al., 2021; GUNN et al., 2014).

Algumas infecções por *Salmonella* em humanos são graves, estima-se que 11 a 20 milhões de pessoas adoecem anualmente de febre tifoide e entre 128.000 a 161.000 pessoas morrem em decorrência da doença. Os sintomas incluem febre prolongada, fadiga, dor de cabeça, náusea, dor abdominal e constipação ou diarreia. Alguns pacientes podem apresentar erupção cutânea. Determinados casos podem levar a complicações graves ou até a morte (WHO, 2018). Cerca de 5% dos pacientes com febre tifoide evoluem para o quadro de portadores crônicos, uma condição ainda pouco compreendida. Esses portadores são frequentemente assintomáticos e a persistência da bactéria está relacionada à sua habilidade de estabelecer-se em macrófagos do sistema hepatobiliar e na vesícula biliar, especialmente em cálculos biliares (GUNN et al., 2014).

*S. Dublin* e *S. Abortusovis* causam infecções agudas em bovinos e ovinos jovens, respectivamente, levando a enterite severa e diarreia. Em bezerros, essas infecções podem progredir para pneumonia, infecções articulares e septicemia potencialmente fatal (NIELSEN, 2013). Em bovinos adultos, o aborto pode ser um dos únicos sinais de infecção por *S. Dublin*, elevando o risco de contaminação ambiental e aumentando a exposição de bezerros recém-nascidos ao patógeno. Além disso, a excreção persistente de *S. Dublin* nas fezes pode ocorrer tanto em vacas quanto em bezerros convalescentes (FUJIHARA et al., 2023; NIELSEN, 2013).



*S. Abortusovis* em ovelhas também leva a aborto e disseminação ambiental, cordeiros que sobrevivem podem manter a circulação do patógeno infectando outros cordeiros e ovelhas (SANCHIS et al., 1991).

*S. Typhimurium* causa doença semelhante à febre tifoide em murinos, mas também é capaz de infectar uma variedade de hospedeiros, causando infecções paratíficas. Assim como a excreção de *S. Dublin*, a eliminação intermitente de *S. Typhimurium* nas fezes é um fator que permite manutenção e disseminação do patógeno no ambiente, perpetuando o ciclo de infecção e reinfecção (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004). *S. Pullorum*, por sua vez, é capaz de provocar infecção persistente em aves, permanecendo em macrófagos esplênicos e no trato reprodutivo por longos períodos, ultrapassando 40 semanas em linhagens de *Gallus gallus domesticus*. A habilidade de causar persistência está relacionada com a capacidade de sobreviver no interior dos macrófagos e a adaptabilidade do patógeno em hospedeiros avícolas (WIGLEY et al., 2001). Os mecanismos de persistência não estão completamente elucidados. Portanto, pesquisas com intuito de compreender a infecção persistente em um modelo animal específico, por exemplo *S. Pullorum* em aves, podem fornecer informações valiosas para a compreensão e controle desse tipo de infecção em outros hospedeiros.

### **2.3. Características fenotípicas e genotípicas de *Salmonella Pullorum***

O gênero *Salmonella* inclui microrganismos bacilares, Gram-negativos, com capacidade de fermentar glicose e outros açúcares, bem como descarboxilar aminoácidos. *S. Pullorum* é caracterizada por ser imóvel, formar colônias pequenas de 1 a 4 mm, apresentar crescimento lento e produzir H<sub>2</sub>S em quantidade reduzida. A diferenciação entre *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* pode ser feita por meio de testes bioquímicos específicos, incluindo a fermentação de dulcitol e a descarboxilação da ornitina, embora haja variações entre os isolados (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020). Podem ser utilizados ainda, métodos moleculares para diferenciação entre os biovars *Pullorum* e *Gallinarum* (BATISTA et al., 2016).

As bactérias do gênero *Salmonella* possuem conjuntos específicos de genes de virulência e componentes de sua estrutura, que auxiliam no processo de invasão do hospedeiro e na evasão dos mecanismos de defesa. Muitos desses genes foram adquiridos ao longo do tempo por meio de trocas com outras bactérias, durante as infecções por vírus bacteriófagos ou por incorporação de material genético disperso no ambiente (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020; PARTRIDGE et al., 2018). Langridge et al. (2015) sugerem que *S. Gallinarum*

e *S. Pullorum* evoluíram separadamente a partir de um ancestral comum. Essa evolução genômica foi caracterizada pela perda de genes funcionais e acúmulo de pseudogenes. A maior parte dos genes afetados estão relacionados ao metabolismo. Este processo contribuiu para a especialização dessas bactérias aos hospedeiros da ordem Galliformes, como por exemplo, as galinhas.

Uma análise genômica comparativa entre *S. Enteritidis* e outros sorotipos como *S. Dublin*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* mostrou heterogeneidade no número de pseudogenes entre eles. Os dados indicam que *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* possuem cerca de 212 a 263 pseudogenes a mais que *S. Enteritidis*. Especificamente, o biovar *Pullorum* se destaca por ter o maior número desses pseudogenes (FENG et al., 2013; FOSTER et al., 2021). Esta característica é relevante ao considerar a virulência atenuada de *S. Pullorum* em comparação com *S. Gallinarum*, e consequentemente, sua melhor adaptação ao hospedeiro. Além de possuir um contingente maior de pseudogenes, *S. Pullorum* apresenta um pseudogene importante, o *mutL*. A proteína MutL tem função de reparo de incompatibilidade de DNA, e sua ausência ou defeitos levam ao aumento na taxa de mutação da bactéria o que justifica, portanto, o aumento de pseudogenes no genoma de *S. Pullorum* (FENG et al., 2013).

#### **2.4. Imunopatogenia da pulorose**

A pulorose é uma enfermidade sistêmica aguda não zoonótica, predominante em aves jovens e que gera elevadas taxas de mortalidade nas primeiras semanas de vida (WOAH, 2018). A doença é transmitida por via vertical ou transovariana, promovendo decréscimo da eclodibilidade e aumento da mortalidade nos incubatórios, ou por via horizontal por meio do contato de pintainhos saudáveis com aves mortas ou restos de cascas de ovos contaminadas pelo patógeno. Por isso, a mortalidade se concentra nos primeiros 14 dias de vida. Galinhas adultas imunocompetentes geralmente não manifestam a forma clínica da doença, embora alterações patológicas possam ser encontradas na necropsia (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020).

*S. Pullorum* infecta aves por via oral e alcança a via sistêmica através da invasão de células epiteliais intestinais ou tecido linfóide localizado principalmente nas placas de Peyer e tonsilas cecais. Os fagócitos infectados e as bactérias livres movem-se para os tecidos linfóides de diferentes órgãos (p.ex. fígado, baço e medula óssea), onde ocorre a multiplicação bacteriana (BARROW; FREITAS NETO, 2011). Uma parcela dos animais que se infectam nas primeiras

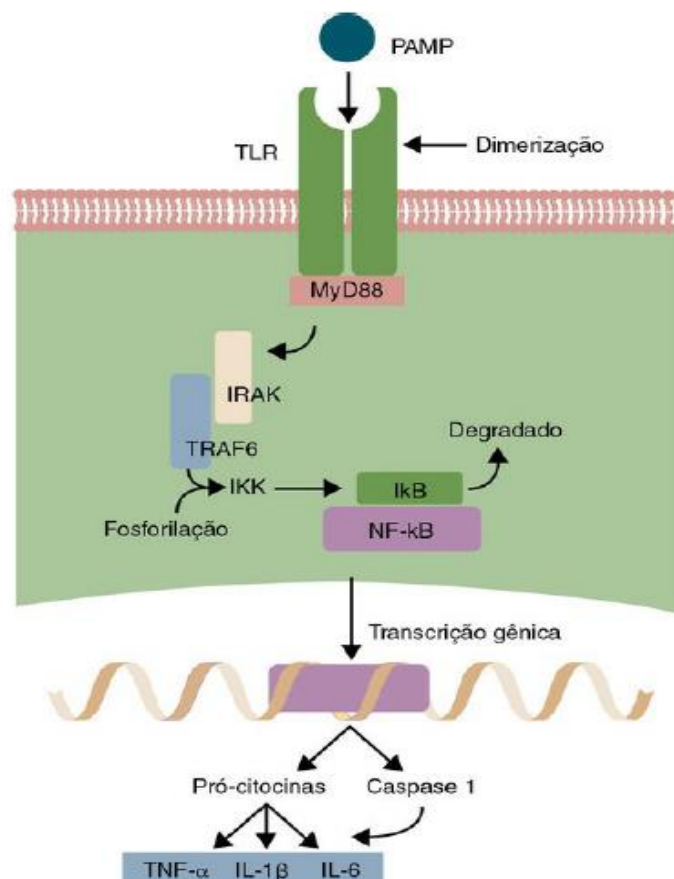
semanas de vida, e sobrevivem à doença clínica, se torna portadora assintomática de *S. Pullorum*, que persiste nos macrófagos esplênicos (WIGLEY et al., 2001). No início do período de postura, geralmente entre 16 e 18 semanas de vida, a galinha sofre alterações hormonais que levam à imunossupressão temporária e propagação de *S. Pullorum* para os tecidos do trato reprodutivo, favorecendo a transmissão vertical (WIGLEY et al., 2005).

A não depuração (*clearance*) de *S. Pullorum* pelo sistema imune ocorre, aparentemente, pois os macrófagos infectados se tornam invisíveis às células T. Essa ausência de sinalização pode estar relacionada com a regulação negativa da expressão do MHC, ou uma modulação da resposta imune durante a infecção. Na infecção por *S. Pullorum* há níveis muito baixos de expressão *in vivo* dos genes responsáveis por interferon gama (IFN)- $\gamma$  e interleucina 18 (IL-18), que são citocinas associadas à resposta T auxiliar 1 (Ta1). No entanto, os níveis de RNAm de IL-4 nestas infecções são mais altos e estão frequentemente associados a uma resposta do tipo T auxiliar 2 (Ta2), o que sugere um grau de modulação por *S. Pullorum* para esse tipo de resposta, compatível com altos níveis de anticorpos e baixa intensidade de imunidade mediada por células (CHAPPELL et al., 2009). Por outro lado, em aves infectadas por *S. Gallinarum* (agente etiológico do tifo aviário), observa-se uma resposta imune predominantemente do tipo T citotóxica (T CD8<sup>+</sup>), com níveis elevados de IL-18, necrose tecidual e elevadas taxas de mortalidade. Não ocorre infecção persistente em aves com tifo aviário (LOPES et al., 2016).

## 2.5. Proteínas anti-inflamatórias

*Salmonella* spp. pode induzir uma resposta anti-inflamatória utilizando proteínas efetoras secretadas pelo sistema de secreção do tipo três (T3SS). Tal sistema possui estrutura em formato de agulha e é utilizado por *Salmonella* spp. para secretar e injetar proteínas na célula hospedeira. Dentre as proteínas com propriedades anti-inflamatórias, destacam-se SseL, avrA, GtgA e PipA. Tais proteínas teriam a função de direcionar e suprimir especificamente a via de sinalização NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor*  $\kappa$ B) durante a infecção. Uma vez inibida, essa via reduziria o processo inflamatório, a regulação da apoptose e a promoção da proliferação celular (NEGRATE et al., 2008; TAKEMURA et al., 2021; YIN et al., 2020). Por isso, de alguma forma, poderiam também estar relacionadas à inibição da atividade bactericida de macrófagos e, conseqüentemente, na modulação da resposta imune em aves que se tornam persistentemente infectadas por *S. Pullorum*.

O fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é um fator transcricional que controla processos celulares como proliferação, diferenciação e morte, bem como respostas imunes. Na via de sinalização clássica do NF- $\kappa$ B, os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), como os *toll like receptors* (TLRs) ou receptores da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) levam ao início desta via de sinalização por meio da ligação a diversas moléculas adaptadoras, das quais a MyD88 é a mais importante. Quando a MyD88 forma um complexo com o TLR, também se liga à duas quinases chamadas IRAK-1 e IRAK-4. A IRAK-4 ativa a IRAK-1 que, por sua vez, recruta o TRAF6. O TRAF6 e outras proteínas então ativam o complexo IKK (quinase  $\kappa$ B), resultando na indução da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  (Inibidor do fator de transcrição nuclear kappa B Alfa) através da sua fosforilação ou ubiquitinação. O heterodímero de NF- $\kappa$ B formado por RelA (p65) e p50 (NF- $\kappa$ B1) fica livre da molécula de I $\kappa$ B $\alpha$  e é transportado para o núcleo onde se liga à região promotora dos genes alvo e dá início ao processo de tradução de mRNA de citocinas pró-inflamatórias (figura 1) (TIZARD, 2014).



**Figura 1.** Mecanismo de ativação da via NF- $\kappa$ B (TIZARD, 2014).

A via de sinalização do NF- $\kappa$ B desempenha um papel central na defesa do hospedeiro contra a infecção através da produção de citocinas pró-inflamatórias. As bactérias do gênero

*Salmonella* desenvolveram proteínas efetoras que bloqueiam diretamente este mecanismo e atuam em diferentes regiões da cascata de ativação do NF- $\kappa$ B (RAHMAN; MCFADDEN, 2011). Esses efetores são secretados e atuam como mediadores imunológicos que inibem resposta inflamatória sistêmica e apoptose celular favorecendo assim a infecção e persistência do patógeno.

A SseL é uma proteína efetora de *Salmonella* com ação enzimática, sua função na via NF- $\kappa$ B é realizar a deubiquinização de I $\kappa$ B $\alpha$ , o que inibe a degradação da molécula pelos proteassomas (MESQUITA; HOLDEN; ROLHION, 2013; NEGRATE et al., 2008). Em um estudo utilizando uma estirpe mutante com deleção do gene *sseL* em *S. Pullorum*, demonstrou-se que a ausência do gene afeta de forma significativa a capacidade de replicação intracelular e reduz a patogenicidade da bactéria (GENG et al., 2019). No entanto, no referido estudo, não foi avaliada se a deleção no gene *sseL* afetaria a capacidade de induzir infecção persistente por *S. Pullorum* em aves.

As proteínas GtgA e PipA, em *S. Typhimurium*, atuam como metaloproteases de zinco e bloqueiam a via inflamatória por meio da clivagem direta de p65 (SUN et al., 2016). O *pipA*, especificamente, demonstrou contribuir para o desenvolvimento de infecção sistêmica (TAKEMURA et al., 2021). Em um estudo realizado com camundongos infectados com *S. Typhimurium*, observou-se que mutantes com deleção dos genes *gtgA* e *pipA* desencadearam inflamação intestinal mais intensa que a provocada pela estirpe selvagem. O mesmo foi observado na deleção de *avrA*, neste caso a infecção se tornou mais grave, com maior intensidade de inflamação, lesões teciduais e apoptose de células intestinais de camundongos (TAKEMURA et al., 2021; WU; JONES; NEISH, 2012).

Collier-Hyams et al. (2002) demonstraram que a proteína AvrA atua de forma similar à proteína SseL, inibindo a via NF- $\kappa$ B através da deubiquitinação. No entanto, outros estudos demonstraram que a AvrA é uma proteína multifuncional e realiza tanto funções de DUB (Enzima Desubiquitinadora) quanto a de acetiltransferase na via apoptótica c-Jun N-terminal kinases (JNK). Consequentemente, nas estirpes de *S. Pullorum* o *avrA* propiciaria um ambiente favorável para multiplicação em macrófagos, reduzindo significativamente a expressão de IL-8 e IL-6 nestas células (JONES et al., 2008; YE et al., 2007; YIN et al., 2020). A expressão reduzida de citocinas inflamatórias sugere que a infecção por *S. Pullorum* modularia a resposta imune para um padrão Ta2 (CHAPPELL et al., 2009). No entanto, mais estudos são necessários para elucidar se o *avrA* contribuiria ou não para o desencadeamento de infecção persistente na pulorose.

## 2.6. Regulação dos genes codificadores das proteínas AvrA, SseL, GtgA e pipA

Em *Salmonella* spp., a virulência está relacionada à presença de genes específicos contidos no cromossomo bacteriano, especialmente nas ilhas de patogenicidade, e também em plasmídios de virulência. Os mais numerosos e bem estudados conjuntos gênicos são as ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPI) 1 e 2. Essas regiões cromossômicas codificam os sistemas de secreção do tipo três (T3SS) e proteínas efetoras, sendo importantes para a invasão de células não fagocíticas e para a sobrevivência e proliferação intracelular, respectivamente (STERZENBACH et al., 2013). Cada conjunto gênico é útil em um dado momento da infecção e por isso a ativação das proteínas efetoras não é feita de forma simultânea. Para a regulação da expressão dos genes responsáveis por algumas das proteínas das SPIs, *Salmonella* spp. utilizam sistemas regulatórios complexos que conferem adaptabilidade às mudanças ambientais. Esses sistemas são essenciais para a sua sobrevivência, pois permitem suportar condições adversas como as do interior de vacúolos de fagocitose, por exemplo (FÀBREGA; VILA, 2013).

Durante a síntese de estruturas complexas como T3SS, *Salmonella* spp. exerce a regulação de conjuntos de genes os quais podem ser ativados ou repressos de forma sequencial e coordenada. A síntese da proteína AvrA, cujo gene está localizado na SPI-1, por exemplo, ocorre de maneira pós-transcricional pelo sistema CsrA/CsrB. Neste caso, a proteína CsrA estimula sua transcrição, enquanto a CsrB inibe (IMRE et al., 2013; KERRINNES et al., 2009). Eichelberg e Galán (1999) demonstraram que a proteína HilA é um dos reguladores da SPI-1. No entanto, a mesma não apresentaria ação sobre o gene *avrA*. Por outro lado, a regulação do gene *sseL*, localizado na SPI-2, é conduzida pelos fatores de transcrição SsrA/SsrB. Estes fatores estão interligados a um sistema de dois componentes denominado PhoQP e são essenciais para a ativação do T3SS-2 e proteínas efetoras relacionadas (COOMBES et al., 2007; GAL-MOR et al., 2011; RYTKÖNEN et al., 2007).

A proteína GtgA, assim como SseL, é translocada pelo T3SS-2. Contudo, diferentemente de *sseL*, *gtgA* não é um gene da SPI-2, pertencendo a um agrupamento genético denominado Gifsy-2 (SUN et al., 2016). As regiões Gifsy são provenientes de bacteriófagos. Em *S. Typhimurium*, estes fagos são funcionais e capazes de iniciar ciclos lisogênicos ou líticos, dependendo das mudanças no microambiente em que a bactéria se encontra. Figueroa-Bossi e Bossi (1999) relataram que a presença de peróxido de hidrogênio *in vitro* pode induzir a transcrição desta região, uma condição que se assemelha ao ambiente dos vacúolos de fagocitose dos macrófagos. No entanto, é provável que outros mecanismos de regulação possam estar

envolvidos. Embora não especifiquem o gene *gtgA*, Golubeva e Slauch (2006) demonstraram que o gene *sodCI* da região Gifsy-2, que codifica uma superóxido dismutase, é regulado pelo mesmo sistema PhoQP citado acima. Sendo este mecanismo de regulação ativado por variações extra citoplasmáticas de pH, redução das concentrações de cátions bivalentes, como  $Mg^{2+}$ , e presença de peptídeos antimicrobianos (PROST et al., 2007). A proteína efetora PipA, codificada por um gene da SPI-5 e secretada pelo T3SS da SPI-2, segue um padrão regulatório análogo ao da SPI-2, mediado pelo sistema EnvZ/OmpR (ONG et al., 2010). Estudos indicam que o gene *pipA* apresenta ainda regulação pela proteína LeuO que, ao se ligar à região próxima ao códon início do gene, exerce função repressora na sua transcrição (DILLON et al., 2012).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da deleção de genes que codificam proteínas anti-inflamatórias na infecção persistente em aves com pulorose.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Construir quatro estirpes mutantes (*SP $\Delta$ avrA*, *SP $\Delta$ gtgA*, *SP $\Delta$ pipA* e *SP $\Delta$ sseL*) de *Salmonella Gallinarum* biovar Pullorum (SP) por meio de métodos moleculares;
- Comparar a patogenia e a persistência das estirpes selvagens *S. Pullorum* (ATCC 9120) *S. Gallinarum* (287/91) com as mutantes *SP $\Delta$ sseL*, *SP $\Delta$ avrA*, *SP $\Delta$ gtgA*, *SP $\Delta$ pipA* por meio da avaliação de sinais clínicos e da detecção bacteriana em órgãos de aves experimentalmente desafiadas;
- Avaliar as alterações anatomopatológicas nos diferentes grupos experimentais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Considerações iniciais

O experimento foi realizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte, Minas Gerais. A construção das estirpes mutantes foi aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) em 9 de março de 2023 (parecer técnico 8355/2023) e realizada no Laboratório de Patologia Molecular da UFMG - biossegurança nível 2. As estirpes utilizadas foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), acesso A39CF31. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em 6 de março de 2023, protocolo 297/2022.

### 4.2. Estirpes utilizadas

Para este estudo foi utilizada a estirpe selvagem *Salmonella Pullorum* ATCC 9120 (SP), com genoma disponível na plataforma *online* NCBI (*GenBank* ID: CP012347.1). Foram elaboradas quatro estirpes mutantes de *S. Pullorum* partindo da cepa selvagem. As mutantes foram denominadas: SP $\Delta$ *avrA*, SP $\Delta$ *gtgA*, SP $\Delta$ *pipA* e SP $\Delta$ *sseL*. Para controle positivo de infecção foi utilizada uma estirpe de *Salmonella Gallinarum* SG287/91 (SG), com número de acesso no *GenBank* ID: AM933173.1, a fim de se comparar os dados da infecção *in vivo* nos diferentes biovares. Um grupo foi mantido como controle sem inoculação de estirpes bacterianas. Todas as estirpes foram armazenadas em criotubo e mantidas a -80°C até o momento da inoculação.

### 4.3. Construção das estirpes mutantes

Os procedimentos bacteriológicos de construção e manuseio dos mutantes foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular - Biossegurança nível 2. A construção foi realizada pela técnica de *Lambda-Red*, cujo processo de mutagênese sítio-dirigida possibilita deletar uma região específica do genoma (gene-alvo) sem afetar as regiões adjacentes (DATSENKO; WANNER, 2000). Neste trabalho, a mutagênese foi dividida basicamente em duas etapas: i) tornar a bactéria apta para o procedimento e ii) substituição do gene-alvo pelo



cassete de resistência. Os insumos empregados no procedimento podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Amostras, plasmídios e iniciadores utilizados na deleção de gene.

Materiais	Características	
Plasmídios	pKD3	Contém gene <i>Cf</i>
	pKD46	Utilizado para expressar $\lambda$ - <i>Red recombinase</i> , contém gene <i>Amp<sup>r</sup></i>
Estirpes	SP	Estirpe selvagem <i>Salmonella Pullorum</i>
	SG	Estirpe selvagem de <i>Salmonella Gallinarum</i>
	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Bactérias onde os plasmídios estão armazenados
*Iniciadores para mutagênese	<i>avrA_D</i>	tcattgaggcatatTTTTgcaggcaatatattgaatctgaaaagtaaaggtgtaggctggagctgcttc
	<i>avrA_R</i>	gtcttatggcgctggaaggatttctctggcaggcaacctataatttccatatgaatcctccttag
	<i>gtgA_D</i>	ctatttataagaatgtaattccatgtaataaaaaggatgtgtaactcatcgtgtaggctggagctgcttc
	<i>gtgA_R</i>	actggttactgtgttagcatcgtggattttgcatttttgatgagtgcatatgaatcctccttag
	<i>pipA_D</i>	ttattgttaatttaataattcataattgtagtcaggaataagaagtgtaggctggagctgcttc
	<i>pipA_R</i>	Gaaaaaacggactacgtgggttttagtttctttcgtttcctgatgtgcatatgaatcctccttag
	<i>sseL_D</i>	Tatacatgacatcatattcgttactttcacctaccaggaacagagcaaaagttaggctggagctgcttc
	<i>sseL_R</i>	Tatacttataaattcttggcagagcatcattcaggataagtactcgccacatatgaatcctccttag

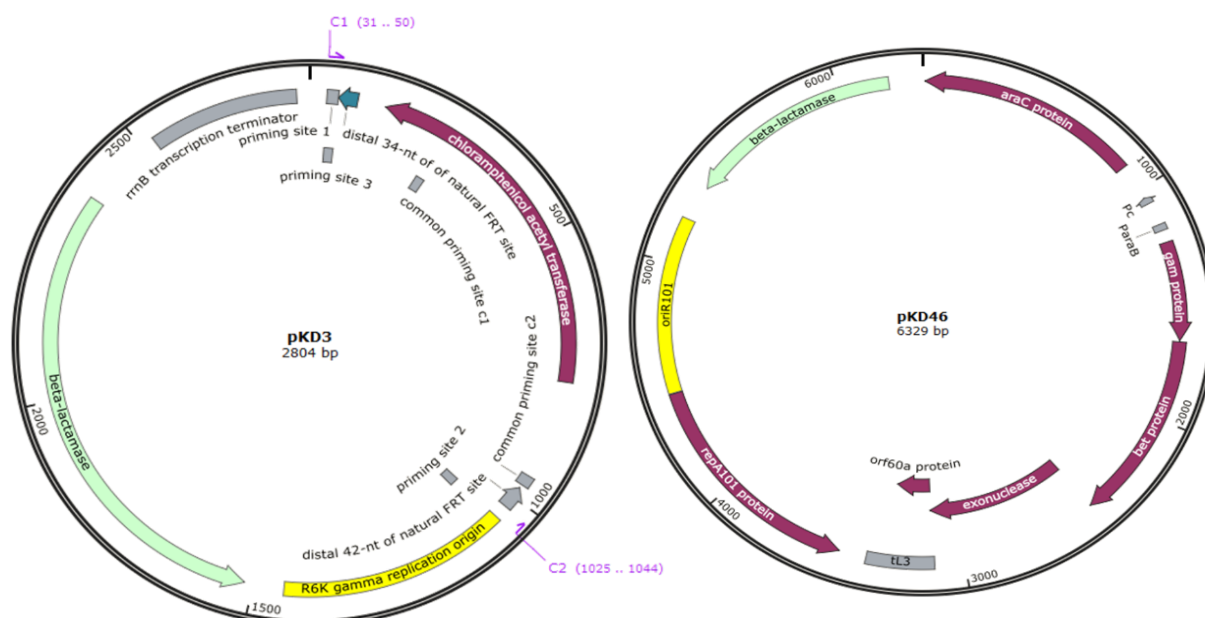
\* Os primeiros 50 nucleotídeos são complementares aos primeiros 50 pb que antecedem ou sucedem os genes de interesse. Já os últimos 20 nucleotídeos (em vermelho) referem-se aos 20 pb responsáveis pela amplificação do cassete de resistência contido no plasmídio utilizado na técnica *Lambda-Red*.

#### 4.3.1. Purificação dos plasmídios utilizados na mutagênese

Estirpes DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* contendo os plasmídios pKD46 e pKD3 (Figura 2) estavam estocadas em *freezer* a -80 graus Celsius (°C) em meio crioprotetor composto de caldo infusão cérebro coração (BHI) (Neogen, EUA – código: 7115A) suplementado em 20% com glicerol (Sigma-Aldrich, EUA – código V000123). O pKD46 foi utilizado para fornecer os genes

constituintes do sistema de recombinação  $\lambda$  Red à bactéria receptora e o pKD3 foi utilizado como molde para amplificação do fragmento de recombinação (Figura 2).

Com auxílio de alça bacteriológica estéril, a superfície congelada da cultura bacteriana foi gentilmente raspada e estriada sobre ágar de lisogenia (LA) preparado com caldo de lisogenia (Kasvi, Espanha – código: K25-1551) ao qual foi adicionado 2% de ágar-ágar (Ludwig, Brasil – código 9002-19-0), contendo antibiótico apropriado, a fim de obter colônias isoladas (Tabela 2). As placas foram levadas à incubadora (Vulcan, Brasil – modelo ECB 46 l) onde ficaram por 24 horas (h) a 28 °C. Após a incubação, uma colônia isolada foi suavemente tocada com alça bacteriológica estéril e inoculada em 10 mililitros (mL) de caldo lisogenia (LB), contendo antibiótico apropriado. O meio líquido foi incubado a 28 °C por 18 h a 150 rotações por minuto (rpm) em estufa microbiológica automática (Cienlab, Brasil – modelo CE-215/12 adaptada).



**Figura 2.** Esquema representativo dos plasmídios pKD3 e pKD46.

**Tabela 2.** Antibióticos utilizados para clonagem dos plasmídios de mutagênese.

Plasmídio	Antibiótico	Concentração*
pKD46	Ampicilina	100 $\mu\text{g}$ / mL
pKD3	Cloranfenicol	25 $\mu\text{g}$ / mL

\* Concentração utilizada para os meios de cultivo líquidos e sólidos nessa etapa.

No dia seguinte, 4,5 mL da cultura foram concentrados por centrifugação a 13.000 x g por 5 minutos (min) (Herolab, Alemanha – modelo: MicroCen®) e o sedimento bacteriano resultante (*pellet*) submetido à purificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) plasmidial por meio do Biospin Plasmid DNA Mini Extraction Kit (Bioflux, China – código: BSC01S1) de acordo com as instruções do fabricante. A única modificação introduzida ao método descrito pelo fabricante foi na etapa de eluição. O DNA plasmidial foi eluído em 50 µL de água Milli-Q (Millipore, França, modelo: direct-Q3) em vez de tampão de eluição. O material genético recuperado foi avaliado quanto a qualidade (relações 260/280 e 260/230) e a quantidade (ng / µL) por espectrofotometria no NanoDrop One (Thermo Scientific, EUA – modelo: ND-ONE-W).

#### 4.3.2. Eletroporação do pKD46 em *S. Pullorum* ATCC 9120

Uma colônia de *S. Pullorum* ATCC 9120 em LA foi inoculada em 10 mL de LB e incubada a 37 °C por 18 horas com agitação constante a 150 rpm. Posteriormente, esta cultura foi centrifugada a 2346 x g por 10 minutos (Jouan, CR 4.22). O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi ressuspensão em 20 mL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA). Esse processo de lavagem das células bacterianas foi repetido três vezes, com a última ressuspensão do sedimento bacteriano em 100 µL de água ultrapura.

O plasmídio pKD46 foi introduzido em *S. Pullorum* ATCC 9120 por meio de eletroporação. A eletroporação foi realizada utilizando o equipamento MicroPulser Electroporator (Bio-Rad, EUA), misturando 80 µL da cultura lavada com 20 µL de DNA plasmidial (pKD46) e transferindo a mistura para cubeta de 2 mm (Bio-Rad, EUA). Os parâmetros de eletroporação foram 2,5 kilovolts (kV) de voltagem por 4,6 milissegundos. Após o pulso elétrico, a mistura foi transferida para 1 mL de *Super Optimal Broth* (SOB) adicionado de glicose (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), incubada a 28 °C por 90 minutos a 150 rotações por minuto rpm.

Após incubação, o caldo contendo as colônias foi centrifugado a 5.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 100 µL de Tampão fosfato-salino (PBS). Este volume foi dividido em duas partes, 10 µL e 90 µL, e aplicado com auxílio de alça de Drigalski, em duas placas LA contendo 100 µg/mL de ampicilina (EMS, BR – Ampicilina comprimidos 500 mg). As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas antes da seleção dos clones positivos.

No dia subsequente, cinco colônias foram selecionadas e submetidas a um processo de replaqueamento, no qual a superfície de cada colônia foi delicadamente tocada utilizando uma alça bacteriológica estéril. Em seguida, essas colônias foram transferidas para uma nova placa LA adicionada de ampicilina a uma concentração de 100 µg/mL. As placas resultantes foram incubadas a uma temperatura de 28 °C por 24 horas.

#### 4.3.2.1. Teste de rugosidade

Os clones estriados em LA foram submetidos a um teste de rugosidade para a seleção exclusiva de bactérias lisas, a fim de assegurar que não houve mutações na estrutura de lipopolissacarídeos das bactérias. Para tal, 30 µL de acriflavina 1:500 (Sigma-Aldrich, EUA – A8126) foram aplicados na superfície de uma lâmina para microscopia. Utilizando uma alça bacteriológica estéril, um conjunto de colônias foi transferido e diluído na solução. Simultaneamente, os clones foram também avaliados em 30 µL de solução salina (2%) da mesma maneira como foi conduzido com a acriflavina.

Os clones que não apresentaram aglutinação em ambas as soluções foram classificados como lisos e, conseqüentemente, foram estriados por esgotamento em LA sem antibiótico, seguido por incubação a 28 °C ao longo de 24 horas. As placas resultantes foram empregadas para a transferência das colônias para criotubos contendo meio crioprotetor composto de caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Neogen, EUA – código: 7115A), suplementado em 20% com glicerol (Sigma-Aldrich, EUA – código V000123). Estes criotubos foram armazenados em freezer a -80 °C até o momento de utilização.

#### 4.3.3. Amplificação dos fragmentos de mutagênese

Os iniciadores de mutagênese (descritos no item 4.3.) foram utilizados para confecção dos fragmentos de recombinação, o produto amplificado consistiu em um gene de resistência ao cloranfenicol flanqueado por 50 nucleotídeos adjacentes a porção inicial e final de cada um dos genes alvo.

Para a amplificação dos fragmentos lineares que substituíram os genes *avrA*, *gtgA*, *pipA* e *sseL* do cromossomo de *S. Pullorum* ATCC 9120, foram realizadas quatro Reações em Cadeia de Polimerase (PCR). Cada reação com seu respectivo par de iniciador e com volume total de

250  $\mu\text{L}$  dividido igualmente em 5 microtubos. Os reagentes da PCR estão detalhados na Tabela 3 e o protocolo utilizado no termociclador está descrito na Tabela 4.

**Tabela 3.** Reagentes utilizados para amplificação dos fragmentos de mutagênese.

Reagente	Quantidade	Fabricante
Água Milli Q (q.s.p.)	40,5 $\mu\text{L}$	Millipore
Tampão 10X	5 $\mu\text{L}$	Ludwig Biotec
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,5 $\mu\text{L}$	Ludwig Biotec
dNTP 10mM	1 $\mu\text{L}$	Sinapse inc
Taq DNA Polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ )	0,5 $\mu\text{L}$	Ludwig Biotec
Iniciador_F (20 pmol)	0,5 $\mu\text{L}$	Sigma-Aldrich
Iniciador_R (20 pmol)	0,5 $\mu\text{L}$	Sigma-Aldrich
DNA plasmidial pKD3	0,5 $\mu\text{L}$	-
<b>Volume total da reação</b>	<b>50 <math>\mu\text{L}</math></b>	-

**Tabela 4.** Condições de ciclagem utilizadas no termociclador para amplificar os fragmentos de mutagênese.

	Aquecimento	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Elongação final	Resfriamento
<b>Temperatura</b>	94°C	94°C	65°C	72°C	72°C	4°C
<b>Período</b>	2 minutos	45 segundos	30 segundos	60 segundos	10 minutos	
<b>Ciclos</b>	1	35			1	$\infty$

Após a amplificação do produto, os 50  $\mu\text{L}$  de cada reação foram acondicionados em um único microtubo. A confirmação da amplificação da região-alvo foi realizada em gel de agarose a 1,5 %, com 100 volts por 40 minutos. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o Ladder 100 pb (Ludwig, Brasil). O tamanho molecular esperado do amplicon predito *in silico* foi próximo a 1115 Kb.

No mesmo dia foi realizada a precipitação do produto amplificado com etanol seguindo a metodologia descrita por Green e Sambrook (2016). O volume do produto amplificado foi adicionado de acetato de sódio na proporção de 1:10. Em seguida, foi calculado 2,5 vezes o volume, este volume correspondeu a adição de etanol 95%. A mistura resultante foi incubada por

15 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 13.000 x g por 30 minutos (Herolab, Alemanha – modelo: MicroCen®). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi cuidadosamente descartado, e o *pellet* de DNA resultante foi submetido a uma lavagem com etanol 70%. Após essa etapa, o material foi centrifugado por 15 minutos nas mesmas condições e o sobrenadante foi novamente descartado. Para remover o excesso de etanol, uma centrifugação adicional foi realizada. O tubo contendo o *pellet* de DNA foi, então, colocado em uma estufa para secagem, mantendo-se a 20 minutos a 37°C. O DNA precipitado foi armazenado a -20°C até o momento da eletroporação.

#### 4.3.4. Eletroporação dos fragmentos de mutagênese

A cultura de *S. Pullorum* ATCC 9120 contendo o plasmídeo pKD46 foi retirada do ultrafreezer a -80 °C e inoculada em 10 mL de LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina que, por sua vez, foi incubado a 28 °C por 16 horas sob agitação constante de 150 rpm. No dia seguinte, foram preparados quatro tubos tipo Falcon com 500 µL da cultura do dia anterior, 20 mL de LB estéril contendo 100 µg/mL de ampicilina e 5 mL de L-arabinose 1 M. Em seguida, as amostras foram incubadas nas mesmas condições anteriores por 5 horas. Vinte minutos antes do término do período de incubação, foram adicionados às amostras mais 5 mL de L-arabinose 1 M. Posteriormente, as mesmas foram centrifugadas a 2346 x g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Jouan, CR 4.22). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 30 mL de água ultrapura (Millipore, França, modelo: direct-Q3) gelada. O procedimento foi repetido por três vezes e, após a última centrifugação, o sedimento de cada tubo foi ressuscitado em 100 µL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA – código W4502-1L). As amostras foram armazenadas em gelo até o momento da eletroporação, uma alíquota foi retirada e plaqueada em LA contendo cloranfenicol na concentração de 25 µg/mL (Neo-Química, BR – Neo Fenicol comprimidos 500 mg) para controle negativo da eletroporação.

A etapa da eletroporação seguiu o descrito no item 4.3.2 utilizando os produtos amplificados (item 4.3.3). Todavia, após a eletroporação, foram utilizadas desta vez duas placas de LA contendo cloranfenicol na concentração de 25 µg/mL para cada um dos genes. Em uma das placas foram espalhados com auxílio de alça de Drigalski 10 µL e na outra 90 µL da cultura eletroporada. Todas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Cinco colônias provenientes das placas de LA contendo cloranfenicol foram selecionadas e estriadas em novas placas contendo o mesmo antibiótico e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. As colônias foram

submetidas ao teste de rugosidade conforme descrito no item 4.3.2.1 e armazenadas até a etapa de extração de DNA.

#### **4.3.5. Extração de DNA e confirmação da deleção por PCR**

O material genético bacteriano proveniente das colônias lisas foi extraído seguindo a metodologia descrita por Medici et al. (2003) para, assim, realizar a confirmação da deleção por PCR. As colônias obtidas foram tocadas com alça bacteriológica estéril e inoculadas em 10 mL de meio LB. Os tubos foram incubados em estufa de agitação a 150 rpm, mantida a 37°C, ao longo de 18 horas. Após a incubação, um total de 4 mL de LB foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos para recuperação das células bacterianas. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada tubo foi descartado e as células foram ressuspensas e lavadas com 500 µL de água Mili Q e submetidas a um novo ciclo de centrifugação nas mesmas condições. Esse processo foi repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação, os *pellets* formados foram ressuspensos em 100 µL de água Mili Q e submetidos à fervura em termobloco (Techne, modelo: Dri-Block® DB - 2A) a 100°C por 20 minutos. Em sequência, as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo por 20 minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos, e os sobrenadantes, que continham o DNA, foram transferidos para novos microtubos e armazenados a -20°C até o momento da PCR. Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 5 e os reagentes da reação na tabela 6. Utilizou-se um termociclador convencional (ThermoFisher, MiniAmp - Thermal Cycler) com a seguinte programação: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos; seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 segundos, pareamento a 61 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 90 segundos; finalizado por um ciclo de alongação a 72 °C por 5 minutos, e resfriamento a 4 °C por 30 minutos após a última etapa do ciclo de amplificação.

**Tabela 5.** Iniciadores de verificação da deleção.

<b>Iniciadores</b>	<b>Características</b>
<i>avrA</i> _ctl D	GGTTGGTAGCCTGGCTCAAT
<i>avrA</i> _ctl R	CGCCGACCATCGTGGTATTA
<i>gtgA</i> _ctl D	GAAATGGTTGGGTTGCAGGG
<i>gtgA</i> _ctl R	TGTGTTGTAGCATCGTGGGA
<i>pipA</i> _ctl D	AACCCCGCTCCTAAGTTTCAT
<i>pipA</i> _ctl R	CGGACTACGTGGGTTTTTAGT
<i>sseL</i> _ctl D	CGCGTTACCAGCCTCCTTTA
<i>sseL</i> _ctl R	GCCTGGCCTTCCCATCCTTA
C1 *	TTATACGCAAGGCGACAAGG
C2 *	GATCTTCCGTCACAGGTAGG

\*conforme Datsenko e Wanner (2000)

**Tabela 6.** Reagentes utilizados para amplificação dos fragmentos de mutagenese.

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Fabricante</b>
Água Milli Q (q.s.p.)	20 µL	Millipore
Tampão 10X	2,5 µL	Ludwig Biotec
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,75 µL	Ludwig Biotec
dNTP 10mM	0,5 µL	Sinapse inc
Taq DNA Polimerase (5U/µL)	0,25 µL	Ludwig Biotec
Iniciador_F (20 pmol)	0,25 µL	Sigma-Aldrich
Iniciador_R (20 pmol)	0,25 µL	Sigma-Aldrich
DNA plasmidial pKD3	0,5 µL	-
<b>Volume total da reação</b>	<b>25 µL</b>	<b>-</b>

Após a amplificação, os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado com 1,5% de agarose em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X, adicionado de 2 µL de intercalante em 20 mL de gel (Safedye Nucleic Acid Stain, Cellco, Brasil - código PCK-301S). Posteriormente, cinco microlitros de cada amostra foram misturados a dois µL de tampão de carregamento (DNA Loading Buffer, Sinapse Biotecnologia, Brasil - código GH101-



01). Essa mistura foi aplicada nos poços do gel de agarose e submetida à eletroforese a 4 V / cm por 40 minutos.

#### 4.4. Preparo do inóculo

Para preparar os inóculos necessários para os desafios, as estirpes selecionadas foram retiradas do ultra-freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e, no dia seguinte, foram cultivadas em placas contendo ágar LB. Após a incubação, uma única colônia de cada estirpe foi selecionada e transferida para tubos estéreis contendo 10 ml de caldo LB. Estes tubos foram, então, incubados em uma estufa bacteriológica, mantida a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação a 150 rpm, ao longo de 18 horas. Isso resultou na formação do pré-inóculo.

No dia seguinte, 200  $\mu\text{L}$  do pré-inóculo foram pipetados e transferidos para tubos contendo 10  $\mu\text{L}$  de caldo LB. Esses tubos foram incubados sob as mesmas condições do pré-inóculo, gerando o inóculo final. Cada ave, no 7º dia de vida, recebeu, por via oral, 0,2 ml do inóculo diluído contendo as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do microrganismo a ser estudado em seu respectivo grupo. Simultaneamente à inoculação, foi conduzida uma diluição decimal seriada (BERCHIERI A. et al., 2001) a fim de confirmar a quantidade de UFC/mL recebido por cada grupo no desafio (tabela 7). Foi incluído ao estudo um grupo controle sem inoculação de estirpes a fim de se comparar as alterações anatomopatológicas e verificar a não contaminação cruzada entre as estirpes dos grupos.

**Tabela 7.** Unidades formadoras de colônia UFC/mL dos inóculos por estirpe de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*.

Grupo experimental	Estirpe inoculada	Inóculo	Número de aves
A	SP $\Delta$ <i>avrA</i>	$7,6 \times 10^7$	42
B	SP $\Delta$ <i>gtgA</i>	$5,8 \times 10^7$	42
C	SP $\Delta$ <i>pipA</i>	$9,4 \times 10^7$	42
D	SP $\Delta$ <i>sseL</i>	$6,4 \times 10^7$	42
E	SP	$6 \times 10^7$	42
F	SG	$4 \times 10^7$	42
G	Sem inoculação	-	42

SP $\Delta$ *avrA* = *S. Pullorum* com deleção do gene *avrA*, SP $\Delta$ *gtgA* = *S. Pullorum* com deleção do gene *gtgA*, SP $\Delta$ *pipA* = *S. Pullorum* com deleção do gene *pipA*, SP $\Delta$ *sseL* = *S. Pullorum* com deleção do gene *sseL*, SP = *S. Pullorum* ATCC 9120, SG = *S. Gallinarum* 287/91

#### **4.5. Ensaio *in vivo* e avaliação da patogenicia**

O experimento foi conduzido utilizando pintos machos de linhagem vermelha, com 1 dia de idade. A escolha da linhagem foi baseada na suscetibilidade dessas aves à infecção persistente por SP, como descrito por Pinheiro et al. (2001). Na recepção das aves, amostras de mecônio foram coletadas para pesquisa de *Salmonella* spp. conforme metodologia descrita por Zancan et al. (2000). As aves foram alojadas em gaiolas e separadas em grupos de acordo com a estirpe inoculada. A observação das aves foi realizada por dez semanas, registrando-se os sinais clínicos e a mortalidade. As sobreviventes foram submetidas à eutanásia nos intervalos de 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias após a infecção para a avaliação das alterações macroscópicas em fígado, baço, pulmão, coração, intestino, rins e encéfalo.

#### **4.6. Contagem bacteriana**

Aos 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias após a infecção (dpi), cerca de 7 aves de cada grupo foram eutanasiadas para a contagem de células bacterianas viáveis no fígado e baço. Após a coleta, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em solução salina. A contagem de *Salmonella* nas amostras foi conduzida por meio do plaqueamento das alíquotas decimais da diluição em ágar verde brilhante (AVB). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e em seguida, a contagem das colônias foi realizada, com os resultados sendo apresentados em logaritmo decimal (log UFC/g). A presença de colônias na contagem foi considerada como detecção direta de *Salmonella*. A primeira diluição de cada amostra foi adicionada em um volume igual de caldo tetracionato (dupla concentração), incubada a 37°C por 24 horas e semeadas em ágar verde brilhante (AVB) quando o resultado da contagem foi negativo e, portanto, considerada como detecção indireta (BERCHIERI A. et al., 2001).

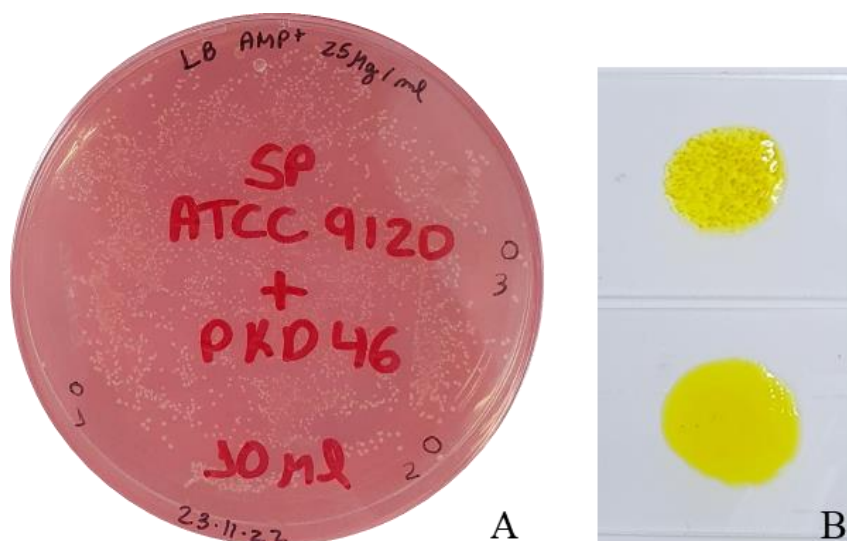
#### **4.7. Análise Estatística**

As contagens referentes aos órgãos (fígado e baço) foram submetidas ao teste de normalidade e posteriormente a ANOVA de duas vias e as médias foram comparadas pelo teste de Sidak. Os dados de alteração macroscópicas em órgãos e de detecção de *Salmonella* spp. obtidos por meio do enriquecimento de amostras de fígado e baço foram convertidos em números binários (1, 0) e comparados pelo teste Qui-quadrado.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Verificação da deleção nas estirpes de *S. Pullorum*

Após a eletroporação com o plasmídeo pKD46, três colônias foram cuidadosamente selecionadas e com auxílio de uma alça estéril foram replaqueadas em LA enriquecido com ampicilina a uma concentração de 25µg/mL. Após incubação as colônias puras foram então submetidas a um teste de rugosidade utilizando acriflavina a 1% (figura 3). Duas culturas lisas foram recuperadas e estocadas em meio crioprotetor a -80°C até o momento do uso conforme item 4.3.2.1.

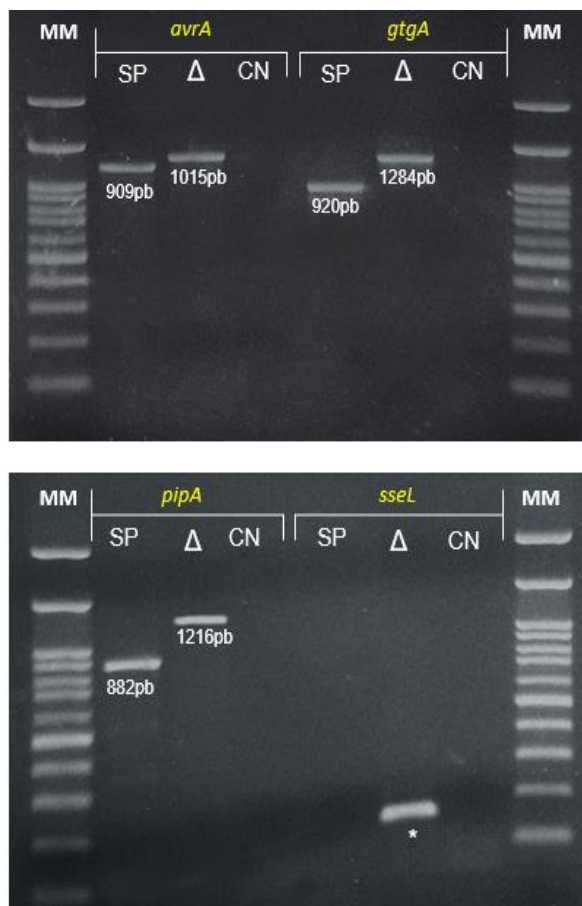


**Figura 3.** A = Colônias em LA recuperadas após eletroporação, B = teste de rugosidade com acriflavina 1%, a imagem superior representa o teste de uma amostra rugosa com presença de aglutinação, a inferior representa o teste de uma amostra lisa e, portanto, sem aglutinação.

A estirpe SP ATCC9120 foi considerada apta para a mutagênese após a inserção do plasmídeo. Então, foi inserido por meio de eletroporação o fragmento linear de mutagênese que abrangia o cassete de resistência ao cloranfenicol flanqueado pelas sequências complementares às regiões adjacentes aos genes alvo. As colônias sugestivas que se desenvolveram em LA contendo cloranfenicol foram preparadas para extração de DNA. A deleção foi verificada por PCR, aplicando primers detalhados na seção 4.3.5. Para o gene *sseL*, devido às bandas de tamanho similar entre a cepa mutante e a selvagem, optou-se por um conjunto específico de primers, *sseL\_ctl R* combinado com C2, para assegurar a distinção da mutação por deleção. Os

tamanhos das bandas observadas condizem com as previsões *in silico* e podem ser observados na figura 4.

## 5.2. Bacteriologia



**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % da estirpe receptora do cassete de resistência ao cloranfenicol. MM: Marcador de Tamanho Molecular (100pb DNA Ladder; Kasvi, Espanha – código: KSV9100L); SP: SP ATCC 9120; Δ: estirpe mutante; CN: controle negativo;

A análise dos dados de contagem bacteriana revelou ausência de crescimento de *Salmonella* sem enriquecimento prévio a partir do 21º dpi. Foram observadas contagens bacterianas no fígado e no baço aos 7º e 14º dias pós-infecção, apenas em aves dos grupos E (SP) e F (SG). Os valores médios, acompanhados pelos respectivos desvios padrões no sétimo dpi estão apresentados na Tabela 8. A diferença nas médias de contagem se mostrou estatisticamente significativa entre os grupos E e F, tanto para o baço quanto para o fígado. Aos 14 dpi, as aves do grupo o grupo F apresentaram média de contagem bacteriana de  $3,11 \pm 3,60$  no baço e  $2,89 \pm$

3,34 no fígado. No entanto, não foi observado crescimento bacteriano em baço e fígado de aves grupo E nesse dia.

**Tabela 8.** Médias das contagens de estirpes de *Salmonella* spp. em baço e fígado das aves aos 7 dias pós-infecção (dpi).

Amostras	Grupos (estirpe utilizada no desafio)	
	E (SP)	F (SG)
Baço	1,02 ± 2,04a	6,32 ± 0,65b
Fígado	2,11 ± 2,49a	6,53 ± 0,57b

SP= *S. Pullorum*; SG= *S. Gallinarum*. Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão das contagens bacterianas em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido (log10). Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa no teste de Sidak ( $P < 0,05$ ).

Os achados relativos à detecção de *Salmonella* (presença e ausência) estão disponíveis na tabela 9. Destaca-se o grupo F, que exibiu uma frequência de aves positivas superior em comparação aos demais grupos, os quais não apresentaram diferença estatística entre eles. Notou-se uma tendência de redução na probabilidade de aves positivas com o passar dos dias após a infecção.

**Tabela 9.** Recuperação de estirpes de *Salmonella* spp. de aves por meio de coleta de órgãos colhidos aos 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias pós-infecção (dpi).

Amostras		Grupos (estirpe utilizada no desafio)																							
		A (SP $\Delta$ avrA)				B (SP $\Delta$ gtgA)				C (SP $\Delta$ pipA)				D (SP $\Delta$ sseL)				E (SP)				F (SG)			
		n	D	I	T	n	D	I	T	n	D	I	T	n	D	I	T	n	D	I	T	n	D	I	T
Baço	7	4	0	0	0a	4	0	1	1a	4	0	0	0a	4	0	1	1a	4	1	1	2	4	4	0	4b
	14	4	1	0	1a	4	0	0	0a	4	1	0	1a	4	2	0	2a	4	0	0	0	4	2	0	2a
	21	4	1	0	1a	4	1	0	1a	4	1	0	1a	4	0	0	0a	4	0	0	0	4	0	0	0a
	35	10	0	0	0a	10	0	1	1a	10	0	0	0a	10	0	0	0a	10	0	0	0	4	0	0	0a
	49	7	0	1	1a	7	0	0	0a	7	0	1	1a	7	0	0	0a	7	0	0	0	4	0	0	0a
	63	7	0	0	0a	7	0	0	0a	7	0	0	0a	7	0	0	0a	7	0	0	0	4	0	0	0a
Total de positivos		3 (8,3%) A				3 (8,3%) A				3 (8,3%) A				3 (8,3%) A				2 (5,6%) A				6 (25%) B			
Fígado	7	4	0	0	0a	4	0	1	1a	4	0	0	0a	4	0	1	1a	4	2	0	2a	4	4	0	4b
	14	4	1	0	1a	4	0	0	0a	4	1	0	1a	4	1	0	1a	4	0	0	0a	4	2	0	2a
	21	4	1	0	1a	4	1	0	1a	4	1	0	1a	4	0	0	0a	4	0	0	0a	4	0	0	0a
	35	10	0	0	0a	10	0	1	1a	10	0	0	0a	10	0	0	0a	10	0	0	0a	4	0	0	0a
	49	7	0	0	0a	7	0	0	0a	7	0	1	1a	7	0	0	0a	7	0	0	0a	4	0	0	0a
	63	7	0	0	0a	7	0	0	0a	7	0	0	0a	7	0	0	0a	7	0	0	0a	4	0	0	0a
Total de positivos		2 (5,6%) A				3 (8,3%) A				3 (8,3%) A				2 (5,6%) A				2 (5,6%) A				6 (25%) B			

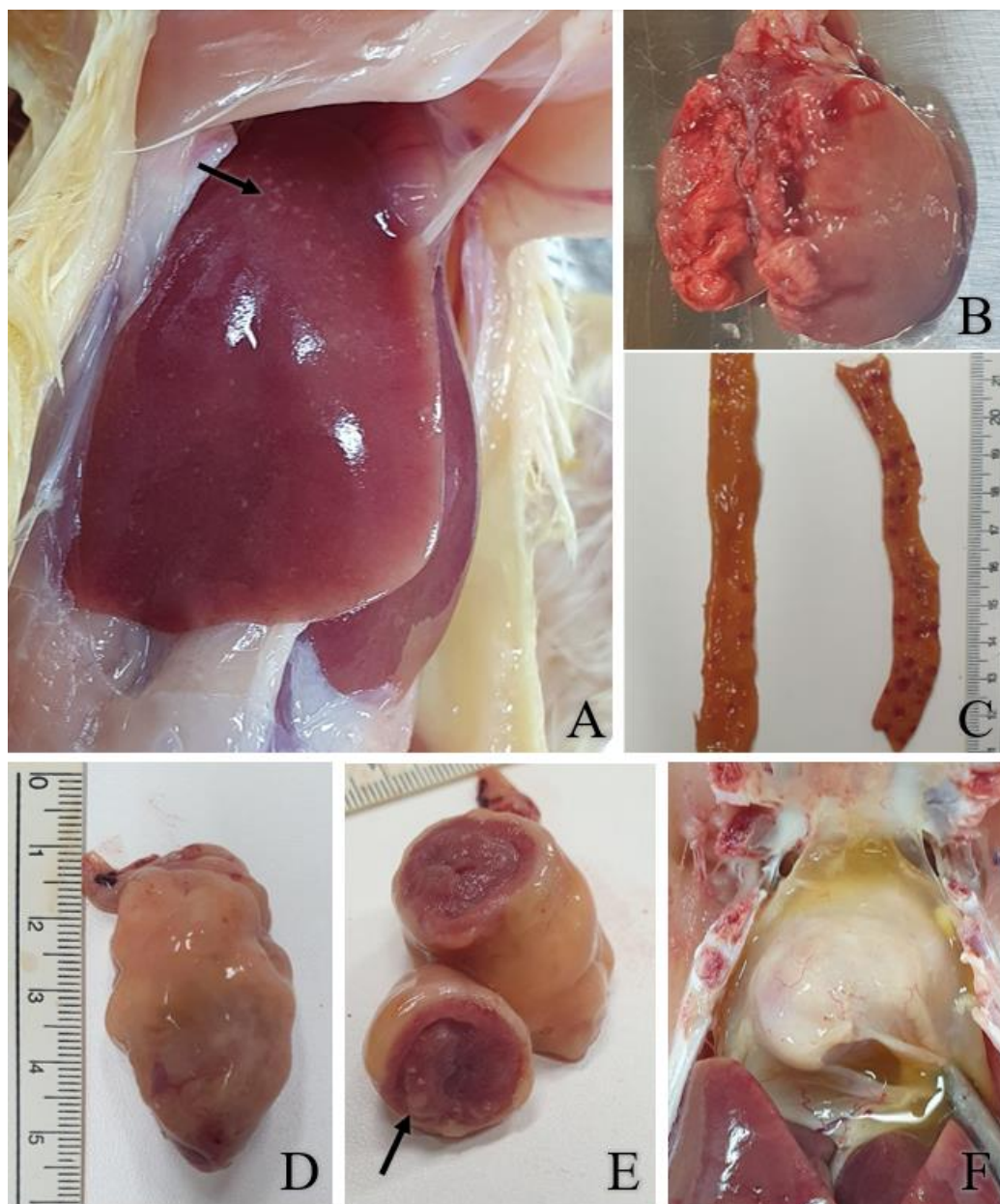
n: número de aves avaliadas em cada dpi. D: resultado positivo na semeadura direta.

I: resultado positivo após enriquecimento. T: D + I. O total de amostras positivas por dia de exame seguidos de letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). A proporção de positivos ao longo do experimento seguido de letras maiúsculas, diferentes na mesma linha, indicam diferença estatística pelo teste Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

### 5.3. Avaliação da patogenicidade e achados anatomopatológicos

Durante o estudo, aves do grupo F manifestaram sinais clínicos de sonolência, fraqueza generalizada, asas pendentes e penas arrepiadas já aos 4 dias pós-infecção (dpi), observou-se ainda, durante o manuseio das aves, que estas não buscavam os comedouros para se alimentar. Em comparação, as aves dos grupos A e E exibiram apenas sonolência e redução do tempo de alimentação nos comedouros durante o período de manejo, sendo que tais sinais foram mais evidentes e frequentes nas aves do grupo A. Os grupos B, C, D e G (aves não desafiadas) não apresentaram sinais clínicos de doença. Notavelmente, as aves do grupo F foram as únicas que apresentaram mortalidade, totalizando 17 aves mortas em duas semanas. Ao longo das coletas as aves remanescentes foram eutanasiadas para avaliação das alterações macroscópicas. Os órgãos

com maior frequência de lesões foram fígado, baço, pulmão e coração. No entanto foram encontradas alterações esporádicas em outros órgãos, incluindo intestino e pâncreas (figura 5).



**Figura 5.** Lesões macroscópicas encontradas ao longo das coletas. A: Fígado com pontos esbranquiçados multifocais milimétricos, seta mostra região com mais pontos. B: Pulmão com área focalmente extensa marrom clara e hipocrepante. C: A esquerda secção do jejunum com aspecto normal, à direita jejunum com áreas multifocais de hemorragia, lesão observada na ave A4 aos 49 dpi. D: coração com conformação anormal apresentando nódulos esbranquiçados. E: coração seccionado transversalmente com nódulos esbranquiçados aprofundando ao corte. F: saco pericárdico com presença abundante de líquido.

As principais alterações observadas nas aves e suas respectivas frequências ao longo do estudo estão descritas na tabela 10. Embora tenham sido observadas variações nas frequências

das lesões entre as aves dos diferentes grupos desafiados, as mesmas não foram estatisticamente diferentes pelo teste do Qui quadrado ( $P>0,05$ ). As aves do grupo controle não exibiram alterações anatomopatológicas.

**Tabela 10.** Frequências de alterações macroscópicas observadas em aves desafiadas com estirpes de *Salmonella* spp. ao longo de 65 dias pós-infecção (dpi).

dpi	Alterações macroscópicas	Grupos*					
		A	B	C	D	E	F
7	Fígado com pontos esbranquiçados multifocais milimétricos	(2/6)	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(1/6)	(3/4)
	Hepatomegalia	(0/6)	(1/6)	(1/6)	(0/6)	(1/6)	(2/4)
	Pulmão com área focalmente extensa marrom clara hipocreptante	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(1/6)	(1/4)
	Retenção do saco da gema	(2/6)	(2/6)	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(0/4)
	Esplenomegalia	(0/6)	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/4)
14	Fígado com pontos esbranquiçados multifocais milimétricos	(1/6)	(0/6)	(1/6)	(2/6)	(0/6)	(0/4)
	Hepatomegalia	(2/6)	(0/6)	(0/6)	(1/6)	(0/6)	(0/4)
	Pulmão com área focalmente extensa marrom clara hipocreptante	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(1/4)
	Coração com áreas esbranquiçadas elevadas	(0/6)	(0/6)	(1/6)	(1/6)	(0/6)	(1/4)
	Esplenomegalia	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(1/4)
21	Fígado com pontos esbranquiçados multifocais milimétricos	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/4)
	Hepatomegalia	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/4)
	Pulmão com área focalmente extensa marrom clara hipocreptante	(1/6)	(1/6)	(1/6)	(0/6)	(2/6)	(0/4)
	Coração com áreas esbranquiçadas elevadas	(3/6)	(2/6)	(1/6)	(0/6)	(1/6)	(1/4)
	Hidropericárdio	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/4)
35	Esplenomegalia	(1/10)	0,0%	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/4)
	Fígado com pontos esbranquiçados multifocais milimétricos	(0/10)	(1/10)	(0/10)	0,0%	(0/10)	(0/4)
	Hepatomegalia	(1/10)	(0/10)	(0/10)	(0/6)	(0/10)	(0/4)
	Pulmão com área focalmente extensa marrom clara hipocreptante	(0/10)	(3/10)	(2/10)	(0/10)	(0/10)	(2/4)
	Coração com áreas esbranquiçadas elevadas	(0/10)	(0/10)	(2/10)	(0/10)	(0/10)	(0/4)
49	Hidropericárdio	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/4)
	Esplenomegalia	(0/7)	(1/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
	Fígado com pontos esbranquiçados multifocais milimétricos	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
	Hepatomegalia	(1/7)	(1/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
	Pulmão com área focalmente extensa marrom clara hipocreptante	(1/7)	(1/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
63	Coração com áreas esbranquiçadas elevadas	(1/7)	(1/7)	(2/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
	Hidropericárdio	(0/7)	(1/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
	Esplenomegalia	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
	Fígado com pontos esbranquiçados multifocais milimétricos	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
	Hepatomegalia	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
63	Pulmão com área focalmente extensa marrom clara hipocreptante	(1/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
	Coração com áreas esbranquiçadas elevadas	(2/7)	(0/7)	(1/7)	(1/7)	(0/7)	(0/4)
	Hidropericárdio	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/7)	(0/4)
	Esplenomegalia	(2/6)	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(1/6)	(3/4)

\* Grupo A: aves desafiadas com SP $\Delta$ avrA; grupo B: com SP $\Delta$ gtgA; grupo C: com SP $\Delta$ pipA; grupo D: com SP $\Delta$ sseL; grupo E: com SP e aves do grupo F inoculadas com SG.



## 6. DISCUSSÃO

A pulorose, uma doença global causada por *Salmonella Pullorum* (SP), é prevalente em aves comerciais especialmente em países em desenvolvimento. Sua persistência em aves é um aspecto crítico para a sua epidemiologia e ainda é pouco compreendida (BARROW; FREITAS NETO, 2011; ZHOU et al., 2022). *Salmonella* spp. evoluiu para neutralizar agentes microbicidas intracelulares e persistir dentro de vacúolos em macrófagos, utilizando estratégias como a produção de proteínas efetoras via T3SSs, que induzem respostas anti-inflamatórias no hospedeiro. Diferentemente de outros sorovares, SP causa infecções sistêmicas em pintinhos com mínima resposta inflamatória e estimula uma resposta imunológica predominantemente Ta2, ao contrário de *S. Enteritidis* que ativa respostas Ta1 e Ta2 (CHAKRAVORTTY; HANSEN-WESTER; HENSEL, 2002; ESWARAPPA et al., 2010; LI et al., 2018; CHAPPELL et al., 2009; TANG et al., 2018).

Neste contexto, é importante destacar a estratégia de inibição da via NF- $\kappa$ B que leva à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e IFN- $\gamma$ , que atuam na modulação de resposta imune celular. Alguns estudos exploram a função de efetores nessa via. Ao examinar os efeitos da proteína SteE *in vitro*, Liu et al. (2022) identificaram um perfil de resposta anti-inflamatória caracterizado pelo aumento na expressão das citocinas IL-4 e IL-10 e redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12). Adicionalmente, Li et al. (2020) demonstraram que a remoção da proteína IpaJ em SP, sintetizada por um gene do plasmídeo pSPI12, resultou em resposta anti-inflamatória com supressão da via de sinalização NF- $\kappa$ B. Observações semelhantes foram feitas por Günster et al. (2017), ao estudar em modelos murinos as variantes de *S. Typhimurium* que tiveram os genes sseK1 e sseK2 deletados. Além de *Salmonella*, outros gêneros de bactérias empregam a estratégia de bloqueio da via NF- $\kappa$ B como mecanismo para evadir a resposta imune do hospedeiro e promover a virulência, como por exemplo, *Yersinia* spp. por meio da proteína YopJ, e *Shigella* spp. com a expressão da quinase OspG (KIM et al., 2005; ZHOU et al., 2005). Portanto, ao que tudo indica, a inibição da resposta imune celular é essencial para a condição de persistência observada em aves infectadas por SP. Com intuito de iniciar os primeiros passos na investigação dessa hipótese e poder melhor compreender aspectos relacionados à patogênese da pulorose, o presente estudo foi elaborado. Buscou-se avaliar os efeitos da deleção de genes responsáveis por proteínas anti-inflamatórias AvrA, GtgA, PipA e SseL na infecção de aves por SP.

Aves jovens e de linhagens pesadas e semi-pesadas são as mais susceptíveis à pulorose. Após a infecção, algumas aves podem sucumbir à doença. Outras desenvolvem sinais clínicos, mas conseguem se recuperar. Estas, após os sinais clínicos, apresentam uma redução gradativa no número de bactérias no baço e no fígado. Ao passo que, entorno da 12ª semana após a infecção, menos que cem bactérias por grama são encontradas nestes órgãos (WIGLEY et al., 2001, WIGLEY et al., 2005). No entanto, durante o início da postura, ocorre intensificação da infecção sistêmica, com aumento da população bacteriana e SP pode atingir o trato reprodutivo das galinhas. Tais mudanças no curso da infecção sugerem uma relação direta com as alterações fisiológicas ou hormonais associadas à maturidade sexual nas galinhas. Entretanto, o mesmo não seria observado em machos, onde os níveis de SP permaneceriam baixos (WIGLEY et al., 2005). No presente estudo, a detecção de SP, incluindo das estirpes com deleção gênica, nas aves foi relativamente baixa ao longo do experimento. É possível que condições hormonais e fisiológicas das aves utilizadas tenham contribuído para manutenção de baixos níveis de infecção observados. Adicionalmente, é importante ressaltar que as aves avaliadas por Wigley et al. (2005) foram mantidas até 18 semanas. Enquanto que no presente trabalho as aves foram avaliadas por 10 semanas apenas. Embora não seja possível afirmar, a avaliação das aves por um período mais longo poderia ter evidenciado diferenças significativas na persistência entre as diferentes estirpes de SP. No entanto, tal observação não pôde ser realizada nas condições experimentais disponíveis.

Vale destacar que, embora as proteínas AvrA, GtgA, PipA e SseL atuem na inibição da via de sinalização NF- $\kappa$ B, os genes responsáveis pelas mesmas são regulados por vias independentes (COOMBES et al., 2007; KERRINNES et al., 2009; ONG et al., 2010). Portanto, o efeito da deleção de um gene poderia ser compensado pela presença dos outros. Esse mecanismo poderia explicar a semelhança na patogenicidade e níveis de detecção das estirpes mutantes em relação à estirpe selvagem (SP) observados em aves dos diferentes grupos. Com propósito de aprofundar a investigação desse tema, seria importante avaliar ainda a infecção de aves por estirpes de SP com mutações duplas ou triplas nos genes estudados. Tal abordagem permitiria neutralizar simultaneamente diferentes vias de sinalização da via NF- $\kappa$ B.

Em estudos prévios, foi demonstrado que uma estirpe de *S. Typhimurium* com deleção do gene *avrA* provocou aumento na apoptose de células epiteliais e de macrófagos no decorrer da infecção, quando comparada à estirpe selvagem. Além disso, a deleção do gene *avrA* parece ter favorecido a infecção sistêmica, resultando em aumento da carga microbiana nos tecidos linfóides sistêmicos e na taxa de mortalidade de camundongos (WU et al., 2012). De forma semelhante, Liao et al. (2008) relataram que uma estirpe de *S. Typhimurium*, caracterizada pela

deleção do gene *avrA*, induziu aumento na permeabilidade celular intestinal em camundongos, o que foi constatado após a administração de fluoresceína dextrana. Esta condição foi acompanhada por uma diminuição na expressão das proteínas que compõem as junções celulares estreitas em células epiteliais. Adicionalmente, os autores destacaram um incremento nas respostas inflamatórias, marcado pela elevação dos níveis de IL-6 no soro de camundongos desafiados com a estirpe mutante. Os achados de Sun et al. (2016) indicaram que a deleção dos genes *gtgA* e *pipA* em *S. Typhimurium* levaram ao aumento da expressão das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no epitélio intestinal de camundongos, desencadeando ainda inflamação intestinal mais intensa. Essa maior severidade foi evidenciada ainda em cortes histopatológicos do ceco de camundongos. Por outro lado, Takemura et al. (2021) investigaram a deleção dos mesmos genes. Porém, não observaram diferenças na intensidade de lesões microscópicas em intestinos dos camundongos desafiados com estirpes mutantes ou selvagem. No presente estudo, foi possível notar alterações intestinais macroscópicas em algumas aves desafiadas com as estirpes mutantes, estas não foram evidenciadas em aves dos grupos que receberam estirpes selvagens ou em aves pertencentes ao grupo controle negativo, sem inoculação de estirpes. No entanto, somente por meio de análises histopatológicas desses tecidos será possível obter descrições e avaliações mais precisa de tais achados.

Em trabalhos anteriores foi relatado que deleções de genes que codificam proteínas com propriedades anti-inflamatórias em *Salmonella* spp. resultaram em incremento na patogenicidade das estirpes mutantes (TAKEMURA et al., 2021; WU; JONES; NEISH, 2012). Com base nessa premissa, no presente estudo, postulou-se que a remoção dos genes (*avrA*, *sseL*, *gtgA* e *pipA*) escolhidos em SP poderia tornar algum dos mutantes mais patogênicos para as aves. Para elucidar essa hipótese e melhor comparar a patogenicidade das estirpes, foi incluído um grupo de aves desafiadas com SG. Embora haja similaridade genética entre os dois biovars, foi demonstrado que SG apresenta um grau de patogenicidade para aves superior ao de SP (BATISTA et al., 2015; FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020). Como esperado, durante a fase aguda da infecção, aos 7 dpi, observou-se uma quantidade superior de SG em baço e fígado das aves desafiadas com SG (grupo F) em comparação àquelas desafiadas com SP (grupo E). Não se obteve contagens das estirpes mutantes em fígado e baço das aves (grupos A, B, C e D), sendo que as mesmas foram detectadas apenas após enriquecimento seletivo das amostras dos referidos órgãos. Esses resultados sugerem menor habilidade de sobrevivência das estirpes mutantes no ambiente sistêmico, possivelmente no interior de macrófagos. Jones et al. (2001) observaram que a deleção da SPI-2 de SG reduziu a capacidade de sobrevivência das bactérias no interior macrófagos imortalizados denominados HD11. Deste modo, acredita-se que a

ausência das proteínas anti-inflamatórias possa ter afetado a relação patógeno-hospedeiro. Entretanto, para conclusões mais precisas, mais estudos envolvendo a infecção celular e a resposta imune da ave durante a infecção são necessários.

Os sinais clínicos mais comuns em aves com tifo aviário, causado por SG descritos na literatura são diminuição súbita no consumo de ração e água, prostração, sonolência, febre, penas eriçadas, diarreia e, por fim, morte entre 4 e 10 dias após a infecção, independente da idade da ave. A pulorose apresenta sinais clínicos semelhantes. No entanto, é mais comum em aves jovens (BERCHIERI A. et al., 2001; FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020). No presente estudo foi possível reproduzir este padrão de doença nas aves no grupo F (inoculadas com SG). Entretanto, as aves inoculadas com estirpes mutantes e selvagem de SP não apresentaram todos os sinais típicos da pulorose. As aves inoculadas com as estirpes SP $\Delta$ gtgA, SP $\Delta$ pipA, SP $\Delta$ sseL, não apresentaram sinais clínicos. Enquanto que as aves inoculadas com SP $\Delta$ avrA e SP apresentaram sonolência e prostração. Ao avaliar as lesões macroscópicas em órgãos das aves desafiadas, não houve diferença estatística. A ausência ou a manifestação de doença branda nos grupos inoculados com SP e mutantes pode ser atribuída às diferenças nas doses de inoculação. Estudos abordando a patogenia da pulorose empregaram inóculos com 10<sup>8</sup> ou 10<sup>9</sup> UFC, enquanto que no presente estudo utilizou-se 10<sup>7</sup> UFC (WIGLEY et al., 2001; WIGLEY; JONES; BARROW, 2002). Vale destacar que objetivou-se avaliar a persistência da infecção. Portanto, não era desejado mortalidade no decorrer do experimento. Ademais, as infecções de campo por SP ocorrem em aves mais jovens, por infecção do embrião ou durante o nascimento. As aves deste trabalho foram desafiadas aos 7 dias, um pouco mais tardias.

De maneira geral, a deleção individual dos genes *avrA*, *gtgA*, *pipA* e *sseL* em *S. Pullorum* não resultou em alterações significativas na patogenicidade e na persistência da infecção. Esse achado sugere que, de forma isolada, esses genes não desempenham função primordial na manutenção do estado de persistentemente infectado característico da pulorose. Tal observação pode ser atribuída à regulação distinta de cada um desses genes e à possível existência de mecanismos compensatórios entre os genes que atuam diretamente na via NF- $\kappa$ B (FÁBREGA; VILA, 2013; STERZENBACH et al., 2013). Nesse contexto, presume-se que a criação de mutantes com deleções múltiplas possa revelar de forma mais clara a interação sinérgica desses genes na patogenicidade e na persistência de *S. Pullorum*. Adicionalmente, a realização de estudos futuros que detalhem o perfil imunológico da interação patógeno-hospedeiro, juntamente com análise histopatológica envolvendo a intensidade das lesões encontradas, poderiam fornecer informações importantes sobre a interação destes efetores no sistema imune das aves.

## 7. CONCLUSÃO

Nas condições em que o presente estudo foi realizado, concluiu-se que:

- A deleção individual de genes que codificam as proteínas anti-inflamatórias AvrA, GtgA, PipA e SseL não alteraram a persistência de SP.
- Com a utilização de métodos moleculares foi possível gerar quatro estirpes mutantes com deleção dos genes *avrA*, *gtgA*, *pipA* e *sseL*, respectivamente.
- A comparação entre as estirpes selvagens *S. Pullorum* e as mutantes não revelou diferenças em termos de patogenicidade e persistência. Além disso, constatou-se que as estirpes mutantes não se tornaram patogênicas como *S. Gallinarum*.
- Embora todas as estirpes inoculadas tenham induzido lesões nos órgãos das aves desafiadas, as frequências das alterações anatomopatológicas observadas foram semelhantes entre os grupos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. **RELATÓRIO ANUAL**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<<https://abpa-br.org/noticias/>>>. Acesso em: 23 abr. 2022.
- BARBOUR, E. K. et al. Impact of sporadic reporting of poultry *Salmonella* serovars from selected developing countries. **Journal of infection in developing countries**, v. 9, n. 1, p. 001–007, 15 jan. 2015.
- BARROW, P. A.; NETO, O. C. F. Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, v. 40, n. 1, p. 1–13, fev. 2011.
- BATISTA, D. F. A. et al. Identification and characterization of regions of difference between the *Salmonella Gallinarum* biovar *Gallinarum* and the *Salmonella Gallinarum* biovar *Pullorum* genomes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 74–81, 1 mar. 2015.
- BATISTA, D. F. A. et al. Molecular identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum* by a duplex PCR assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 4, p. 419–422, 1 jul. 2016.
- BERCHIERI A., J. et al. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars *Pullorum* and *Gallinarum* in chickens: Effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, v. 30, n. 3, p. 221–231, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Animal. Departamento de Saúde Animal. Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil, Programa Nacional de Sanidade Avícola: Manual de Legislação. Brasília. 2009. 440 p.
- CHAPPELL, L. et al. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 53–59, 15 mar. 2009.
- COLLIER-HYAMS, L. S. et al. Cutting Edge: *Salmonella* AvrA Effector Inhibits the Key Proinflammatory, Anti-Apoptotic NF- $\kappa$ B Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 2846–2850, 15 set. 2002.
- COOMBES, B. K. et al. SseL is a *Salmonella*-specific translocated effector integrated into the SsrB-controlled *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 574–580, fev. 2007.
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 6640–6645, 2000.
- DE MEDICI, D. et al. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* in poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3456–3461, 1 jun. 2003.
- DILLON, S. C. et al. LeuO is a global regulator of gene expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v. 85, n. 6, p. 1072–1089, 23 set. 2012.

- EICHELBERG, K.; GALÁN, J. E. Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and HilA. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 4099–4105, 1999.
- FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 308–341, abr. 2013.
- FENG, Y. et al. Genomic Comparison between *Salmonella Gallinarum* and *Pullorum*: Differential Pseudogene Formation under Common Host Restriction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 15 mar. 2013.
- FIGUEROA-BOSSI, N.; BOSSI, L. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 167–176, 1999.
- FOSTER, N. et al. Revisiting Persistent *Salmonella* Infection and the Carrier State: What Do We Know? **Pathogens**, v. 10, out. 2021.
- FREITAS NETO, O. C.; PENHA FILHO, R. A. C.; BERCHIERI JÚNIOR, Â. Salmoneloses Aviárias. Em: ANDREATTI FILHO, R. L. et al. (Eds.). **Doenças das Aves**. terceira edição ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2020. v. 1p. 495–518.
- FUJIHARA, M. et al. Verification of different methods used for isolating *Salmonella enterica* serovar Dublin from cattle feces. **The Journal of veterinary medical science**, v. 85, n. 10, p. 1077–1082, 2023.
- GAL-MOR, O. et al. The *salmonella enterica* PhoP directly activates the horizontally acquired SPI-2 gene *ssel* and is functionally different from a *S. bongori* ortholog. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.
- GENG, S. et al. The SseL protein inhibits the intracellular NF- $\kappa$ B pathway to enhance the virulence of *Salmonella Pullorum* in a chicken model. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, p. 1–6, 1 abr. 2019.
- GOLUBEVA, Y. A.; SLAUCH, J. M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium periplasmic superoxide dismutase SodCI is a member of the PhoPQ regulon and is induced in macrophages. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 22, p. 7853–7861, nov. 2006.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Precipitation of DNA with ethanol. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 12, p. 1116–1120, 1 dez. 2016.
- GUNN, J. S. et al. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 11, p. 648–655, 1 nov. 2014.
- IMRE, A. et al. Gene expression analysis of *Salmonella enterica* SPI in macrophages indicates differences between serovars that induce systemic disease from those normally causing enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3–4, p. 675, 12 dez. 2013.
- ISSENHUTH-JEANJEAN, S. et al. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 1 set. 2014.
- JONES, M. A. et al. *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1

type III secretion system for virulence in chickens. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5471–5476, 2001.

JONES, R. M. et al. Salmonella AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 4, p. 233–244, 17 abr. 2008.

KERRINNES, T. et al. CsrA and CsrB are required for the post-transcriptional control of the virulence-associated effector protein AvrA of Salmonella enterica. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, n. 5, p. 333–341, jun. 2009.

LANGRIDGE, G. C. et al. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in Salmonella. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 3, p. 863–868, 20 jan. 2015.

LOPES, P. D. et al. Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum. **Veterinary Journal**, v. 214, p. 40–46, 1 ago. 2016.

MESQUITA, F. S.; HOLDEN, D. W.; ROLHION, N. Lack of effect of the Salmonella deubiquitinase SseL on the NF- $\kappa$ B pathway. **Plos one**, v. 8, n. 1, p. e53064–e53064, 8 jan. 2013.

MONACK, D. M.; MUELLER, A.; FALKOW, S. **Persistent bacterial infections: The interface of the pathogen and the host immune system**. **Nature Reviews Microbiology**, set. 2004.

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. 2, p. 245–256, 2 mar. 2017.

NEGRATE, G. LE et al. Salmonella Secreted Factor L Deubiquitinase of Salmonella typhimurium Inhibits NF- $\kappa$ B, Suppresses I $\kappa$ B $\alpha$  Ubiquitination and Modulates Innate Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 5045–5056, 1 abr. 2008.

NIELSEN, L. R. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of Salmonella Dublin in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 1–9, 22 fev. 2013.

PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, 1 out. 2018.

PINHEIRO, L. A. S.; DE OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI, A. Experimental Salmonella enterica serovar Pullorum infection in two commercial varieties of laying hens. **Avian Pathology**, v. 30, n. 2, p. 129–133, abr. 2001.

PROST, L. R. et al. Activation of the Bacterial Sensor Kinase PhoQ by Acidic pH. **Molecular Cell**, v. 26, n. 2, p. 165–174, 27 abr. 2007.

RAHMAN, M. M.; MCFADDEN, G. Modulation of NF- $\kappa$ B signalling by microbial pathogens. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 291–306, abr. 2011.



RYTKÖNEN, A. et al. SseL, a Salmonella deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 9, p. 3502–3507, 27 fev. 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Appendix: Liquid Media for E. coli. Em: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. [s.l: s.n.]. v. 3p. A2.3.

SANCHIS, R.; PARDON, P.; ABADIE, G. Abortion and serological reaction of ewes after conjunctival instillation of Salmonella enterica subsp enterica ser abortusovis. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v. 22, n. 1, p. 59–64, 1991.

STERZENBACH, T. et al. Salmonella Virulence Mechanisms and their Genetic Basis. Em: BARROW, P. A.; METHNER, U. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. 2. ed. [s.l.] Oxfordshire: CAB International, 2013, 2013. p. 80–103.

SUN, H. et al. A Family of Salmonella Type III Secretion Effector Proteins Selectively Targets the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway to Preserve Host Homeostasis. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 3, p. e1005484, 1 mar. 2016.

TAKEMURA, M. et al. A Salmonella type III effector, PipA, works in a different manner than the PipA family effectors GogA and GtgA. **PLOS ONE**, v. 16, n. 3, p. e0248975, 18 mar. 2021.

TANG, Y. et al. Model of Persistent Salmonella Infection: Salmonella enterica Serovar Pullorum Modulates the Immune Response of the Chicken from a Th17-Type Response towards a Th2-Type Response. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 8, 1 ago. 2018.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. v. 1

WHO. **Typhoid**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>>. Acesso em: 24 abr. 2022.

WIGLEY, P. et al. Salmonella enterica serovar pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7873–7879, 2001.

WIGLEY, P. et al. Infection of the Reproductive Tract and Eggs with *Salmonella enterica* Serovar Pullorum in the Chicken Is Associated with Suppression of Cellular Immunity at Sexual Maturity. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 2986–2990, maio 2005.

WIGLEY, P.; JONES, M. A.; BARROW, P. A. Avian Pathology Salmonella enterica serovar Pullorum requires the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system for virulence and carriage in the chicken) Salmonella enterica serovar Pullorum requires the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system for virulence and carriage in the chicken Salmonella enterica serovar Pullorum requires the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system for virulence and carriage in the chicken. **Avian Pathology**, v. 31, n. 5, p. 501–506, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella (non-typhoidal)**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))>. Acesso em: 4 fev. 2024.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Fowl typhoid and Pullorum disease. Em: **Terrestrial Animal Health Code**. [s.l: s.n.].

WU, H.; JONES, R. M.; NEISH, A. S. The Salmonella effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection in vivo. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 1, p. 28, jan. 2012.

YE, Z. et al. Salmonella Effector AvrA Regulation of Colonic Epithelial Cell Inflammation by Deubiquitination. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 3, p. 882–892, 1 set. 2007.

YEAN ONG, S. et al. Analysis and construction of pathogenicity island regulatory pathways in Salmonella enterica serovar Typhi. 2010.

YIN, C. et al. AvrA Exerts Inhibition of NF- $\kappa$ B Pathway in Its Naïve Salmonella Serotype through Suppression of p-JNK and Beclin-1 Molecules. **International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 6063**, v. 21, n. 17, p. 6063, 23 ago. 2020.

ZANCAN, F. T. et al. Salmonella spp investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 229–232, set. 2000.

ZHOU, X. et al. A global dataset for prevalence of Salmonella Gallinarum between 1945 and 2021. **Scientific Data**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2022.