

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM COM
DELEÇÃO DOS GENES *phoP* E *phoQ* (SG Δ *phoPQ*) EM
AVES COMERCIAIS**

Lucas Bocchini Rodrigues Alves

Médico Veterinário

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM COM
DELEÇÃO DOS GENES *phoP* E *phoQ* (SG Δ *phoPQ*) EM
AVES COMERCIAIS**

Lucas Bocchini Rodrigues Alves

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2017

R696p Rodrigues Alves, Lucas Bocchini
Patogenicidade de *Salmonella* Gallinarum com deleção dos genes
phoP e *phoQ* (SG Δ *phoPQ*) em aves comerciais / Lucas Bocchini
Rodrigues Alves. -- Jaboticabal, 2017
xiii, 84 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Co-orientador: Oliveiro Caetano de Freitas Neto

Banca examinadora: Terezinha Knöbl, Marita Vedovelli Cardozo

Bibliografia

1. Atenuado. 2. Aves domésticas. 3. Infecção sistêmica. 4.
Sistema regulatório. 5. Tifo aviário I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.981.49:636.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

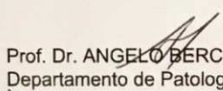
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM COM DELEÇÃO DOS GENES *phoP* E *phoQ* (SG Δ *phoPQ*) EM AVES COMERCIAIS

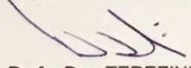
AUTOR: LUCAS BOCCHINI RODRIGUES ALVES

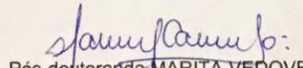
ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

COORIENTADOR: OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANGELO BERCHIERI JUNIOR
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. TEREZINHA KNÖBL
Departamento de Patologia / FMVZ/USP / São Paulo/SP


Pós-doutoranda MARITA VEDOVELLI CARDOZO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 27 de julho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS BOCCHINI RODRIGUES ALVES – Nascido em Franca, São Paulo, em 14 de Maio de 1990, filho de Flávio Rodrigues Alves Filho e Lana de Paula Bocchini Rodrigues Alves. Em 2009, ingressou em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP/Jaboticabal, obtendo o título de Médico Veterinário em 2013. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica tendo desenvolvido projeto de pesquisa na área de patologia animal, sob orientação do Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara e participou de projeto de extensão cadastrado na PROEX (Pró-reitoria de Extensão Universitária) com enfoque em assistência a propriedades leiteiras familiares, sob coordenação da Prof^a Dr^a Maria Imaculada Fonseca. Em Agosto de 2015, ingressou no mestrado na FCAV/UNESP/Jaboticabal pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e co-orientação do Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto.

DEDICATÓRIA

Dedico

Aos meus pais, Flávio e Lana, aos meus irmãos Matheus e Danilo, à Mirella,
às minhas cunhadas Flávia e Patrícia e ao meu sobrinho Vicente.

Aos meus queridos avós Flávio, Rosita, Waldemar e Olga.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Flávio e Lana, por todo amor, educação e incentivo. Agradeço por me apoiarem em todas as decisões e por constituírem a base de minhas conquistas. Obrigado pela família que construíram e por serem meus maiores exemplos.

Aos meus irmãos, Matheus e Danilo, por todo apoio, companheirismo e confiança. Vocês exercem perfeitamente o papel de irmãos mais velhos, sempre me ensinando e sendo grandes amigos. Agradeço também às minhas queridas cunhadas, Flávia e Patrícia, além da mais nova alegria da família, meu sobrinho e afilhado Vicente.

À Mirella, pelos últimos quatro anos de apoio constante, amor, carinho e companheirismo. Obrigado pela paciência e por estar ao meu lado em todos os momentos. Agradeço pela nova família que me proporcionou com Dona Zélia, Francine, Marcos e Mariana.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, pela oportunidade e voto de confiança. Grande referência pelo profissionalismo e ética no meio acadêmico e da avicultura. Obrigado por todos os ensinamentos durante a graduação e pós-graduação que me fizeram crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Oliveiro Caetano de Freitas Neto, pela dedicação, paciência, apoio, profissionalismo e por fornecer a ideia do projeto.

Às Professoras Terezinha Knöbl e Marita Vedovelli Cardozo pela disponibilidade para comporem a banca examinadora e pelas observações valiosas que tanto agregaram à dissertação.

À equipe do Laboratório de Ornitopatologia, Adriana, Rafael, Diego, Marcela, Fernanda, Anny, Andrei, Valdinete, Vinícius, Barbara, Sabrina e Carolina pelos

ensinamentos, paciência e por tornarem o dia-a-dia mais leve. Não somente companheiros de trabalho, mas grandes amigos.

Aos irmãos da República In-Dependência pela amizade e companheirismo. Obrigado pelos ótimos momentos desde 2009, sendo a família que a faculdade me deu e que levarei para o resto da vida.

Aos meus amigos de Franca: Breno, Caio, Fúlvio, Garbim, Leonel, Luís Felipe, Marcelo e Tarcísio. Agradeço pelos quase 25 anos de amizade e que mesmo distantes, nunca mudará; gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Aos meus avós, tios e primos pelo amor, carinho e apoio. De alguma forma, todos contribuíram pela minha formação pessoal e profissional. Muito obrigado.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, em especial ao Departamento de Patologia Veterinária. Sou privilegiado por tê-la como minha segunda casa. Minha eterna gratidão aos docentes por todo aprendizado durante a minha passagem pela Faculdade, não só para mim como para outros ex-alunos: meu pai, namorada e primos. Deixo também meus agradecimentos aos funcionários.

Aos companheiros acadêmicos da eterna Vet09. Obrigado pelas risadas diárias ao longo da graduação e pelo crescimento pessoal e profissional que nossa convivência nos proporcionou.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
CERTIFICADO DA COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Nomenclatura de <i>Salmonella</i> spp.....	3
2.2. Classificação das salmoneloses.....	3
2.3. Tífo Aviário	5
2.4. Patogenia e Ilhas de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> (SPI)	9
2.5. Importância dos genes <i>phoP</i> e <i>phoQ</i> para <i>Salmonella</i> spp.....	14
3. OBJETIVOS	21
3.1. Geral.....	21
3.2. Específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Instalações experimentais	22
4.2. Estirpes bacterianas utilizadas no estudo	22
4.3. Construção da estirpe mutante	22
4.3.1. Sequência alvo e construção dos iniciadores.....	23
4.3.2. Amplificação e precipitação dos fragmentos de DNA recombinantes	24

4.3.3. Eletroporação	25
4.3.4. Transdução	25
4.3.5. Confirmação da mutação na estirpe de <i>Salmonella Gallinarum</i>	26
4.4. Experimentos <i>in vivo</i>	27
4.4.1. Aves	27
4.4.2. Preparo dos inóculos	28
4.4.3. Experimento 01: Avaliação da atenuação de <i>SGΔphoPQ</i>	29
4.4.4. Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica	29
4.5. Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Preparo da estirpe mutante	31
5.2. Experimento <i>in vivo</i>	32
5.2.1. Experimento 01: Avaliação da atenuação de <i>SGΔphoPQ</i>	33
5.2.2. Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica	34
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	48
8. REFERÊNCIAS	49

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS


 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
 Câmpus de Jaboticabal
 

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Patogenicidade de *Salmonella Gallinarum* biovar *Gallinarum* com deleção dos genes *phoP* e *phoQ* (SGΔ*phoPQ*) em aves comerciais**", protocolo nº 23049/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 5.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL -SP, em reunião ordinária de 04 de dezembro de 2015.

Vigência do Projeto	01/03/2016 a 28/02/2019
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Hy-Line Brown (postura comercial)
Nº de animais	270
Peso / Idade	35 gramas / 1 dia
Sexo	Fêmea
Origem	Hy-Line do Brasil LTDA

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2015.


Profª Drª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n CEP: 13064-800 - Jaboticabal - SP - Brasil
 Tel. 16 3209 2000 - Fax 16 3202 4275 www.fca.vet.unesp.br

PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM COM DELEÇÃO DOS GENES *phoP* E *phoQ* (*SG* Δ *phoPQ*) EM AVES COMERCIAIS

RESUMO – *Salmonella* Gallinarum (SG) é um patógeno hospedeiro-específico que causa o tifo aviário, doença sistêmica severa que é considerada uma das principais preocupações da indústria avícola mundial. Quando infecta a ave, SG utiliza mecanismos de evasão para sobreviver e replicar no interior de macrófagos. Nesse contexto, os genes *phoPQ* codificam o sistema regulatório de dois componentes (PhoPQ) que regula genes de virulência responsáveis pela adaptação de *Salmonella* spp. a fatores antimicrobianos como baixo pH, peptídeos antimicrobianos e baixas concentrações de cátions bivalentes. No presente estudo, objetivou-se investigar a função desses genes para SG. Assim, uma estirpe de SG com genes *phoPQ* defectivos (*SG* Δ *phoPQ*) foi construída e sua patogenicidade avaliada em aves poedeiras de 20 dias de vida susceptíveis ao tifo aviário. *SG* Δ *phoPQ* não causou sinais clínicos nem mortalidade em aves desafiadas oralmente, sendo não-patogênica. Ademais, essa estirpe não foi recuperada de fígados e baços. Por outro lado, aves desafiadas subcutaneamente com a estirpe mutante tiveram alterações patológicas discretas a moderadas e baixas contagens bacterianas em tecidos de fígado e baço. A partir dos dados, observa-se que *SG* Δ *phoPQ* é atenuado para aves o que sugere que ambos os genes são importantes durante a infecção sistêmica em aves por SG.

Palavras-chave: Atenuado, aves domésticas, infecção sistêmica, sistema regulatório, tifo aviário

**PATHOGENICITY OF *Salmonella* GALLINARUM WITH DELETIONS OF *phoP*
AND *phoQ* (SG Δ *phoPQ*) GENES IN COMMERCIAL POULTRY**

ABSTRACT – *Salmonella* Gallinarum (SG) is a host-restrict pathogen that causes fowl typhoid, a severe systemic disease that is one of the major concerns to the poultry industry worldwide. When infecting the bird, SG makes use of evasion mechanisms to survive and to replicate within macrophages. In this context, *phoPQ* genes encode a two-component regulatory system (PhoPQ) that regulates virulence genes responsible for adaptation of *Salmonella* spp. to antimicrobial factors such as low pH, antimicrobial peptides and deprivation of bivalent cations. Herein, we aimed to investigate the role of the mentioned genes to SG. Thus, a *phoPQ*-depleted SG strain (SG Δ *phoPQ*) was constructed and its virulence assessed in twenty-day-old laying hens susceptible to fowl typhoid. SG Δ *phoPQ* did cause neither clinical signs nor mortality in birds orally challenged, being non-pathogenic. Furthermore, this strain was not recovered from livers or spleens. On the other hand, chickens challenged subcutaneously with the mutant strain had discreet to moderate pathological changes and also low bacterial counts in liver and spleen tissues. These findings show that SG Δ *phoPQ* is attenuated to susceptible chickens and suggest that both genes are important during chicken systemic infection by SG.

Keywords: Attenuate, poultry, systemic infection, regulatory system, fowl typhoid

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
μF	Microfarads
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
ADP	Adenosina Difosfato
Amp ^r	Resistência a ampicilina
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Resposta de Tolerância ao ácido
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cf ^r	Resistência ao cloranfenicol
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Dpi	Dias pós-infecção
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	Colaboradores do autor
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
(g)	Aceleração da gravidade
FAK	Quinase de Adesão Focal
GALT	Tecidos Linfóides Associados ao Intestino
GTA	Guia de Trânsito Animal
h	Horas
H ⁺	Hídron
H ₂ O	Água
IFN-β	Interferon-Beta
IFN- γ	Interferon-Gama
IgA	Imunoglobulina A
IL-6	Interleucina-6

kV	Quilovolt
LB	Lisogenia
Log ₁₀	Logaritmo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeos
mA	Miliampere
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg ²⁺	Íon magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mΩ	Miliohm
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	<i>Célula Natural Killer</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
<i>pag</i>	Genes expressos por PhoP
PAMPs	Padrões Associados à Patógenos
pb	Pares de base
pbs	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase associada ao Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fósforo inorgânico
prg	Genes reprimidos por PhoP
qsp	Quantidade suficiente para
RPM	Rotações por minuto
SCV	Vacúolo contendo <i>Salmonella</i>
SE	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Enteritidis
SG	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Gallinarum biovar Gallinarum

SG $\Delta phoPQ$	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Gallinarum biovar Gallinarum com genes <i>phoPQ</i> defectivos
SGNal ^r	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Gallinarum biovar Gallinarum resistente ao ácido nalidíxico
SN	Selenito-Novobiocina
SP	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovar Gallinarum biovar Pullorum
SPI	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>
SPI-1	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> do tipo 1
SPI-2	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> do tipo 2
SPI-3	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> do tipo 3
SPI-4	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> do tipo 4
SPI-5	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> do tipo 5
spp.	Espécie
ST	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovar Typhi
STM	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovar Typhimurium
subsp.	Subespécie
SVO	Serviço Veterinário Oficial
T1SS	Sistema de Secreção do Tipo Um
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
TTSS	Sistema de Secreção do Tipo Três
TTSS-2	Sistema de Secreção do Tipo Três da SPI-2
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
V	Volt
VB	Verde-brilhante

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Característica, funções e conservação das Ilhas de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> spp. mais estudadas.....	10
Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados no estudo.....	24
Tabela 3. Programa da PCR para amplificação de fragmento de DNA plasmidial....	25
Tabela 4. Programa da PCR para confirmar a mutação.....	27
Tabela 5. Protocolo de inoculação de diferentes estirpes bacterianas em aves semipesadas aos 20 dias de vida.....	29
Tabela 6. Mortalidade acumulativa de fêmeas de linhagem semipesada para postura comercial desafiadas experimentalmente com culturas de SG Δ phoPQ ou SG aos 20 dias de vida.....	34
Tabela 7. Alterações anatomopatológicas em aves de linhagem semipesada para postura comercial desafiadas experimentalmente com a estirpe mutante SG Δ phoPQ pela via oral (Grupo C) aos 20 dias de vida.....	36
Tabela 8. Alterações anatomopatológicas em aves de linhagem semipesada para postura comercial desafiadas experimentalmente com a estirpe mutante SG Δ phoPQ pela via subcutânea (Grupo D) aos 20 dias de vida.....	36
Tabela 9. Alterações anatomopatológicas em aves de linhagem semipesada para postura comercial desafiadas experimentalmente com a estirpe selvagem SG (Grupo E) aos 20 dias de vida.....	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Exemplo da rede de interação entre o sistema regulatório pleiotrópico de dois componentes PhoPQ e outro sistema regulatório. Adaptado de Groisman (2001).....15
- Figura 2. Modelo de regulação de PhoPQ em situações com concentrações diferentes de cátions bivalentes. Adaptado de Véscovi; Soncini; Groisman (1996).....17
- Figura 3. Comparação da capacidade de adaptação ao ambiente ácido e com pouco magnésio do SCV entre a estirpe selvagem de *Salmonella* spp. (1) com a estirpe contendo sistema PhoPQ defectivo (2). ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; H⁺: hídrion; Mg²⁺: cátion magnésio; Pi: fósforo inorgânico; rRNA: RNA ribossomal; SCV: Vácuolo contendo *Salmonella*. Adaptado de Lee; Groisman (2012); Groisman et al. (2013); Lee; Pontes; Groisman (2013); Pontes; Yeom; Groisman (2016).....19
- Figura 4. Eletroferograma em gel de agarose 1,5%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler, 1 kb DNA Ladder); coluna 1: fragmento de DNA recombinante *phoPQ*. Observa-se amplificação de produto inespecífico menor que 250 pb na parte inferior da coluna 1.....31
- Figura 5. Eletroferograma em agarose 1,5%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler, 1 kb DNA Ladder). Colunas 1, 4, 7: SGNal^r; colunas 2, 5, 7: SG $\Delta phoPQ$ com cassete de resistência ao cloranfenicol; colunas 3, 6, 9: SG $\Delta phoPQ$ sem cassete de resistência ao cloranfenicol.....32
- Figura 6. Sinais clínicos observados aos quatro dpi. Aves inoculadas com SG $\Delta phoPQ$ não apresentaram sinais clínicos característicos de tifo aviário (A1 e A2). Nas imagens B1 e B2, é possível observar quadro

característico da doença em aves inoculadas com estirpe selvagem de SG. Nesse caso, os animais estavam apáticos, com sonolência, asas caídas, penas eriçadas e houve redução no consumo de ração e água (B1). Além disso, observou-se fezes diarréicas e de coloração amarelo-esverdeadas (B2).....33

Figura 7. Mortalidade observada aos sete dpi. Aves inoculadas com SG $\Delta phoPQ$ (A) não vieram à óbito. Por outro lado, o grupo de animais desafiados com a estirpe selvagem SG apresentou elevada taxa de mortalidade (B).....34

Figura 8. Aspecto macroscópico de fígado e baço de aves aos quatro dpi. Na metade superior da figura, o fígado na extrema esquerda estava inalterado. Já aves desafiadas com SG $\Delta phoPQ$ e SG, apresentavam congestão hepática discreta e severa, respectivamente. Na metade inferior da figura nota-se que os baços de aves dos grupos C e F estavam inalterados, porém há discreta esplenomegalia em ave do grupo E. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG; Grupo F: Grupo sem infecção.....38

Figura 9. Aspecto macroscópico das aves aos quatro dpi, evidenciando o fígado. Os fígados das aves dos grupos C e F não apresentavam lesões. Contudo, a ave do grupo D apresentava hepatomegalia discreta e congestão severa e o animal desafiado com SG (grupo E) apresentava hepatomegalia e pontos necróticos no órgão. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo D: Infecção por via subcutânea com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG; Grupo F: Grupo sem infecção.....38

Figura 10. Aspectos macroscópicos de aves aos sete dpi evidenciando a bursa de Fabricius e o baço. Órgãos da ave desafiada com SG $\Delta phoPQ$ estava inalterado, enquanto que houve redução severa da bursa de Fabricius e esplenomegalia discreta da ave do grupo E. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG.....39

Figura 11. Aspectos macroscópicos de aves aos sete dpi evidenciando o fígado. Nas aves dos grupos F e C, o órgão estava inalterado. Por outro lado, o fígado da ave do grupo D estava discretamente congestionado e do grupo E estava aumentado, de coloração amarelo-esverdeada ou bronzeada e com pontos necróticos em todo o parênquima. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo D: Infecção por via subcutânea com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG; Grupo F: Grupo sem infecção.....39

Figura 12. Aspectos macroscópicos de aves aos 10 dpi evidenciando o coração (asteriscos) e o fígado (setas). Os órgãos das aves dos grupos F e C estavam inalterados (asteriscos e setas brancas). À direita, os órgãos da ave do grupo E estavam alterados (asterisco e seta pretas), observando-se cardiomegalia, hepatomegalia e congestão hepática. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG; Grupo F: Grupo sem infecção.....40

Figura 13. Contagem de SG $\Delta phoPQ$ inoculada pelas vias oral e subcutânea e SG em amostras de fígado e baço por dia de colheita. Média do número de unidades formadoras de colônia por grama ($\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$) de SG $\Delta phoPQ$ e SG em fígado e baço de aves infectadas experimentalmente aos 20 dias de vida. Aos 10 dpi, havia apenas uma ave remanescente do grupo E (*) e aos 14 dpi, não havia ave no grupo E (**) para colheita de amostras. Letras diferentes por dia de colheita representam resultados estatisticamente significantes ($P < 0,05$).....41

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a avicultura vem conquistando o consumidor e espaço no mercado de proteínas e, para acompanhar a demanda, necessitou-se da tecnificação da indústria avícola. A intensificação da produção resultou no adensamento populacional de aves comerciais, favorecendo a introdução e disseminação nas granjas de micro-organismos patogênicos como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG).

O tifo aviário, enfermidade sistêmica causada por SG, é descrita no Brasil desde os anos de 1950. Nos últimos 15 anos tem sido isolada de forma intensa em plantéis reprodutores de aves para corte e postura e lotes comerciais, acarretando enormes prejuízos decorrentes de mortalidade acentuada, eliminação de lotes de plantéis reprodutores e gastos com vacinas e medicamentos. Assim, os estudos desenvolvidos sobre o tifo aviário têm sido realizados com o propósito de conhecer a enfermidade para melhor combatê-la.

O sistema PhoPQ regula aproximadamente 3 % do genoma bacteriano dos quais 25 % estão relacionados com a patogenicidade, sendo assim considerado um dos sistemas regulatórios mais importantes de *Salmonella* spp. Alguns trabalhos demonstraram que os genes *phoPQ* são necessários para a replicação da bactéria no hospedeiro. Isso ocorre porque após a fagocitose, o macrófago submete o micro-organismo a uma série de fatores que visam eliminá-lo, como redução do pH, peptídeos antimicrobianos e privação de nutrientes. De modo a se proteger, o sistema PhoPQ do patógeno é ativado pela percepção dessas variações, regulando outros genes em resposta a ação antimicrobiana.

Estirpes de *S. Typhi* e *S. Typhimurium* com os genes *phoPQ* inativados não são patogênicos para seres humanos e camundongos, respectivamente. Ambos provocam o quadro tifóide em seus respectivos hospedeiros, assim como SG em aves. Portanto, é possível que ambos os genes sejam necessários para a patogenicidade de SG em aves. Diante dessa hipótese, o presente estudo foi

realizado para avaliar a patogenicidade de mutante de SG com inativação dos genes *phoPQ* (SG Δ *phoPQ*) para aves susceptíveis ao tifo aviário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nomenclatura de *Salmonella* spp.

Em 1886, Salmon e Smith descreveram o primeiro espécime de *Salmonella* spp., isolado de suínos enfermos, porém o identificaram erroneamente como sendo o agente responsável pela peste suína (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Na primeira metade do século XX, White e Kauffmann deram início à classificação de membros do gênero *Salmonella* com base nas estruturas da superfície externa de alguns espécimes (GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000). Este esquema, baseado em provas bioquímicas e caracterização dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) prevalece desde então, com algumas atualizações e tem sido identificado como esquema White-Kauffman-Le Minor (GRIMONT; WEILL, 2007). Em meados de 1980, a nomenclatura de *Salmonella* sofreu diversas adaptações e após análises filogenéticas classificou-se o gênero em duas espécies denominadas *S. enterica* e *S. bongori* (GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000).

Salmonella enterica é subdividida em seis subespécies (subsp.): *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* e *Salmonella enterica* subsp. *indica* (POPOFF; BOCKEMÜHL; HICKMAN-BRENNER, 1997). A nomenclatura atual segue o seguinte formato: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium; embora a sua forma resumida, *Salmonella* Typhimurium, seja comumente utilizada (POPOFF; BOCKEMÜHL; HICKMAN-BRENNER, 1997; GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000).

2.2. Classificação das salmoneloses

Os micro-organismos do gênero *Salmonella* são bactérias Gram-negativas na forma de pequenos bacilos, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas (POPOFF et al., 2001), patógenos intracelulares (MARCUS et al., 2000) e

comumente móveis com flagelos, com exceção dos biovars *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) e *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (SP) (GRIMONT; WEILL, 2007).

Na década de 1970, estavam identificados 1700 sorovares de *Salmonella* (OMS, 1976). Ao final do século passado, este número totalizava 2463 (POPOFF et al., 2001) e, após sete anos, aumentou para 2579 (GRIMONT; WEILL, 2007). Atualmente são conhecidos 2659 sorovares, dos quais 2637 pertencem à espécie *S. enterica* e 22 à *S. bongori* (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Desse total, cerca de 100 sorovares podem infectar tanto seres humanos como animais (CDC, 2016).

Considera-se que *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* divergiram de um ancestral comum entre 100 e 160 milhões de anos atrás (OCHMAN; WILSON, 1987) e o início da interação entre *Salmonella enterica* e hospedeiros vertebrados ocorreu há mais de 10 milhões de anos (GALÁN, 2001). Ao longo de suas evoluções, alguns sorovares se tornaram hospedeiro-específicos, enquanto outros mantiveram a capacidade de acometer diversas espécies (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009), formando uma cadeia epidemiologicamente complexa (ZHANG-BARBER; TURNER; BARROW, 1999).

Há dois quadros infecciosos ocasionados por *Salmonella* spp.: local e sistêmico. O primeiro nem sempre resulta em doença clínica, porém ocorre colonização do trato gastrointestinal por sorovares que infectam múltiplas espécies. Já a infecção sistêmica é provocada por salmonelas que invadem um número restrito de hospedeiros, tais como *Salmonella* Gallinarum (SG) e *Salmonella* Pullorum (SP) em aves, *Salmonella* Typhi (ST) em seres humanos, *Salmonella* Typhimurium (STM) em camundongos e *Salmonella* Dublin em bovinos (BERCHIERI et al., 2001). Em aves, existem três enfermidades causadas por *Salmonella* spp.: a pulorose, cujo agente é SP; o tifo aviário, causado por SG; e o paratifo aviário, causado por qualquer outro sorovar (POPPE, 2000).

2.3. Tifo Aviário

A primeira descrição do tifo aviário ocorreu em 1888, quando um lote de aves estava com elevada taxa de mortalidade e os animais apresentavam diarreia amarelo-esverdeada e lesões como hepatoesplenomegalia. Acreditava-se que se tratava de um surto de cólera aviária, porém durante o exame microbiológico constatou-se que se tratava de outro micro-organismo (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Inicialmente, o agente etiológico do tifo aviário foi denominado *Bacillus gallinarum* e, posteriormente, *Salmonella Gallinarum* (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008). A denominação da enfermidade baseou-se na similaridade com a febre tifóide humana (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Nos anos subsequentes, a enfermidade foi notificada em países europeus, africanos e nos Estados Unidos da América (EUA). Em 1919, ocorreu a primeira descrição da doença em Minas Gerais e depois em São Paulo, em 1939 (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Atualmente, o tifo aviário compõe a Lista B da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) como enfermidade de notificação obrigatória devido ao seu impacto na saúde animal (OIE, 2017).

De modo geral, sua incidência é maior em países emergentes e subdesenvolvidos, pois são regiões onde a avicultura está se intensificando, os galpões abertos são comuns e as medidas sanitárias são menos rígidas (MASTROENI et al., 2000; BARROW; FREITAS NETO, 2011). Mesmo classificado como país emergente, o Brasil é um dos líderes em produção e exportação do setor (MOTTET; TEMPIO, 2017), mas para atingir números expressivos no mercado mundial foi necessário normatizar rigorosas ações de acompanhamento sanitário dos lotes avícolas. Para isso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) elaborou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) em 1994 (BRASIL, 1994).

Dentre as normas que envolvem o monitoramento e controle do tifo aviário, desde novembro de 2003 está em vigor a Instrução Normativa nº 78 a qual define que SG em lotes de aves reprodutoras é patógeno de notificação obrigatória junto ao

Serviço Veterinário Oficial (SVO) e, caso a doença esteja presente, os animais do núcleo serão abatidos e os ovos eliminados (BRASIL, 2003).

Recentemente, foi publicada a Instrução Normativa nº 8 em 17 de fevereiro de 2017 (BRASIL, 2017) que, ao alterar a Instrução Normativa nº 10, de 11 de abril de 2013 (BRASIL, 2013), aplica medidas mais rígidas de biossegurança em granjas de corte ou postura comercial. É exigida a instalação de telas de isolamento nos galpões e fica proibido o alojamento de novas aves em galpões sem essa adequação após 540 dias da publicação dessa Instrução Normativa (BRASIL, 2017). Exclui-se dessa proibição sistemas de criação ao ar livre com piquetes sem telas na parte superior, desde que mantenham alimentação e água de bebida em instalações providas de proteção ao ambiente externo (BRASIL, 2017). Em núcleos positivos para SG, as camas e o esterco devem removidos e descartados após serem submetidos a tratamento capaz de inativar o patógeno (BRASIL, 2017). Posteriormente, deverá ser realizada a limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos para, em seguida, adotar vazio sanitário de no mínimo 15 dias (BRASIL, 2017). Ademais, serão investigadas a fonte de infecção e as vias de transmissão, além da adoção de um plano de ação para prevenção de novas infecções (BRASIL, 2017).

Já em plantéis comerciais de perus e frangos de corte não adequados aos procedimentos de registro (BRASIL, 2017), a Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016, define que o controle de SG em lotes positivos deve ser por meio da limpeza e desinfecção do aviário após a remoção e descarte de toda a cama e a emissão do Guia de Trânsito Animal (GTA) será exclusivamente para o abate dos animais ao final do ciclo (BRASIL, 2016).

Apesar da implementação de uma série de medidas de biossegurança, a ausência de notificações da enfermidade tem dificultado o monitoramento e controle de SG no território brasileiro. Nos últimos doze anos foram registrados 121 surtos de tifo aviário no país. Contudo, há períodos em que a enfermidade estava presente nos plantéis, mas sem dados quantitativos sobre sua incidência (OIE, 2016). Apesar disso, a incidência é menor quando comparada com a China, país emergente e uma das principais potências avícolas mundiais. Nesse caso, as autoridades chinesas notificaram 988 surtos da doença em cinco anos (2010 - 2015) (OIE, 2016).A

ocorrência de surtos pode ser devido a falhas de monitoramento e prevenção como, por exemplo, inadequadas limpeza e sanitização de estruturas, falta de higiene corporal de funcionários e acesso de aves silvestres e pragas nos galpões (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A transmissão horizontal é a via de disseminação do patógeno (BERCHIERI et al., 2001; BARROW; FREITAS NETO, 2011; CELIS-ESTUPIÑAN et al. , 2017). Dessa forma, durante o ato de canibalismo, prática comum entre aves domésticas, aves sadias se infectam quando se alimentam dos restos de aves mortas pelo tifo aviário (FREITAS NETO et al., 2007; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Assim, a retirada da carcaça do animal logo após sua morte reduz a disseminação de SG (OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005).

Aves de linhagem leve são mais resistentes ao tifo aviário do que as de linhagens semipesada e pesada. Mesmo que o animal não sucumba à doença, o patógeno pode persistir em seus tecidos por algumas semanas (OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005; FREITAS NETO et al., 2007). SG pode infectar aves de qualquer idade, porém a doença é comumente descrita em animais adultos (POPPE, 2000; BERCHIERI JUNIOR et al., 2001; FREITAS NETO; BARROW, 2007; SHIVAPRASAD; BARROW, 2008).

O desenvolvimento e a gravidade da enfermidade dependem de diversas variáveis como a quantidade de bactéria ingerida pelo animal, da linhagem das aves, manejo nutricional e o nível de estresse em que se encontram (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008). Em um quadro típico de aves infectadas por SG podem ser observados apatia, prostração, sonolência, asas caídas, diarreia amarelo-esverdeada, desidratação e redução no consumo de ração (FREITAS NETO et al., 2007; GARCIA et al., 2013). Na fase final da doença, a bactéria se dissemina pelo organismo da ave e, posteriormente, evolui para óbito (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

O início da mortalidade geralmente ocorre entre o quinto e o sétimo dias pós-infecção (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009), mas há casos mais agudos da doença em que se inicia ao quarto dia pós-infecção (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008). Ainda assim, a taxa de mortalidade varia de acordo com as condições

sanitárias da granja, podendo ser de 10 a 80 % (FREITAS NETO et al., 2007; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Ao realizar exames necroscópicos, os achados anatomopatológicos comumente observados são hepatoesplenomegalia de três a quatro vezes com presença de pontos necróticos esbranquiçados, fígado congesto, friável e de coloração amarelo-esverdeado (FREITAS NETO et al., 2007; SHIVAPRASAD; BARROW, 2008). Também pode ocorrer peritonite e perihepatite fibrinosa, pericardite, hidropericárdio, pontos necróticos esbranquiçados no coração e atrofia e congestão de folículos ovarianos (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Para o diagnóstico laboratorial, preconiza-se a colheita de fragmentos de órgãos de cinco aves doentes por galpão com sinais clínicos compatíveis com o tifo aviário (BRASIL, 2013). Vale ressaltar que os animais não devem estar sob efeito de agentes antimicrobianos contra bactérias Gram-negativos (BRASIL, 2013) visto que sua administração pode atrapalhar a conclusão do diagnóstico (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Assim, as amostras devem ser acondicionadas da seguinte forma: um *pool* contendo cinco amostras de fígado e de baço, outro *pool* com cinco cecos juntamente com suas respectivas tonsilas cecais e, por último, um terceiro *pool* contendo ovários caso presentes na ave (BRASIL, 2013).

Após a colheita, as amostras devem ser enviadas sob refrigeração para o laboratório em no máximo 48 horas (BRASIL, 2013). Para o diagnóstico laboratorial oficial podem ser utilizadas técnicas como isolamento em meio de cultura, identificação antigênica e métodos moleculares (BRASIL, 2017). Devido a similaridade antigênica, os biovares SG e SP podem ser diferenciados por provas bioquímicas, embora existam estirpes atípicas (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Dessa forma, a diferenciação pode ser complementada com métodos moleculares por meio da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) como PCR-RFLP (PCR associada ao Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) (PARK et al., 2001), PCR convencional (BATISTA et al., 2016) e PCR em tempo real (RUBIO et al., 2017).

Além de influenciar no diagnóstico gerando um resultado incerto, a antibioticoterapia não é eficaz contra o tifo aviário. Apesar de reduzir a mortalidade,

o animal continua portador de SG e, uma vez suspensa a administração do fármaco, os óbitos voltam a ocorrer (BARROW; FREITAS NETO, 2011; CELIS-ESTUPIÑAN et al., 2017). Assim, a prevenção por meio de medidas de biossegurança é o melhor método contra o tifo aviário (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

2.4. Patogenia e Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI)

Os estudos sobre a patogenia de *Salmonella* spp. são mais aprofundados em sorovares que infectam seres humanos, sendo mais limitados em aves (FOLEY et al., 2013). O curso infeccioso das salmoneloses aviárias é influenciado pelo sorovar causador da enfermidade, a idade do animal, a linhagem da ave e se houve exposição prévia a alguma salmonela (SMITH; BEAL, 2008).

O desenvolvimento da doença depende da expressão dos chamados fatores de virulência (MARCUS et al., 2000) que podem estar codificados no genoma bacteriano ou associados a elementos genéticos móveis, tais como os plasmídios (SCHMIDT; HENSEL, 2004). Quando no genoma, a maioria está localizada nas Ilhas de Patogenicidade que são em aglomerados gênicos presentes somente em micro-organismos patogênicos (WORLEY; CHING; HEFFRON, 2000; SHIMIDT; HENSEL, 2004). Em *Salmonella* spp., essas regiões são denominadas Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI) (MARCUS, 2000) e várias já foram identificadas, sendo as cinco primeiras, SPI-1 a SPI-5, as mais estudadas (Tabela 1) (MARCUS, 2000; RYCHLIK et al., 2009).

Tabela 1. Característica, funções e conservação das Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* spp. mais estudadas.

Ilha de patogenicidade	Características / Funções	Análise genômica <i>in silico</i>			
		ST	STM	SE	SG
SPI-1	TTSS; Invasão do epitélio intestinal: não é necessário para invasão de SG; Proteínas efetoras; genes regulatórios	+	+	+	+
SPI-2	TTSS; Necessário para invasão de SG; Proteínas efetoras; Inibe fusão entre lisossomo e SCV; Auxilia na replicação bacteriana no interior de macrófagos	+	+	+	+
SPI-3	Sobrevivência no interior de macrófagos; Transporte de magnésio	+	+	+	+
SPI-4	T1SS; Colonização intestinal	+	+	+	+
SPI-5	Codifica proteínas efetoras secretadas por ambos TTSS	+	+	+	+

TTSS: Sistema de Secreção do Tipo III; **SCV:** Vacúolo contendo *Salmonella*; **T1SS:** Sistema de Secreção do Tipo I; +: SPI presente; **ST:** S. Typhi; **STM:** S. Typhimurium; **SE:** S. Enteritidis; **SG:** S. Gallinarum. Adaptado de Jones et al. (2001); Kingsley; Bäumlér (2002); Helaine et al. (2010); Fooks et al. (2011); Hurley et al. (2014); Pontes; Yeom; Groisman (2016).

Após adentrar no hospedeiro, barreiras físico-químicas (CHOWDHURY; SAHU; DAS, 1996) podem conter o processo patogênico por meio de fatores estressantes à bactéria (CLEMENTS et al., 2001), tais como: aumento de temperatura, baixo pH do estômago, efeito antimicrobiano da bile, peptídeos catiônicos antimicrobianos, entre outros (RYCHLIK; BARROW, 2005).

Para transpor esses obstáculos, a adaptação de *Salmonella* spp. é crucial. A bactéria deve identificar essas alterações físico-químicas e ativar genes de virulência cujos produtos são essenciais durante o processo de invasão, sobrevivência e replicação (DORMAN et al., 1989; CHOWDHURY; SAHU; DAS, 1996; FORSHELL; WIERUP, 2006). Algumas das proteínas envolvidas na invasão do hospedeiro, principalmente aquelas acionadas no primeiro contato, podem se tornar alvos do sistema imune (FORSHELL; WIERUP, 2006).

A porta de entrada de *Salmonella* spp. é a via oral (FOLEY et al., 2013). Após ser ingerido, o patógeno atingirá o estômago da ave e será submetido a uma queda brusca de pH (FOLEY et al., 2013). Assim, ao detectar essa variação, a bactéria ativar um complexo sistema adaptativo denominado Resposta de Tolerância ao Ácido (*Acid Tolerance Response* – ATR) (BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998; FOLEY et al., 2013) que resultará na produção de aproximadamente 50 proteínas de choque-ácido (BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998). Dentre elas, haverá a

expressão dos sistemas regulatórios PhoPQ e RpoS que auxiliam na proteção contra o ácido inorgânico estomacal (BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998).

Após se adaptarem e sobreviverem ao ambiente hostil estomacal, as bactérias o lúmen intestinal (FOLEY et al., 2013), principalmente o íleo distal e os cecos da ave (ALLEN-VERCOW; WOODWARD, 1999; BARROW; FREITAS NETO, 2011). À partir desse momento, haverá três fases de interações com o sistema imune do hospedeiro: com o epitélio intestinal, propagação bacteriana sistêmica por meio da infecção intracelular de macrófagos e desenvolvimento de resposta imune contra a bactéria (CHAPPELL et al., 2009). Nessa última etapa, podem ocorrer três situações possíveis com o animal: sobreviver e eliminar o patógeno por meio do sistema imune, sobreviver e se tornar portador sub-clínico ou não desenvolver resposta imune eficaz e vir a óbito (CHAPPELL et al., 2009).

Salmonella spp. possui antígenos denominados Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) que direcionam a ação do sistema imune contra a bactéria, tais como o lipopolissacarídeo (LPS), o antígeno capsular (Vi), os flagelos, as fímbrias e as proteínas de membrana externa (MASTROENI, 2002). Os flagelos são reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro quando a bactéria atinge o lúmen intestinal, desencadeando a produção de interleucinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, de imunoglobulina A (IgA). Além disso, atrai para a mucosa outras células como heterófilos, macrófagos e linfócitos (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Diferentemente de salmonelas que provocam o paratifo aviário, SG pouco coloniza o intestino das aves (SETTA et al., 2012; RYCHLIK, ELSHEIMER-MATULOVA, KYROVA; 2014) e, por ser aflagelar, provoca pobre resposta imune inata intestinal devido a baixa produção de interleucinas pró-inflamatórias, como a IL-6 (KAISER et al., 2000). Esse mecanismo possibilita a invasão sistêmica através dos Tecidos Linfóides Associados ao Intestino (GALT), como placas de Peyer e tonsilas cecais, cuja composição é rica em linfócitos B e T, heterófilos, macrófagos, células dendríticas e células Natural Killer (NK) (SMITH; BEAL, 2008).

Ao analisar a expressão de genes das SPI-1 a SPI-4 dos sorovares paratíficos aviários *S. Typhimurium* (STM), *S. Infantis* (SI), *S. Enteritidis* (SE) e *S. Hadar* (SH), Imre e colaboradores (2013) notaram que as SPI-1 e SPI-4 são

essenciais para a invasão epitelial, porém para a sobrevivência intra-macrófaos esse papel seria realizado por genes codificados nas SPI-2 e SPI-3.

A SPI-1 é essencial para SE colonizar o baço e o fígado de aves (DESIN et al., 2009), mas para SG sua deleção não impede a invasão celular e a doença sistêmica (JONES et al., 2001). O início da infecção sistêmica ocorre após a fagocitose da bactéria pelas células do sistema reticuloendotelial, sendo interiorizada em fagossomo modificado delimitado por membrana, denominado Vacúolo Contendo *Salmonella* (SCV – “*Salmonella-containing vacuole*”) (WATERMAN; HOLDEN, 2003). *S. Typhimurium* se aloja individualmente no SCV e, mesmo após sua replicação, haverá apenas uma bactéria por compartimento vacuolar (ESWARAPPA et al., 2010; THOMPSON et al., 2011). Essa individualização é vantajosa ao micro-organismo por dois motivos. O primeiro é por reduzir a competição pelo pouco nutriente presente no interior do SCV, o que dificultaria a replicação caso houvesse mais bactérias por vacúolo. A segunda vantagem é que, ao se replicar, o metabolismo da célula hospedeira que seria utilizado para a biogênese de lisossomos é direcionado para estruturar novos SCVs. Dessa forma, os poucos lisossomos produzidos, cuja ação é individual sobre cada SCV, favorece a perpetuação do patógeno na célula hospedeira (ESWARAPPA et al., 2010).

Diferente dos fagolisossomos clássicos, os SCVs apresentam atividade antimicrobiana reduzida e ambiente menos ácido (ERIKSSON et al., 2003). Nos fagócitos ativados, um dos mecanismos para eliminar o patógeno é a explosão oxidativa (“*oxidative burst*”) por meio da produção de óxido nítrico e formas reativas de oxigênio. Nesses macrófaos ainda há ação de peptídeos antimicrobianos e queda brusca de pH para próximo a 4 ou 5 (FOSTER; HALL, 1990; RATHMAN et al., 1996; ERNST; GUINA; MILLER, 1999). Para sobreviver nesse ambiente, *Salmonella* spp. dispõe de diversos mecanismos adaptativos (FOSTER; HALL, 1990; ERNST; GUINA; MILLER, 1999).

Após ser vacuolizada, a bactéria expressa o Sistema de Secreção do Tipo Três (*Type Three Secretion System* – TTSS) da SPI-2 (TTSS-2) (WATERMAN; HOLDEN, 2003). O TTSS-2 é organizado em quatro *operons* principais: regulatório, estrutural-1, efector/chaperone e estrutural-2 (OSBORNE; COOMBES, 2011). Algumas de suas proteínas estruturais são reguladas por PhoPQ (BIJLSMA;

GROISMAN, 2005; OSBORNE; CROOMBES, 2011) e formam um aparato semelhante a uma agulha capaz de secretar proteínas efetoras no citosol da célula hospedeira (UCHIYA et al., 1999; BIJLSMA; GROISMAN, 2005; OSBORNE; CROOMBES, 2011). Suas funções principais são proteger o micro-organismo contra a citotoxicidade dos macrófagos (WATERMAN; HOLDEN, 2003; SCHMIDT; HENSEL, 2004) e viabilizar a replicação bacteriana no SCV (HELAINÉ et al., 2010).

Cada proteína efetora secretada pelo TTSS-2 pode desempenhar uma função de proteção diferente, que variam desde impedir a fusão do lisossomo ao SCV que resultaria no fagolisossomo (UCHIYA et al., 1999) até manter a integridade da membrana do vacúolo durante a replicação intracelular bacteriana (SCHMIDT; HENSEL, 2004). Estudos recentes demonstram que evitar a fusão não é papel desempenhado exclusivamente pelo aparato, uma vez que outros mecanismos podem realizar essa função (THOMPSON et al., 2011). Também foi demonstrando que até 12 horas após a captação da bactéria pelo macrófago o TTSS-2 não contribui significativamente para evitar os mecanismos de morte celular (HELAINÉ et al., 2010). Sendo assim, o sistema de secreção está mais envolvido na replicação bacteriana no interior do SCV do que com sua sobrevivência (HELAINÉ et al., 2010).

Recentemente, foi demonstrado que *Salmonella* Typhimurium promove o recrutamento de Quinase de Adesão Focal (*Focal Adhesion Kinase* – FAK) para a superfície do SCV (OWEN et al, 2014) por meio do aparato da SPI-2 (OWEN; ANDERSON; CASANOVA, 2016). Isso permite que o processo de autofagia seja suprimido, o que resulta na inibição da resposta para a produção de *Interferon*-Beta (IFN- β), posterior falha no recrutamento de células NK e, conseqüentemente, na falta de *Interferon*-Gama (IFN- γ) (OWEN; ANDERSON; CASANOVA, 2016). Dessa forma, uma vez que são ativados por IFN- γ , não há aumento da atividade antimicrobiana dos fagócitos locais e nem a expressão das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 que recrutariam células adicionais do sistema imune inato, como os neutrófilos e monócitos. Assim, a bactéria consegue sobreviver e se disseminar no organismo hospedeiro (OWEN; ANDERSON; CASANOVA, 2016).

Além da SPI-2, genes da Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* – 3 (SPI-3) também são ativados no interior de macrófagos devido à acidificação do meio e a baixa concentração de Mg²⁺. De modo a aumentar a captação desse cátion para seu

citossol, a bactéria expressa diversos genes dessa SPI (BLANC-PORTARD et al., 1999; LEE; GROISMAN, 2012). Fisiologicamente, a homeostase de Mg^{2+} é necessária para a estabilidade de membranas e ribossomos, além promover diversas reações enzimáticas (GROISMAN et al., 2013).

Após a interiorização nos macrófagos, estes são direcionados para o fígado e o baço (JONES et al., 2001; SMITH; BEAL, 2008; CHAPPELL et al., 2009). Caso o organismo não controle o patógeno por meio do sistema imune inato, a bactéria sobreviverá e se replicará no interior das vesículas das células do sistema reticuloendotelial (WORLEY; CHING; HEFFRON, 2000; JONES et al., 2001; SCHMIDT; HENSEL, 2004), causando lesões severas nesses órgãos e quadro de hepatoesplenomegalia (JONES et al., 2001; SMITH; BEAL, 2008; CHAPPELL et al., 2009).

O *clearance* de SG é mediado pela resposta celular, por meio da proliferação de linfócitos T antígeno-específico (WIGLEY et al., 2005). Por outro lado, a ação dos anticorpos está mais relacionada com a proteção durante reinfecções (CHAPPELL et al., 2009). Quando a resposta imune não consegue eliminar todas as células bacterianas, um pequeno número delas persiste intracelularmente e torna o hospedeiro portador. SP consegue persistir no hospedeiro por vários meses, enquanto que a presença de salmonelas paratíficas é transitória e inexistente na infecção por SG (BERCHIERI JUNIOR et al., 2001; PINHEIRO; OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR, 2001; CHAPPELL et al., 2009).

2.5. Importância dos genes *phoP* e *phoQ* para *Salmonella* spp.

Durante a infecção por *S. enterica*, o hospedeiro utiliza mecanismos para eliminar o patógeno. De modo à sobreviver sob essas condições, as proteínas de percepção de mudanças micro-ambientais da bactéria devem ser ativadas (CLEMENTS et al., 2001). Para isso, sistemas protéicos regulam genes que geram ou reprimem produtos essenciais para a adaptação e invasão do patógeno (DORMAN et al., 1989; FORSHELL; WIERUP, 2006).

Em 1979, o gene *phoP* foi identificado em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium e recebeu tal nomenclatura devido ao seu envolvimento no

metabolismo do fosfato (KIER; WEPPELMAN; AMES, 1979). Ortólogos desse gene também foram encontrados em outros membros da Família Enterobacteriaceae (GROISMAN et al., 1989).

Os genes *phoPQ* codificam um dos mais bem descritos e importantes *regulons* das bactérias entéricas (GROISMAN, 2001), o sistema pleiotrópico regulatório de dois componentes PhoPQ (MILLER; KUKRAL; MEKALANOS, 1989; SONCINI; VÉSCOVI; GROISMAN, 1995). O sistema responde a alterações ambientais e interage com outros sistemas regulatórios de modo a integrarem sinais múltiplos em uma resposta celular coordenada (Figura 1) (GROISMAN, 2001). Aproximadamente 3 % do genoma de *Salmonella* é controlado pelos genes PhoPQ (GROISMAN, 2001) e desses, 25 % estão relacionados com a patogenicidade da bactéria (VÉSCOVI; SONCINI; GROISMAN, 1994). Dessa forma, o sistema pode ativar ou reprimir cerca de 40 genes simultaneamente (GUO et al., 1997).

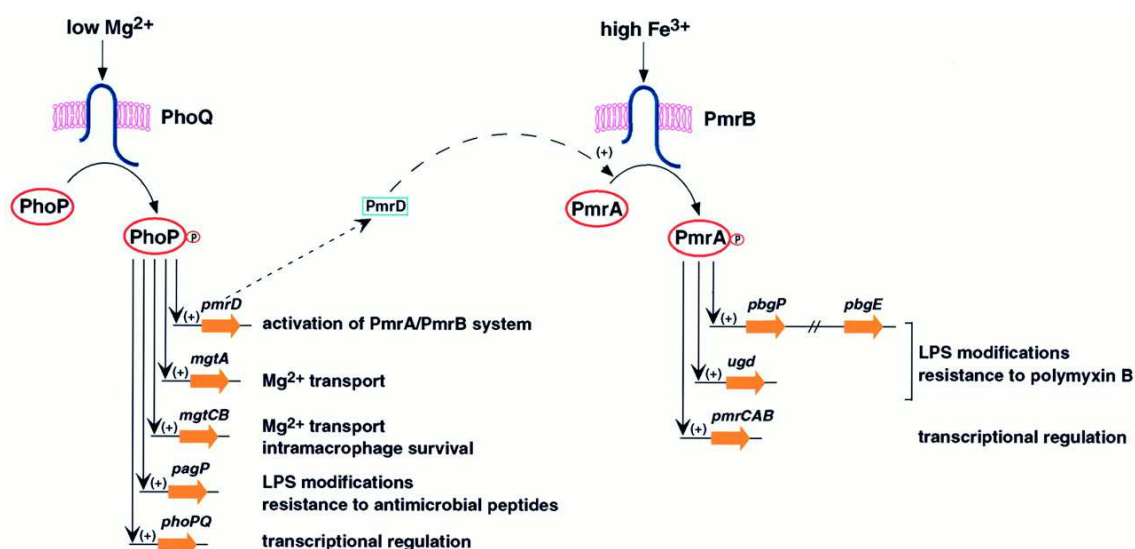


Figura 1. Exemplo da rede de interação entre o sistema regulatório pleiotrópico de dois componentes PhoPQ e outro sistema regulatório. Adaptado de Groisman (2001).

Constituído pelo sensor de membrana interna, a proteína quinase PhoQ e pelo regulador citoplasmático PhoP (SONCINI; VÉSCOVI; GROISMAN, 1995; GROISMAN, 2001), o sistema é ativado por variações extracitoplasmáticas de pH, redução das concentrações de cátions bivalentes, como Mg^{2+} (VÉSCOVI; SONCINI; GROISMAN, 1996; BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998; CLEMENTS et al., 2001; GROISMAN, 2001; PROST et al., 2007), e pela presença de peptídeos antimicrobianos (PROST et al., 2007; LEE; GROISMAN, 2012).

A ação desses fatores pode ser individual ou em conjunto. No primeiro caso, em estudo realizado *in vitro* com *S. Typhimurium* foi relatado que, em macrófagos, a ativação de PhoQ pode ser estimulada por peptídeos antimicrobianos apenas (HICKS et al., 2015). Contudo, a ação conjunta potencializa a sinalização. Como exemplo, os peptídeos antimicrobianos permeabilizam a membrana externa de modo a permitir a redução do pH periplasmático em nível semelhante ao do macrófago (PROST et al., 2007).

Quando o micro-organismo é exposto a agentes antimicrobianos do hospedeiro, a proteína PhoQ tem alterada a sua conformação, se autofosforila e, na sequência, fosforila PhoP (PROST et al., 2007). Por sua vez, PhoP transferirá o fosfato a uma proteína específica ligante de DNA (ALPUCHE ARANDA et al., 1992), iniciando a transcrição de genes cujas proteínas expressam os fenótipos dependentes de PhoP (GROISMAN; KAYSER; SONCINI, 1997).

Salmonella spp. não tolera pH inferior a 3,0 e sua replicação ocorre em pH próximo à neutralidade (GORDEN; SMALL, 1993). A Resposta de Tolerância ao Ácido (ATR) ocorre em situações em que há gradiente de acidificação, necessitando da ativação dos sistemas OmpR, RpoS, Fur e PhoPQ (BEARSON; BEARSON; FOSTER, 1997; CLEMENTS et al., 2001). O mecanismo de PhoPQ amplifica a tolerância frente ao pH mais acidificado (ALPUCHE ARANDA et al., 1992; BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998; GROISMAN, 2001). Ao deletar *phoP*, a bactéria se torna 1000 vezes mais sensível ao pH ácido do que a estirpe selvagem (FOSTER; HALL, 1990).

Durante a infecção sistêmica a bactéria é interiorizada em macrófagos e o sistema PhoPQ controla a expressão do aparato da TTSS da SPI-2 (TTSS-2) cuja função é exportar proteínas efetoras essenciais para a sobrevivência e, principalmente, replicação bacteriana no interior de macrófagos (UCHIYA et al., 1999; BIJLSMA; GROISMAN, 2005; THOMPSON et al., 2011). A inativação de *phoP* reduziu a transcrição de todos os seis promotores (*ssrA*, *ssaB*, *sseA*, *ssaG*, *ssaM* e *ssaR*) que controlam os *operons* presentes na SPI-2 que reguladores da transcrição do TTSS-2 (OSBORNE; COOMBES, 2011).

No meio extracelular, há íons magnésio (Mg^{2+}) suficientes para se ligarem ao domínio periplasmático de PhoQ, resultando em pouca proteína PhoP fosforilada. Já

no interior dos macrófagos a concentração desse cátion é reduzida, o que altera a conformação de PhoQ (GROISMAN, 2001) e inicia a transcrição de genes ativados por PhoP (PhoP *activated-genes* – *pag*) (VÉSCOVI; SONCINI; GROISMAN, 1996; GROISMAN, 2001). Os próprios genes *phoPQ* são *pag*, o que resulta em *feedback* positivo, amplificando a resposta e a sobrevivência e replicação no interior dos macrófagos (MILLER; MEKALANOS, 1990). Concomitantemente, genes previamente relacionados com a invasão bacteriana são reprimidos (PhoP *repressed-genes* – *prg*) (Figura 2) (VÉSCOVI; SONCINI; GROISMAN, 1996).

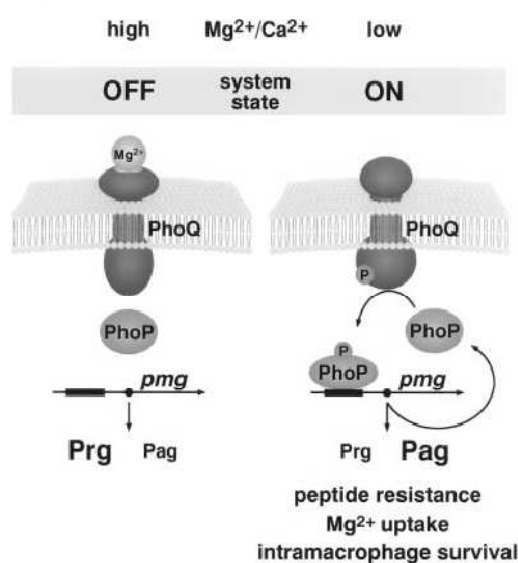


Figura 2. Modelo de regulação de PhoPQ em situações com concentrações diferentes de cátions bivalentes. Adaptado de Véscovi; Soncini; Groisman (1996).

A sobrevivência da bactéria no interior de macrófagos também é dependente do *operon mgtCBR* que está codificado na SPI-3 (VÉSCOVI; SONCINI; GROISMAN, 1996; BLANC-POTARD et al., 1999; LEE; GROISMAN, 2012). Sua expressão é controlada por PhoPQ quando o patógeno se encontra em meio acidificado e com baixa concentração de Mg^{2+} , como no caso dos macrófagos (LEE; GROISMAN, 2012; LEE; LEE, 2015).

Ao adentrar no SCV, o transporte de Mg^{2+} para o citoplasma bacteriano é mediado pela proteína CorA. Contudo, a baixa concentração desse cátion ativa PhoPQ e o transporte passa a ser realizado por MgtB (GROISMAN et al., 2013). Concomitantemente, o pH ácido do vacúolo resulta em gradiente de prótons (H^+) para o citosol do micro-organismo através da membrana interna, aumentando a

produção de Trifosfato de Adenosina (ATP) (LEE; GROISMAN, 2012). Devido à alta afinidade entre ATP e Mg^{2+} , a concentração citosólica do primeiro deve ser mantida a níveis fisiológicos de modo a tornar os poucos íons de Mg^{2+} disponíveis para ativar a montagem de ribossomos funcionais que promovem a transcrição gênica (PONTES; YEOM; GROISMAN, 2016). Para isso, o controle da síntese de ATP é mediado pela proteína MgtC que se liga e inibe a ação da F_1F_0 ATP sintetase (LEE; PONTES; GROISMAN, 2013).

Em meio contendo baixa concentração de Mg^{2+} , no citosol de *Salmonella* Typhimurium haverá elevadas quantidades desse íon e de ribossomos funcionais, havendo altas taxas de transcrição de genes. À medida que há o consumo de Mg^{2+} , ocorrerá redução de ribossomos funcionais e, conseqüentemente, da taxa de transcrição (PONTES; YEOM; GROISMAN, 2016). Ao inativar o gene *phoP* de *S. Typhimurium*, observou-se que a estirpe foi incapaz de reduzir os níveis de ATP por não transcrever o operon *mgtCBR*. Assim, parte do pouco Mg^{2+} presente no citosol se liga ao ATP, havendo acúmulo de subunidades disfuncionais de ribossomos e redução de ribossomos funcionais (Figura 3) (PONTES; YEOM; GROISMAN, 2016).

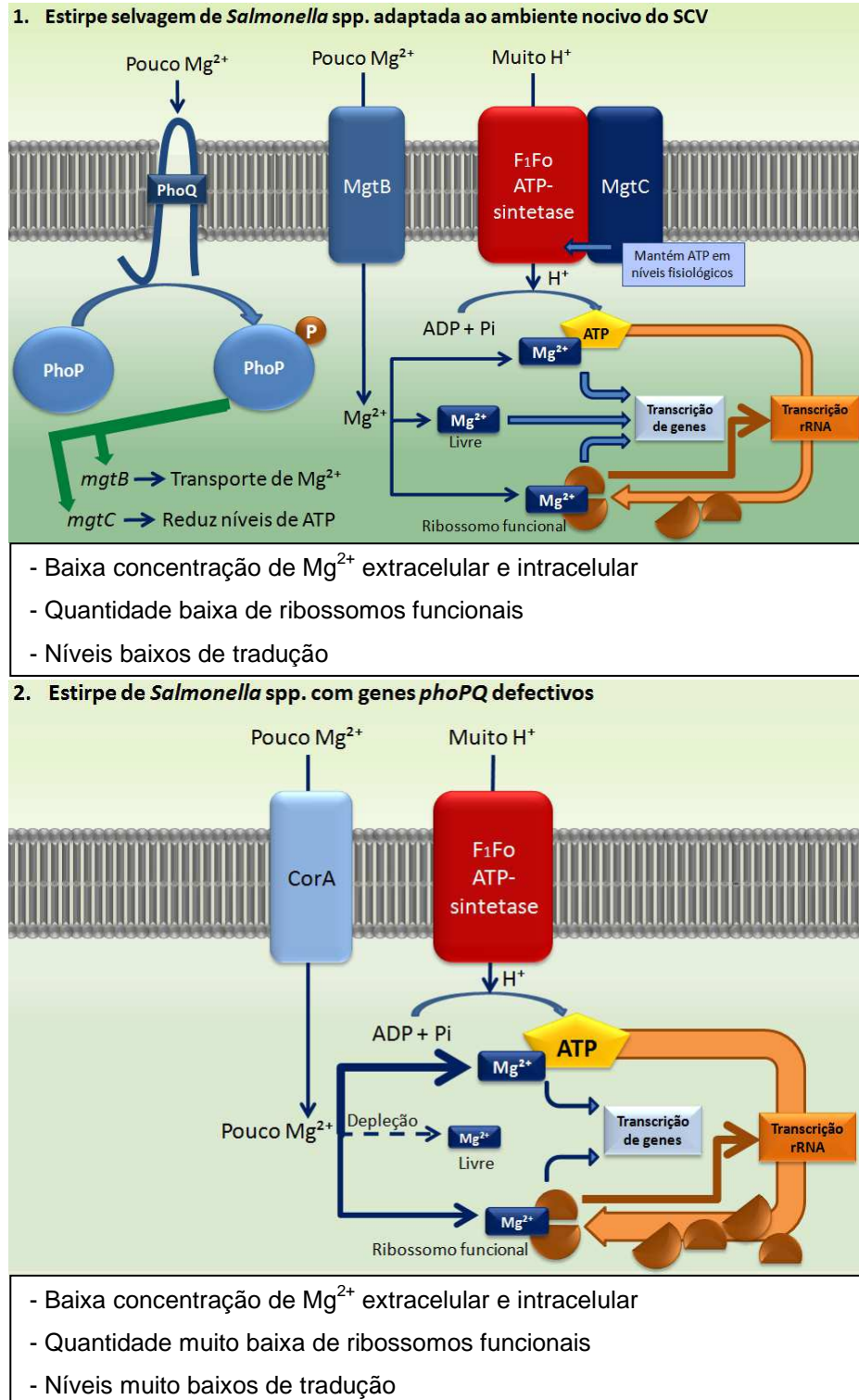


Figura 3. Comparação da capacidade de adaptação ao ambiente ácido e com pouco magnésio do SCV entre a estirpe selvagem de *Salmonella* spp. (1) com a estirpe contendo sistema PhoPQ defectivo (2). ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; H^+ : hidrônio; Mg^{2+} : cátion magnésio; Pi: fósforo inorgânico; rRNA: RNA ribossomal; SCV: Vácuolo contendo *Salmonella*. Adaptado de Lee; Groisman (2012), Groisman et al. (2013), Lee; Pontes; Groisman (2013), Pontes; Yeom; Groisman (2016).

Outro mecanismo do hospedeiro que controla o patógeno é a ação de peptídeos antimicrobianos catiônicos que atuam na membrana bacteriana (FIELDS; GROISMAN; HEFFRON, 1989; VÉSCOVI; SONCINI; GROISMAN, 1994; GUNN; MILLER, 1996; ERNST; GUINA; MILLER, 1999). Para se proteger, o micro-organismo altera a composição de suas superfícies evitando interações eletrostáticas com os peptídeos antimicrobianos catiônicos (ERNST; GUINA; MILLER, 1999).

A modificação é intermediada por alguns *pag* que alteram a composição do lipídeo A do LPS bacteriano por meio da troca do miristato pelo 2-hidroximiristato e da adição de palmitato e aminoarabinose à estrutura (ERNST; GUINA; MILLER, 1999). Essas modificações no LPS são mediadas por PhoPQ que, em ambientes com pouco Mg^{2+} , é ativado e inicia a transcrição do gene *pmrD* (GROISMAN, 2001), cuja função é ativar o sistema regulatório PmrA/PmrB. A queda do pH extracitoplasmático também resulta no acionamento do sistema PmrA/PmrB que, por sua vez, expressa o gene *pmrE*. O produto oriundo é uma enzima envolvida na produção de aminoarabinose (ERNST; GUINA; MILLER, 1999) e a adição desse composto ao LPS promove a resistência ao peptídeo antimicrobiano polimixina (GROISMAN; KAYSER; SONCINI, 1997; ERNST; GUINA; MILLER, 1999).

PhoPQ regula o gene *pagP* para expressar a proteína de membrana PagP de modo a incorporar o palmitato ao LPS, tornando o patógeno resistente a peptídeos catiônicos antimicrobianos de α -hélice (ERNST; GUINA; MILLER, 1999; GROISMAN, 2001). Estirpes com genes *phoPQ* inativados são até 1000 vezes mais susceptíveis aos peptídeos antimicrobianos (VÉSCOVI; SONCINI; GROISMAN, 1996; WÖSTEN et al., 2000).

Desde o final da década de 1970, diversos estudos demonstraram que o sistema regulatório PhoPQ defectivo compromete a regulação de genes essenciais para a virulência de *Salmonella* spp., resultando em sua atenuação (KIER; WEPPELMAN; AMES, 1979; MILLER; KUKRAL; MEKALANOS, 1989; CURTISS III; KELLY; HASSAN, 1993; SONCINI; VÉSCOVI; GROISMAN, 1995). Contudo, pouco se sabe sobre sua importância em sorovares que infectam aves. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a importância dos genes *phoPQ* para a patogenicidade de *Salmonella Gallinarum*.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a importância dos genes *phoPQ* na patogenicidade de *Salmonella Gallinarum* em aves susceptíveis de postura comercial.

3.2. Específicos

- Construir a estirpe mutante de SG com deleção dos genes *phoPQ* (SG Δ *phoPQ*).
- Avaliar a patogenicidade de SG Δ *phoPQ* em comparação com a estirpe selvagem em aves susceptíveis.
- Avaliar a infecção sistêmica de SG Δ *phoPQ* pelas vias oral e subcutânea em aves susceptíveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Instalações experimentais

Os experimentos foram realizados nas instalações do setor de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp), câmpus de Jaboticabal.

4.2. Estirpes bacterianas utilizadas no estudo

A estirpe *Salmonella Gallinarum* 287/91 (SG 287/91), resistente ao ácido nalidíxico na concentração de 100 µg/mL (SGNaI^r), foi utilizada como controle positivo da infecção (SG) e forneceu a base genética para a construção do mutante SG Δ *phoPQ*. Sua escolha se dá pela conhecida patogenicidade (FREITAS NETO et al., 2013) e pela disponibilidade do genoma completamente sequenciado na base de dados do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI – Genbank ID: AM933173.1).

A estirpe mutante desenvolvida no presente estudo e SGNaI^r foram inoculadas em ágar lisogenia (LB; Difco™ LB Agar Lennox, 240110, Sparks, Nevada, US) e incubadas a 37 °C por 24 horas. A colônia obtida foi levemente tocada com auxílio de alça bacteriológica estéril e transferida para criotubo contendo 1 mL de caldo LB suplementado com 30 % de glicerol (Glicerina PA 87%, MERCK) e armazenada a -80 °C.

4.3. Construção da estirpe mutante

A metodologia de mutagênese utilizada no presente estudo foi a técnica *Lambda-Red* (DATSENKO; WANNER, 2000). Os plasmídios utilizados foram extraídos da estirpe *Escherichia coli* DH5 α com auxílio do *kit* comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Austrália). A primeira etapa no processo de mutagênese

consiste em tornar a bactéria competente para recombinação de fragmentos de DNA. Para isso, o plasmídio pKD46 contendo resistência a ampicilina (Amp^r) foi inserido em SGNal^r por meio de eletroporação utilizando o aparelho Gene Pulser Xcell (BIO-RAD).

Após a inserção, os genes γ , β e *exo* do sistema *red* do plasmídio são expressos e tornam a bactéria competente para recombinação (DATSENKO; WANNER, 2000). Para confirmar se houve a inserção, o caldo foi semeado em ágar LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a placa incubada a 28 °C por 24 horas. Posteriormente, de modo a substituir os genes-alvo *phoPQ* pelo cassete de resistência ao antibiótico, amplificou-se os iniciadores de mutagênese juntamente com o plasmídio pKD3 por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conferindo resistência ao cloranfenicol (Cf^r). Após a eletroporação, a bactéria foi cultivada em ágar LB acrescido de cloranfenicol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Colônias presentes na superfície do ágar foram submetidas à PCR para confirmação da inserção do fragmento.

Para corrigir possíveis mutações secundárias, adotou-se a técnica de transdução com bacteriófago ΦP22 (descrito no item 4.3.4). Com o intuito de retirar o gene de resistência, eletroporou-se a bactéria para facilitar a inserção do plasmídio pCP20. Devido ao fato de que há dois sítios de restrição, denominados FRP, flanqueando o cassete de resistência ao cloranfenicol, a retirada do gene de resistência torna-se possível uma vez que, quando no citosol bacteriano, o plasmídio expressará a enzima FLP-recombinase atuante nesses sítios de restrição (DATSENKO; WANNER, 2000). Por último, o plasmídio pCP20 foi retirado da estirpe bacteriana por meio do cultivo a 42 °C.

4.3.1. Sequência alvo e construção dos iniciadores

Para inativação dos genes *phoPQ*, selecionou-se as primeiras 50 bases nitrogenadas da sequência alvo e as últimas 50 da fita complementar. O iniciador direto de mutagênese foi formado pela sequência das 50 primeiras bases juntamente com 20 bases da sequência do cassete do antibiótico, que antecede o código de início do cassete. Para a construção do iniciador reverso, foram utilizadas

as 50 últimas bases da fita complementar e 20 bases da fita complementar do cassete do antibiótico, sendo essa a sequência posterior ao código de parada.

Também foram utilizados iniciadores para verificar se houve a inserção correta do cassete. Com o mesmo objetivo, foram construídos outros dois iniciadores, direto (C2) e reverso (C1), tendo como alvo a sequência central dos cassetes de cloranfenicol. Para análise da sequência de nucleotídeos dos genes-alvo e construção dos iniciadores utilizou-se os *softwares* CLC *sequence viewer* 6.3 (CLC BIO) e PrimerBLAST (YE et al., 2012), respectivamente. As sequências dos iniciadores utilizados no presente estudo estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados no estudo.

Iniciadores	Sequência (5'→3')
<i>phoPQ_crt D*</i>	gcaagctggaagtaaaccgc
<i>phoPQ_crt R*</i>	tcaagaaagtcgggccagtt
<i>phoP50 D**</i>	caccataatcaacgctagactgttcttattgtaacacaagggagaagaggtgtaggctggagctgcttc
<i>phoQ50 R**</i>	cgattataacgggatgcttaacgagatgctggaagaacgcacagaagtgtcatatgaatatcctccttag
C1	ttatcgcaaggcgacaagg
C2	gatcttccgtcacaggtagg

*Iniciadores utilizados para a verificação da inserção dos marcadores de antibióticos

**Iniciadores utilizados para produção de fragmento de DNA recombinante

4.3.2. Amplificação e precipitação dos fragmentos de DNA recombinantes

A amplificação dos fragmentos de DNA recombinante foi realizada por meio de PCR convencional e a solução era constituída por: 40 µL de água ultrapura; 5 µL de 10x Tampão para PCR contendo MgCl₂; 1 µL de dNTP 10 mM; 1 µL de iniciador de mutagênese 1; 1 µL de iniciador de mutagênese 2; 1 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 1 µL de DNA plasmidial. A reação foi realizada em um termociclador convencional (BIO-RAD, MyCycler) com o programa empregado descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Programa da PCR para amplificação de fragmento de DNA plasmidial.

	Aquecimento	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclo final de elongação	Resfriamento
Temperatura	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
Período	2 minutos	20 segundos	30 segundos	120 segundos	7 minutos	30 minutos
Ciclos	1	35			1	1

Os produtos da PCR de cada fragmento (volume total de 250 µL por fragmento) foram acondicionados em microtubos de 2 mL e precipitados com etanol (ZEUGIN; HARTLEY, 1985). Posteriormente, o DNA foi suspenso em 20 µL de água ultrapura (SIGMA, W4502, EUA) e armazenado a -20 °C até o momento da eletroporação.

4.3.3. Eletroporação

Para a eletroporação utilizou-se uma mistura com 80 µL de suspensão de aproximadamente 1×10^9 células de SGNal^r e 10 µL de solução contendo DNA plasmidial. No aparelho eletroporador, foram utilizadas cubetas de 2 mm de largura, voltagem de 2,5 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 mΩ.

4.3.4. Transdução

Foi realizada com auxílio do bacteriófago ØP22 (WING, 1968; SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Preparou-se a cultura de SGNal^r em caldo LB incubado a 37 °C por 24 horas sob agitação (Incubadora Shaker de Bancada CT 712 - Cientec). Dessa cultura contendo aproximadamente 10^9 UFC/ mL, transferiu-se 1 mL para tubo contendo 10 mL de caldo LB e adicionou-se 1 mL de solução contendo cerca de $1,0 \times 10^{10}$ ØP22/ mL. O tubo foi incubado a 37 °C por 24 horas sob agitação. Posteriormente, centrifugou-se a cultura a 4000 g/ 20 min/ 4 °C (Centrífuga refrigerada Sorvall Legend Mack 1.6R) e o sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore 0,45 µm. Procedeu-se à contagem em placa de Petri contendo ágar LB com camada de SGNal^r. A estirpe SG $\Delta phoPQ$ foi cultivada em 10 mL de caldo LB com incubação estática a 37 °C por 24 horas. A essa cultura adicionou-se solução do bacteriófago ØP22 na proporção de 0,03 ØP22 por bactéria. A mistura foi incubada a 37 °C por

24 horas em agitação. A seguir, centrifugou-se o cultivo a 4000 g por 20 min a 4 °C e filtrou-se o sobrenadante em filtro Millipore 0,45 µm, procedendo-se então, à contagem das placas de lise do ØP22 em ágar LB contendo camada de SGNal^f. Posteriormente, a solução de bacteriófago cultivada na estirpe foi adicionada à cultura da bactéria receptora na proporção de 0,8 ØP22 por bactéria.

Para a obtenção de bactérias em quantidade desejável, a cultura em 10 mL de caldo LB foi centrifugada a 4000 g por 20 min a 4 °C e o sedimento ressuspendido em 1 mL de caldo LB. A mistura foi incubada estaticamente a 37 °C por 30 min e depois espalhada em placas de ágar LB contendo cloranfenicol na concentração de 20 µg/mL, que foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Colônias emergentes foram submetidas à técnica da PCR para confirmação do resultado.

4.3.5. Confirmação da mutação na estirpe de *Salmonella Gallinarum*

A confirmação da mutação foi realizada por PCR da região do genoma onde o cassete foi inserido. Para calcular o tamanho molecular dos *amplicons*, foi utilizado o *software* PrimerBLAST (YE et al., 2012). O DNA genômico das estirpes mutantes foi extraído pelo método de fervura e a PCR foi realizada com três combinações de iniciadores:

- 1) Direto controle + reverso controle
- 2) Direto controle + C1
- 3) Reverso controle + C2.

Para a verificação da mutação, os reagentes utilizados na PCR foram: 16 µL de água ultra pura; 2,5 µL de 10x Tampão para PCR; 1 µL de MgCl₂ 50 mM; 1 µL de dNTP 10 mM; 1 µL de iniciador 1; 1 µL de iniciador 2; 0,5 µL de Taq DNA Polimerase e 1 µL de DNA. O programa realizado em termociclador convencional (BIO-RAD, MyCycler) para a amplificação dos fragmentos de DNA está descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Programa da PCR para confirmar a mutação.

	Aquecimento	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclo final de elongação	Resfriamento
Temperatura	94°C	94°C	62°C	72°C	72°C	4°C
Período	3 minutos	20 segundos	30 segundos	120 segundos	5 minutos	30 minutos
Ciclos	1	35			1	1

As amostras dos *amplicons* foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Aparelho: Consort E863, 600 V 250 mA, cuba Horizon 11-14 CE, Life Technology). Utilizou-se 30 mL de gel composto por agarose a 1,5%, diluída em solução tampão TAE (4,84 g de TRIS base, 1 mL de ácido acético glacial, 2 mL de EDTA 0,5 M e H₂O qsp 1000mL, pH 8,0). Nas amostras, juntamente com o marcador de tamanho molecular (1 µL de GeneRuler, 1 kb DNA Ladder, 1 µL de solução corante), foi acrescentado 1 µL de solução GelRed™ (Biotium) e submetidos a uma corrente elétrica de 40 V por 2 horas. O gel foi colocado sob luz ultravioleta e fotografado para visualização das bandas utilizando-se o aparelho Gel Doc™ EZ Imager BIO-RAD.

4.4. Experimentos *in vivo*

Foram realizados dois experimentos *in vivo* utilizando-se aves semipesadas de postura comercial. No primeiro, avaliou-se a atenuação da estirpe mutante em comparação com a estirpe selvagem. No segundo experimento, foi realizada a avaliação da indução da infecção sistêmica pela estirpe mutante por diferentes vias de inoculação comparando-se com a estirpe selvagem. Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV-Unesp (CEUA - nº 23049/15).

4.4.1. Aves

Foram utilizadas 160 aves fêmeas semipesadas para postura comercial adquiridas com um dia de vida. Os animais foram alojados em baterias metálicas em ambiente climatizado, seguindo as recomendações descritas no manual da linhagem

e receberam alimento e água *ad libitum*. Foi realizada administração diária de polivitamínico via água de bebida por três dias.

No momento da chegada das aves, foram colhidas amostras de mecônio presentes no interior das caixas de transporte para pesquisa de *Salmonella* spp., de acordo com metodologia descrita por Zancan et al. (2000). Os suabes foram acondicionados em frascos contendo caldo selenito (*Selenite Broth Base*, CM0395, Oxoid, US) com 0,04 % de novobiocina (SN). Após incubação de 18 horas a 37°C em estufa bacteriológica, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar verde brilhante (VB) (*Brilliant Green Agar*, Oxoid, CM0263, US) utilizando-se o método de esgotamento a partir do caldo SN, sendo incubadas a 37°C por 24 horas. Ao final, as placas foram analisadas de modo a identificar a presença de colônias sugestivas de *Salmonella* spp.

4.4.2. Preparo dos inóculos

Os inóculos foram preparados conforme descrito por Berchieri et al. (2001). Das amostras mantidas a -80 °C, com auxílio de uma alça de platina, transferiu-se uma alíquota para tubos contendo 10 mL de caldo LB (Difco, US) que foram incubados a 37 °C por 18 horas sob agitação constante de 150 rotações por minuto (rpm). Após o período de incubação, retirou-se uma alíquota de cada inóculo, que foi diluída decimalmente em solução tampão fosfato-salino pH 7,4 (*Phosphate Buffered Saline* – PBS) para estimativa da concentração de bactéria nas culturas, conforme a metodologia descrita por Miles, Mirsa e Irwin (1938). Dispersou-se 100 µL de cada diluição sobre a superfície de ágar VB contendo ácido nalidíxico na concentração de 100 µg/mL (VBNal) e incubou-se as placas a 37 °C por 24 horas para, posteriormente, serem submetidas à contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Para o inóculo a ser administrado por via subcutânea, foram realizadas quatro lavagens do mesmo em PBS. Cada lavagem consistia em centrifugar a amostra a 4000 g por 10 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em PBS. Posteriormente era realizada a contagem de UFC/ mL do inóculo.

4.4.3. Experimento 01: Avaliação da atenuação de SG $\Delta phoPQ$

Utilizou-se 40 aves distribuídas igualmente em dois grupos. Os animais do grupo A foram infectados com a estirpe SG $\Delta phoPQ$ e os do grupo B com a estirpe selvagem (SG). Aos 20 dias de vida, os animais receberam um mL de inóculo contendo 5×10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) por via oral diretamente no papo com auxílio de cânula metálica. As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se diariamente os sinais clínicos e a mortalidade.

4.4.4. Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica

Foram utilizadas 120 aves fêmeas semipesadas de postura comercial. Aos 20 dias de vida, os animais foram divididos em quatro grupos e inoculados com diferentes estirpes bacterianas conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Protocolo de inoculação de diferentes estirpes bacterianas em aves semipesadas aos 20 dias de vida.

Grupo	Número de aves	Administração			
		Estirpe	Via	Dose	Contagem do inóculo
C	30	SG $\Delta phoPQ$	Oral	1 mL	1.10^8 UFC/ mL*
D	30	SG $\Delta phoPQ$	Subcutânea	0,2 mL	1.10^9 UFC/ mL*
E	48	SG	Oral	1 mL	1.10^8 UFC/ mL*
F	12	-	-	-	-

*UFC/ mL: Unidades formadoras de colônias por mililitro de inóculo

Para avaliação da infecção sistêmica, cinco aves dos grupos C, D e E foram eutanasiadas aos dois, quatro, sete, dez e 14 dias pós-infecção (dpi) para avaliação de lesões macroscópicas e para estimativa de células viáveis de SG $\Delta phoPQ$ e SG em baço e fígado. Concomitantemente, duas aves do grupo F foram eutanasiadas como parâmetro de comparação das alterações patológicas.

As amostras de baço e fígado colhidas foram acondicionadas separadamente em solução tampão fosfato-salino pH 7,4 (PBS) na proporção 1:10 e maceradas para, em seguida, serem diluídas decimalmente em PBS. A partir de cada diluição,

0,1 mL foi transferido para placa de Petri contendo VBNal. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e, em seguida, procedeu-se à contagem do número de colônias por grama de órgão (UFC/ g). Na ausência de crescimento, aos frascos contendo as amostras de órgãos homogeneizadas em PBS foi adicionado igual volume de caldo SN duplamente concentrado e incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar VBNal que foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Caso houvesse crescimento de colônias no ágar após o enriquecimento, o valor de 10^2 UFC/ g era atribuído à amostra.

4.5. Análises estatísticas

Para análises estatísticas, foi utilizado o software GraphPad Prism versão 6.02 para Windows (GraphPad Software, Inc.). Os dados relativos à mortalidade foram analisados pelo teste não paramétrico Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$) (GREENWOOD; NIKULIN, 1996) e, para análise das contagens de salmonelas nos órgãos, o resultado em UFC/ g foi primeiramente convertido em \log_{10} para, assim, realizar o teste de comparação múltipla de Tukey ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$) (DANIEL; CROSS, 2013).

5. RESULTADOS

5.1. Preparo da estirpe mutante

As sequências codificantes dos genes *phoP* e *phoQ* foram mapeadas na fita positiva (ou senso) do DNA cromossômico de SG287/91 (SGNaI^r) entre as posições 1952107 e 1954244 e possuem tamanhos moleculares de 675 e 1464 pares de bases (pb), respectivamente. A mutagênese iniciou-se com a amplificação de região específica do plasmídio pKD3, por meio dos iniciadores *phoP*50 F e *phoQ*50 R, com 1114 pb de tamanho (Figura 4). Esse fragmento de mutagênese foi inserido no citoplasma de SGNaI^r e substituiu com êxito os 2139 pb referentes aos genes *phoPQ* (Figura 5 – coluna 2).

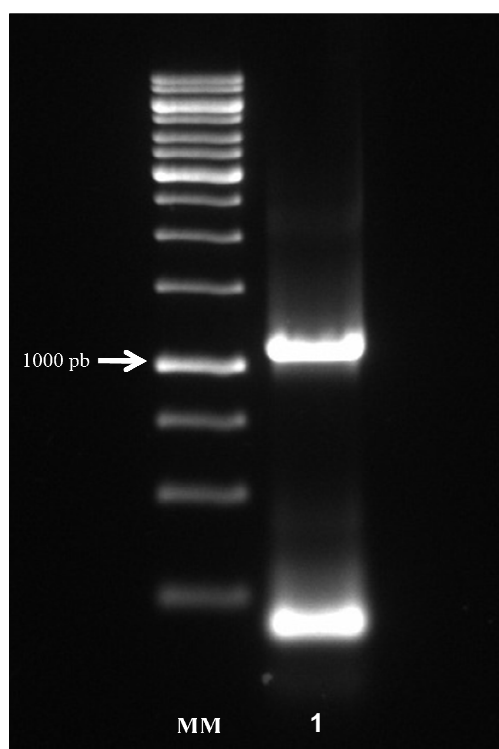


Figura 4. Eletroferograma em gel de agarose 1,5%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler, 1 kb DNA Ladder); coluna 1: fragmento de DNA recombinante *phoPQ*. Observa-se amplificação de produto inespecífico menor que 250 pb na parte inferior da coluna 1.

A combinação dos iniciadores de verificação com aqueles internos para a sequência de DNA heteróloga inserida confirmou que a substituição dos gene *phoPQ* ocorreu no sentido esperado (Figura 5 – colunas 3 e 5). A última etapa da mutagênese consistiu na retirada da sequência de resistência ao cloranfenicol, parte do fragmento de DNA heterólogo. O *amplicon* demonstrado na Figura 5, coluna 3, confirma que a estirpe mutante não possuía o cassete de antibiótico no seu cromossomo. Esse resultado foi também confirmado em placas contendo cloranfenicol, sobre as quais a estirpe mutante final não foi capaz de se multiplicar.

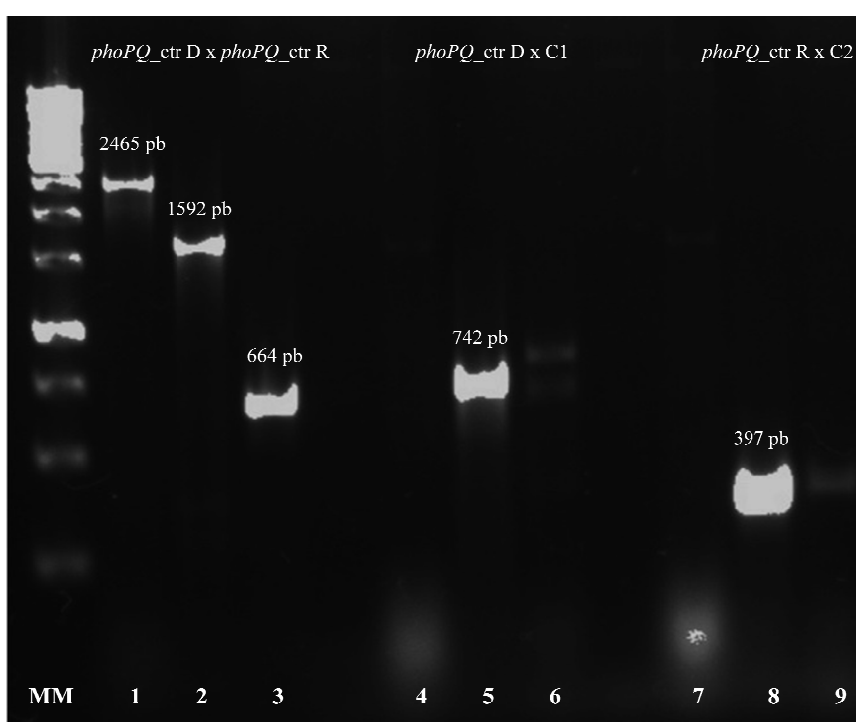


Figura 5. Eletroferograma em agarose 1,5%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler, 1 kb DNA Ladder). Colunas 1, 4, 7: SGNal^r; colunas 2, 5, 7: SG Δ *phoPQ* com cassete de resistência ao cloranfenicol; colunas 3, 6, 9: SG Δ *phoPQ* sem cassete de resistência ao cloranfenicol.

5.2. Experimento *in vivo*

Os suabes de fundo de caixa realizados no momento da chegada das aves foram negativos quanto à pesquisa de *Salmonella* spp.

5.2.1. Experimento 01: Avaliação da atenuação de *SG Δ phoPQ*

Durante o experimento, não houve registro de mortalidade ou sinais clínicos característicos do tifo aviário em aves inoculadas com a estirpe mutante *SG Δ phoPQ* (Grupo A), enquanto que as aves inoculadas com a estirpe selvagem *SG* (Grupo B) apresentaram início dos sinais clínicos aos três dpi.

Inicialmente, dois animais do Grupo B apresentaram-se apáticos, sonolentos e com início de diarreia. Aos quatro dpi, a maioria das aves se mostrava apática, sonolenta, com asas caídas, penas eriçadas, diarreia amarelo-esverdeada e com redução no consumo de água e ração (Figura 6). Aos cinco dpi, registrou-se o início da mortalidade (Figura 7) que se estendeu até nove dpi, totalizando 18 óbitos (Tabela 6). Já aos 13 dpi, houve início de recuperação do quadro clínico das duas aves remanescentes do Grupo B.



Figura 6. Sinais clínicos observados aos quatro dpi. Aves inoculadas com *SG Δ phoPQ* não apresentaram sinais clínicos característicos de tifo aviário (A1 e A2). Nas imagens B1 e B2, é possível observar quadro característico da doença em aves inoculadas com estirpe selvagem de *SG*. Nesse caso, os animais estavam apáticos, com sonolência, asas caídas, penas eriçadas e houve redução no consumo de ração e água (B1). Além disso, observou-se fezes diarréicas e de coloração amarelo-esverdeadas (B2).



Figura 7. Mortalidade observada aos sete dpi. Aves inoculadas com SG $\Delta phoPQ$ (A) não vieram à óbito. Por outro lado, o grupo de animais desafiados com a estirpe selvagem SG apresentou elevada taxa de mortalidade (B).

Tabela 6. Mortalidade acumulativa de fêmeas de linhagem semipesada para postura comercial desafiadas experimentalmente com culturas de SG $\Delta phoPQ$ ou SG aos 20 dias de vida.

Mortalidade acumulativa								
Estirpe	Dias pós-infecção						Total	%*
	5	6	7	8	9	28		
SG $\Delta phoPQ$	-	-	-	-	-	-	0/20	0 a
SG	4	8	13	17	18	18	18/20	90 b

* Na última coluna, números seguidos de letras diferentes indicam que há diferença pelo teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

5.2.2. Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica

Não foram observadas lesões esperadas de tifo aviário em aves inoculadas oralmente com SG $\Delta phoPQ$ (Grupo C) ao longo do experimento. Por outro lado, aves desafiadas subcutaneamente com a mesma estirpe (Grupo D) apresentaram alterações discretas a moderadas, tais como hepatomegalia e fígado congesto e friável.

Já em animais desafiados com a estirpe selvagem SG (Grupo E) foram observadas alterações macroscópicas severas de órgãos. Durante o primeiro exame, aos dois dpi, os animais apresentaram congestão e aumentos discretos de fígado e baço. Aos quatro dpi (Figuras 8 e 9), lesões de moderadas a severas eram observadas, tais como hepatoesplenomegalia, fígados congestos e friáveis.

Ademais, foram observados pontos necróticos no parênquima hepático e coloração bronzeada difusa no mesmo. Houve aumento discreto e moderado de baços e rins, respectivamente. As tonsilas cecais estavam hiperplásicas e com pontos hemorrágicos em sua superfície. Aos sete dpi (Figuras 10 e 11), as aves apresentaram quadros moderados de esplenomegalia e de atrofia das bursas de Fabricius. Aos 10 dpi, o único animal remanescente do grupo apresentou, além das mesmas lesões severas anteriormente citadas, quadro de cardiomegalia (Figura 12). Animais do grupo controle negativo (Grupo F) não apresentaram lesões em órgãos. As alterações macroscópicas observadas durante o exame anatomopatológico estão descritas nas Tabelas 7 a 9.

Tabela 7. Alterações anatomopatológicas em aves de linhagem semipesada para postura comercial desafiadas experimentalmente com a estirpe mutante SG $\Delta phoPQ$ pela via oral (Grupo C) aos 20 dias de vida.

Órgão	Lesão	2 dpi			4 dpi			7 dpi			10 dpi			14 dpi		
		+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Fígado	Congestão	1/5			1/5			1/5								
	Friável	1/5						1/5			1/5					
Tonsilas cecais	Hemorrágicas	1/5														

Escore: discreto (+); moderado (++); severo (+++).

Tabela 8. Alterações anatomopatológicas em aves de linhagem semipesada para postura comercial desafiadas experimentalmente com a estirpe mutante SG $\Delta phoPQ$ pela via subcutânea (Grupo D) aos 20 dias de vida.

Órgão	Lesão	2 dpi			4 dpi			7 dpi			10 dpi			14 dpi		
		+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Fígado	Hepatomegalia				1/5			1/5			1/5					
	Congestão	2/5	1/5		1/5	3/5	1/5	2/5	2/5		1/5	2/5		2/5	3/5	
	Friável	1/5			3/5	2/5		1/5			1/5	2/5		2/5	2/5	
Baço	Esplenomegalia													1/5		
Rins	Nefromegalia							1/5						1/5		
Tonsilas cais	Hemorrágica	1/5						1/5								
Bursa de Fabricius	Petéquias				1/5											

Escore: discreto (+); moderado (++); severo (+++).

Tabela 9. Alterações anatomopatológicas em aves de linhagem semipesada para postura comercial desafiadas experimentalmente com a estirpe selvagem SG aos 20 dias de vida.

Órgão	Lesão	2 dpi			4 dpi			7 dpi			10 dpi		
		+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Fígado	Hepatomegalia	1/5	1/5			1/5	4/5	1/5		4/5			1/1
	Pontos necróticos				1/5	1/5	3/5	3/5					
	Congestão	3/5					3/5		1/5	4/5			1/1
	Coloração bronzeada				1/5			1/5					
	Friável	2/5			1/5		4/5		1/5	3/5			1/1
Coração	Cardiomegalia												1/1
Baço	Esplenomegalia	1/5				1/5	4/5	1/5		4/5			1/1
	Pontos necróticos				1/5								
Tonsilas cecais	Hemorrágica	4/5			1/5	3/5		2/5	1/5			1/1	
	Aumentada	3/5			1/5	2/5		2/5				1/1	
Rins	Nefromegalia					4/5		1/5	1/5				
Bursa de Fabricius	Atrofia							4/5					1/1
	Petéquias							1/5					

Escore: discreto (+); moderado (++); severo (+++).

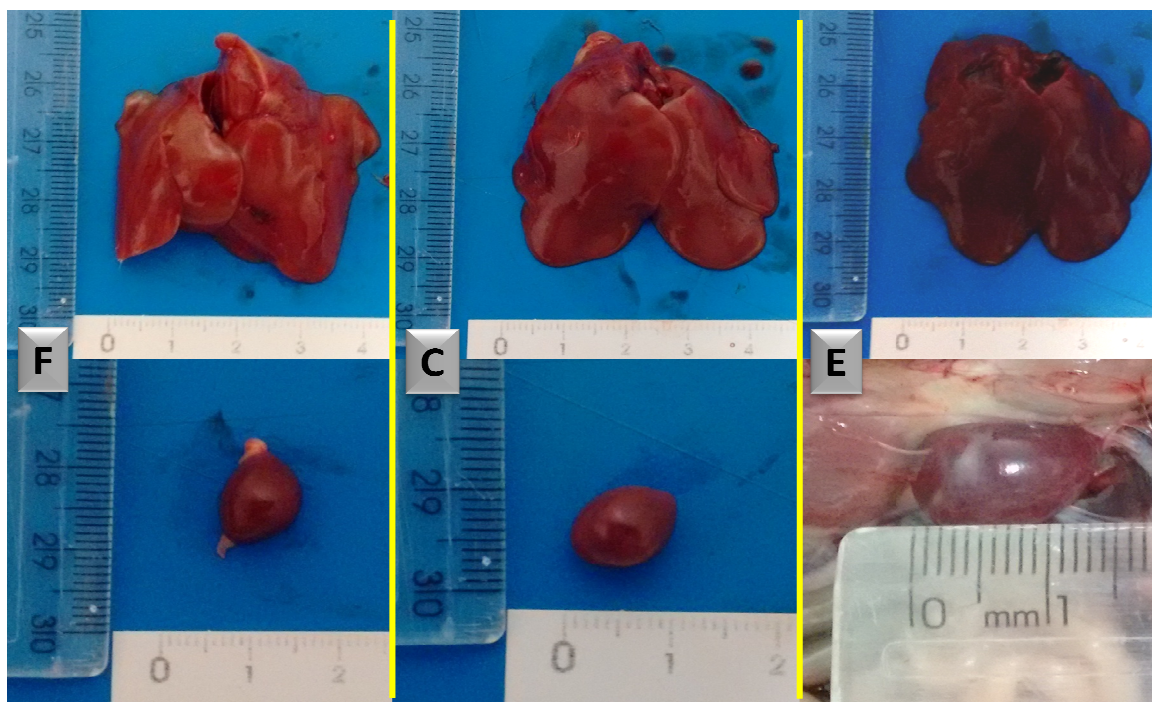


Figura 8. Aspecto macroscópico de fígado e baço de aves aos quatro dpi. Na metade superior da figura, o fígado na extrema esquerda estava inalterado. Já aves desafiadas com SG $\Delta phoPQ$ e SG, apresentavam congestão hepática discreta e severa, respectivamente. Na metade inferior da figura nota-se que os baços de aves dos grupos C e F estavam inalterados, porém há discreta esplenomegalia em ave do grupo E. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG; Grupo F: Grupo sem infecção.

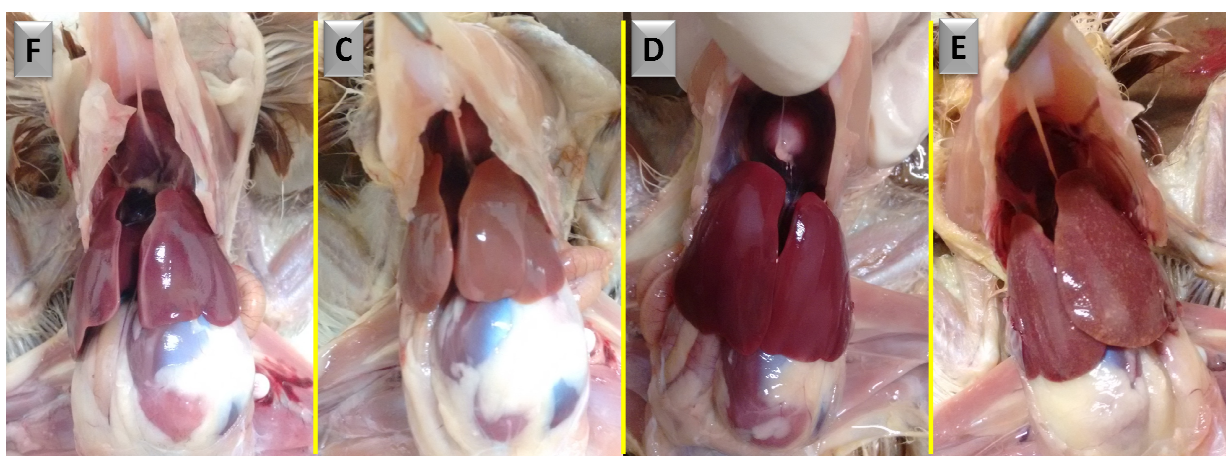


Figura 9. Aspecto macroscópico das aves aos quatro dpi, evidenciando o fígado. Os fígados das aves dos grupos C e F não apresentavam lesões. Contudo, a ave do grupo D apresentava hepatomegalia discreta e congestão severa e o animal desafiado com SG (grupo E) apresentava hepatomegalia e pontos necróticos no órgão. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo D: Infecção por via subcutânea com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG; Grupo F: Grupo sem infecção.

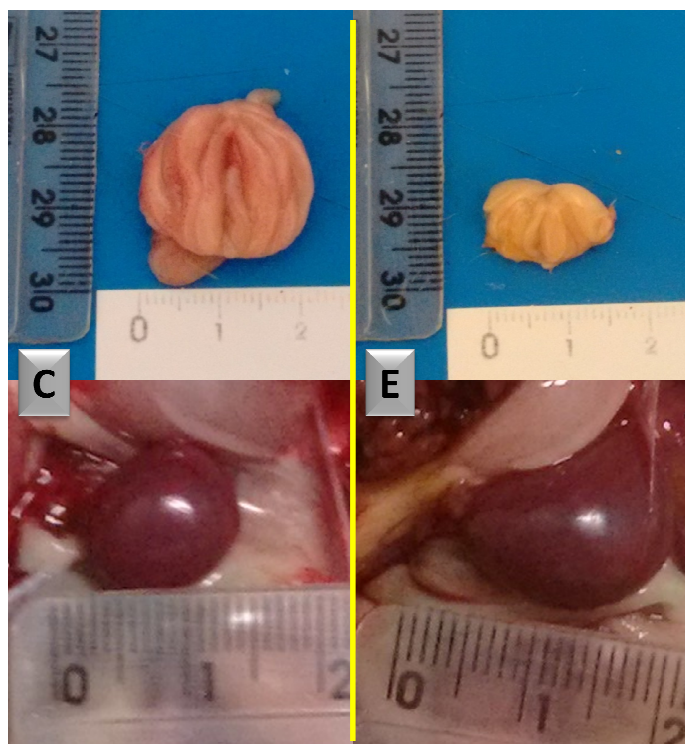


Figura 10. Aspectos macroscópicos de aves aos sete dpi evidenciando a bursa de Fabricius e o baço. Órgãos da ave desafiada com SG $\Delta phoPQ$ estava inalterado, enquanto que houve redução severa da bursa de Fabricius e esplenomegalia discreta da ave do grupo E. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG.

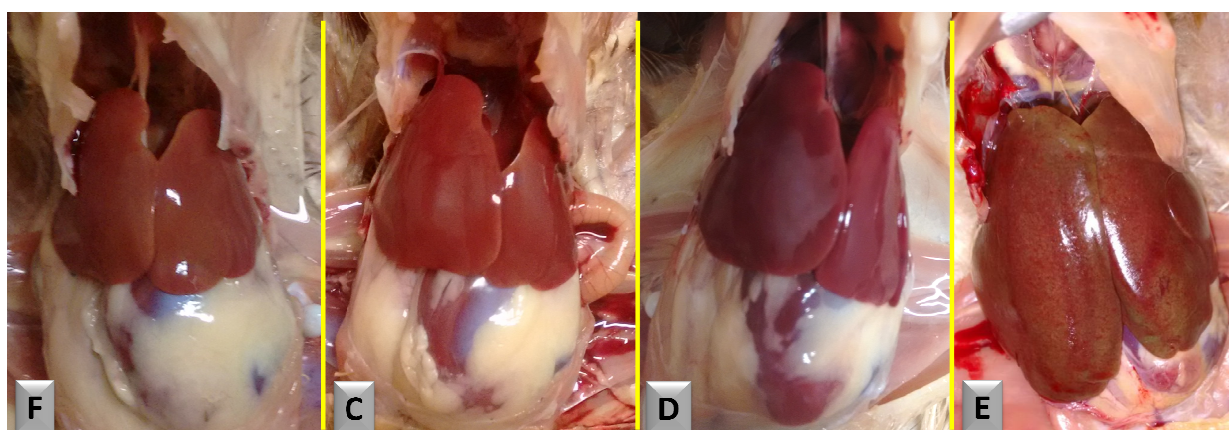


Figura 11. Aspectos macroscópicos de aves aos sete dpi evidenciando o fígado. Nas aves dos grupos F e C, o órgão estava inalterado. Por outro lado, o fígado da ave do grupo D estava discretamente congestionado e do grupo E estava aumentado, de coloração amarelo-esverdeada ou bronzeada e com pontos necróticos em todo o parênquima. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo D: Infecção por via subcutânea com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG; Grupo F: Grupo sem infecção.

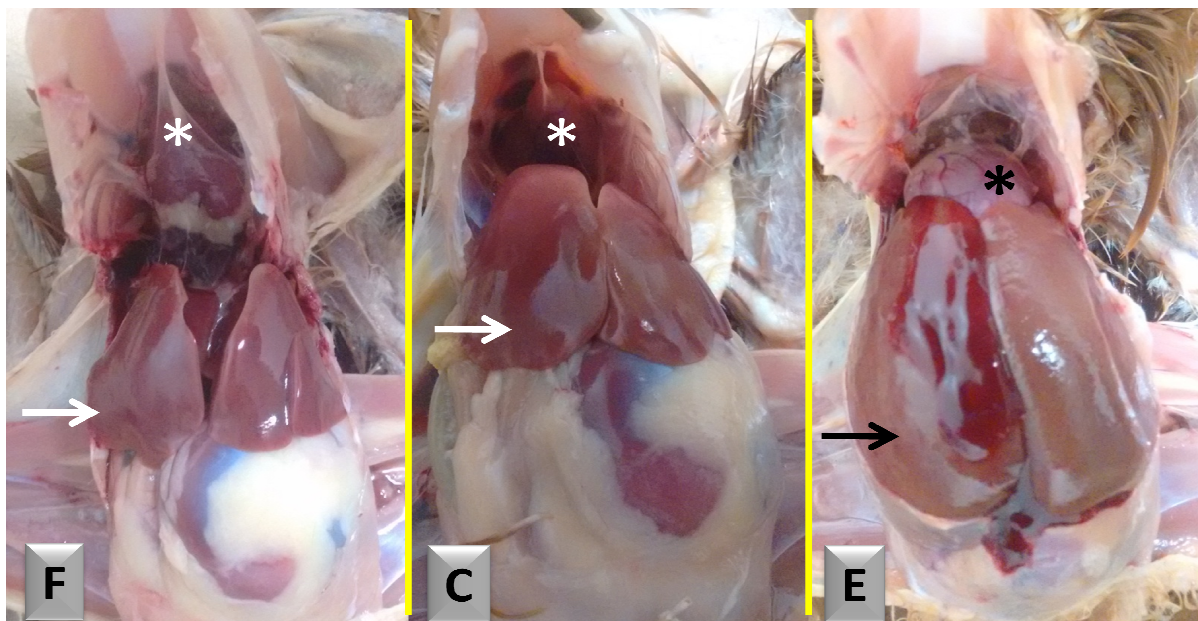


Figura 12. Aspectos macroscópicos de aves aos 10 dpi evidenciando o coração (asteriscos) e o fígado (setas). Os órgãos das aves dos grupos F e C estavam inalterados (asteriscos e setas brancas). À direita, os órgãos da ave do grupo E estavam alterados (asterisco e seta pretas), observando-se cardiomegalia, hepatomegalia e congestão hepática. Grupo C: Infecção por via oral com SG $\Delta phoPQ$; Grupo E: Infecção por via oral com SG; Grupo F: Grupo sem infecção.

As contagens bacterianas médias obtidas em amostras de fígado e baço nos dias de colheita estão disponíveis na Figura 13. Ao longo do experimento não se isolou SG $\Delta phoPQ$ nos órgãos das aves cuja bactéria foi inoculada por via oral. Das aves inoculadas com SG $\Delta phoPQ$ por via subcutânea, o micro-organismo foi isolado somente após enriquecimento das amostras de baço até 10 dpi, enquanto que os fígados foram negativos, exceto por uma única amostra positiva aos 14 dpi.

Comparativamente, SG (Grupo E) foi recuperada dos órgãos examinados em maior quantidade que SG $\Delta phoPQ$ até 10 dpi. A quantidade de SG em baço e fígado aumentou progressivamente de forma que a recuperação bacteriana diferiu ($P < 0,05$) aos quatro e sete dpi. A partir de 10 dpi, os dados não foram analisados uma vez que havia apenas um animal remanescente no grupo E para colheita de amostras. SG $\Delta phoPQ$ não foi recuperada em elevadas quantidades independente da via de inoculação analisada. Apesar disso, o número de baços positivos para SG $\Delta phoPQ$ após inoculação subcutânea foi maior e estatisticamente significativo ($P <$

0,05) aos dois e quatro dpi quando comparado com a infecção oral. Aos 14 dpi, não havia ave sobrevivente no grupo E para colheita de amostras.

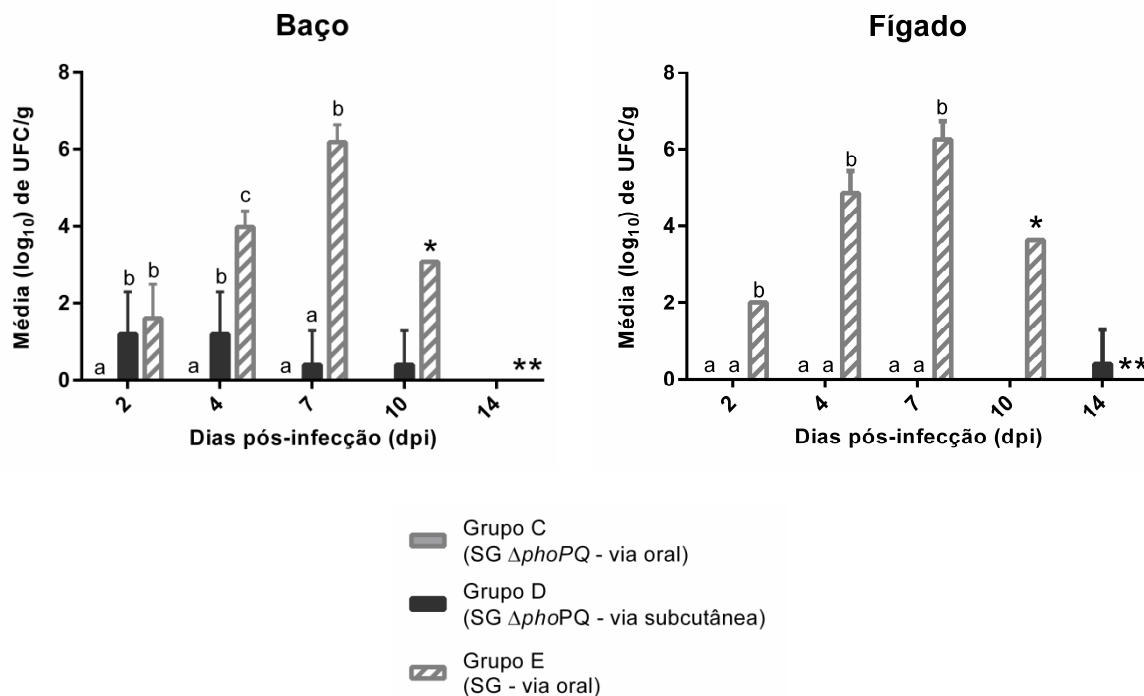


Figura 13. Contagem de SG Δ phoPQ inoculada pelas vias oral e subcutânea e SG em amostras de fígado e baço por dia de colheita. Média do número de unidades formadoras de colônia por grama ($\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$) de SG Δ phoPQ e SG em fígado e baço de aves infectadas experimentalmente aos 20 dias de vida. Aos 10 dpi, havia apenas uma ave remanescente do grupo E (*) e aos 14 dpi, não havia ave no grupo E (**) para colheita de amostras. Letras diferentes por dia de colheita representam resultados estatisticamente significantes ($P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Ao contrário de outros micro-organismos patogênicos em que os fatores de virulência podem estar codificados em uma única região do genoma, *Salmonella* spp. tem diversos desses genes presentes em diferentes regiões (GROISMAN; OCHMAN, 1997). Em *Salmonella* Typhimurium (STM), cuja infecção é letal para camundongos, eles correspondem a 4% do genoma (BOWE et al., 1998). Os fatores de virulência de *Salmonella* spp. são reconhecidos como grupos de genes codificados nas SPI e em plasmídios de virulência ou mesmo como componentes estruturais superficiais como flagelos, antígeno capsular e adesinas (GROISMAN; OCHMAN, 1997; MARCUS, 2000; RYCHLIK; BARROW, 2005; SABBAGH et al., 2010).

A necessidade de utilizar tantos determinantes de virulência durante o processo infeccioso é devido às distintas interações que *Salmonella* spp. tem com o hospedeiro, como sua sobrevivência em baixo pH estomacal, invasão de células epiteliais intestinais e a infecção sistêmica, incluindo a replicação no interior de macrófagos (GROISMAN; OCHMAN, 1997; RYCHLIK; BARROW, 2005). Para isso, sistemas regulatórios, como o regulador global PhoPQ, expressam ou inibem genes de virulência (BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998; DEIWICK et al., 1999) de modo a superar as barreiras físico-químicas (CHOWDHURY; SAHU; DAS, 1996).

Analisando os dados encontrados na literatura, notamos que a cascata regulatória comandada por *phoPQ* é muito extensa. Assim, a falha na transcrição de diversos genes por intermédio de PhoPQ pode ter causado a atenuação da estirpe SG $\Delta phoPQ$. Ao avaliar a expressão de genes das SPI-1 a SPI-4 de sorovares paratíficos aviários, notou-se que as SPI-1 e SPI-4 são essenciais para a invasão epitelial, porém para a sobrevivência intra-macrófagos esse papel seria realizado por genes codificados nas SPI-2 e SPI-3 (IMRE et al., 2013). Dessa forma, uma vez que a invasão sistêmica de SG ocorre por meio de células do sistema reticuloendotelial (CHAPPELL et al., 2009), levantamos a hipótese de que os genes presente nas SPI-

2 e SPI-3 controlados por PhoPQ tem papel central na patogenicidade dessa bactéria.

O desenvolvimento da doença depende da interação entre os fatores de virulência da bactéria com a susceptibilidade do hospedeiro. Sorovares de *Salmonella* spp. adaptados a vários hospedeiros, como *Salmonella* Enteritidis, provocam gastroenterite e que, de acordo com a susceptibilidade do animal, pode resultar em infecção sistêmica. Por outro lado, sorovares adaptados a um número restrito de hospedeiros, como *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Typhi (ST) e *Salmonella* Typhimurium (STM), responsáveis por quadros sistêmicos em aves, seres humanos e camundongos, respectivamente, provocam severa infecção sistêmica que pode causar a morte do hospedeiro (UZZAU et al., 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Os sorovares ST e STM, utilizados como modelos da febre tifóide em mamíferos (MILLER; KUKRAL; MEKALANOS, 1989; HOHMANN, 1996), são patógenos flagelados (GRIMONT; WEILL, 2007) e provocam resposta imune do hospedeiro diferente de SG em aves (CHAPPELL et al., 2009). Quando comparado com estirpes paratíficas, SG pouco coloniza o ceco da ave (SETTA et al., 2012). Para isso, o micro-organismo comumente realiza a invasão por meio das tonsilas cecais, o que pode resultar em lesões desse tecido linfóide (CHADFIELD et al., 2003; SMITH; BEAL, 2008). No presente estudo, um maior número de animais do grupo controle (Grupo E) apresentou lesões mais acentuadas em tonsilas cecais. Em comparação, quando as aves eram inoculadas com SG $\Delta phoPQ$, poucas foram apresentaram alterações nesse tecido e, quando presentes, se caracterizavam como lesões discretas. Uma vez que as tonsilas cecais de animais desafiados com a estirpe mutante por ambas as vias (Grupos C e D) estavam semelhantemente alteradas, presume-se que outra variável resultou nessas lesões, sugerindo que o mutante poderia não ter realizado a infecção sistêmica quando inoculado pela via oral.

Em estudos prévios, a deleção de *phoPQ* em ST e STM resultou na atenuação do patógeno em seres humanos e camundongos, respectivamente, demonstrando que ambos os genes são necessários para a infecção sistêmica (MILLER; KUKRAL; MEKALANOS, 1989; HOHMANN, 1996). Mais recentemente, a

estirpe atenuada de *S. Enteritidis* com deleção do gene *phoP* não provocou inflamação intestinal em aves (ELSHEIMER-MATULOVA et al., 2015). A partir dos dados do presente estudo, pode-se inferir que SG $\Delta phoPQ$ (Grupo A) é atenuado para aves susceptíveis visto que os animais inoculados com a estirpe não vieram à óbito e nem desenvolveram sinais clínicos. Tais resultados corroboram com o descrito previamente em que as proteínas PhoPQ ou PhoP influenciam na patogenicidade de *Salmonella* (MILLER et al., 1989; HOHMANN, 1996; ELSHEIMER-MATULOVA et al., 2015), evidenciando que um sistema regulatório PhoPQ intacto é crucial para a expressão completa da patogenicidade de SG.

Por não colonizar eficientemente o intestino, SG realiza a infecção sistêmica por meio de tecidos linfóides ricos em macrófagos como tonsilas cecais e placas de Peyer (CHADFIELD et al., 2003; WITHANAGE et al., 2005; SMITH; BEAL, 2008; CHAPPELL et al., 2009). Apesar disso, no presente estudo não foi isolado SG $\Delta phoPQ$ de fígado e baço de aves inoculadas oralmente (Grupo C) em nenhum dia de colheita de amostras pós-infecção, sugerindo que a bactéria foi incapaz de atingir tais tecidos. Estudo prévio demonstrou que a vulnerabilidade de *Salmonella* spp. ao pH ácido aumenta em bactérias com o sistema PhoPQ disfuncional (BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998). Assim, a suposição é de que a viabilidade de SG $\Delta phoPQ$ foi diminuída drasticamente após sua passagem pelo proventrículo, o que resulta em uma reduzida fração do inóculo capaz de atingir o lúmen intestinal. Dessa forma, a infecção causada pelas bactérias remanescentes não resultaria em uma invasão sistêmica eficiente no hospedeiro e nem causaria o desenvolvimento da doença.

Além da capacidade de resposta a acidificação, a habilidade de invasão de SG $\Delta phoPQ$ possivelmente também estaria comprometida. Em estudo prévio com aves susceptíveis ao tifo aviário, foi realizada a inativação da seqüência codificante do gene *ssaU* de *Salmonella Gallinarum* estirpe 9 (SG $\Delta ssaU$) (JONES et al., 2001). A proteína SsaU é um dos principais componentes estruturais do Sistema de Secreção do Tipo Três da SPI-2 (TTSS-2) e o funcionamento pleno do aparato é essencial para o processo de invasão sistêmica (WOOD et al., 2000). Isso explica o fato de que ao inocular SG $\Delta ssaU$ oralmente, a estirpe não foi isolada em fígado e baço, nem mesmo após o enriquecimento das amostras, já que houve o

comprometimento funcional desse sistema de secreção (JONES et al., 2001). PhoPQ regula a expressão de genes que produzem proteínas estruturais do TTSS-2 e, dessa forma, supõe-se que a ação conjunta do pH ácido e da incapacidade invasiva foram os principais fatores que impediram a invasão de SG $\Delta phoPQ$ quando inoculado oralmente.

Durante a elaboração do delineamento experimental, cogitou-se que poderia ocorrer uma intensa influência do ambiente gastroentérico na infectividade da estirpe SG $\Delta phoPQ$ quando administrada por via oral. Dessa forma, de modo a evitar essas barreiras físico-químicas do trato gastrointestinal, foi adotada a inoculação da estirpe mutante pela via subcutânea. Diversos estudos publicados ao longo das últimas décadas demonstram que estirpes de *Salmonella* spp. contendo a deleção dos genes *phoPQ* não se replica eficazmente no interior de macrófagos (FOSTER; HALL, 1990; ERIKSSON et al., 2003; PROST et al., 2007).

No presente estudo, a estirpe mutante foi recuperada em órgãos somente após o enriquecimento das amostras e não foi patogênica para aves susceptíveis como a estirpe selvagem. Semelhantemente ocorreu quando SG $\Delta ssaU$ foi inoculado pela via intravenosa (JONES et al., 2001). Sugere-se que a similaridade de ambos os resultados deve-se pela inabilidade de replicação de *Salmonella* spp. no interior de células fagocitárias por ser dependente de TTSS-2 (BIJLSMA; GROISMAN, 2005) e, conseqüentemente, de um sistema PhoPQ funcional já que a expressão do aparato é regulada por essas proteínas (BIJLSMA; GROISMAN, 2005; OSBORNE; CROOMBES, 2011).

Além dos genes da SPI-2, a transcrição de genes codificados na SPI-3, como o operon *mgtCBR*, também é controlada por PhoPQ, (BLANC-POTARD et al., 1999). Ao realizar um transcriptoma de *S. Typhimurium* no interior de macrófago, os genes *mgtC* e *mgtB* da SPI-3 foram os mais transcritos uma vez que a taxa aumentou em torno de 26 e 18 vezes, respectivamente (SRIKUMAR et al., 2015). A importância da proteína MgtC pode ser validada por meio de cultivo celular como no estudo conduzido por Retamal; Castillo-Ruiz; Mora (2009). Ao deletar a SPI-3 do genoma de *S. Typhimurium* foi observado que sua habilidade de sobreviver em monócitos humanos foi prejudicada. Contudo, ao inserir um plasmídeo contendo o gene *mgtC* na estirpe, o fenótipo manifestado pela bactéria selvagem foi restabelecido,

demonstrando que MgtC é o principal fator de virulência da SPI-3 (RETAMAL; CASTILLO-RUIZ; MORA, 2009). Em camundongos, foi observada a necessidade desse gene para a patogenicidade de *Salmonella* Typhimurium já que sua deleção atenuou a estirpe (BLANC-POTARD; GROISMAN, 1997; CHOI et al., 2017).

Devido a privação de magnésio no interior de SCV, *Salmonella* spp. expressa a proteína transportadora desse cátion, MgtB, de modo a aumentar a captação desse cátion para seu citosol (PONTES; YEOM; GROISMAN, 2016). Ademais, o ambiente ácido gera gradiente de prótons (H^+) para o interior da bactéria, o que eleva a produção de adenosina trifosfato (ATP). Assim, a proteína MgtC inibe a produção de ATP pela bactéria com o intuito de evitar níveis acima do fisiológico (LEE; PONTES; GROISMAN, 2013). No citosol bacteriano, ATP se liga aos íons Mg^{2+} livres, tornando-os indisponíveis para a montagem de ribossomos e, conseqüentemente, reduzindo a tradução protéica. Para isso, a ação inibitória da produção de ATP por intermédio de MgtC é necessária para assegurar a disponibilidade de Mg^{2+} disponíveis (PONTES; YEOM; GROISMAN, 2016). No presente estudo, SG $\Delta phoPQ$ teve sua capacidade de replicação reduzida ao longo do experimento após a inoculação subcutânea, sugerindo que há falha na expressão de genes da SPI-3, o que também pode ter contribuído para o perfil *in vivo* de SG $\Delta phoPQ$.

Estirpes de *Salmonella* spp. com inativação dos genes *phoPQ* são incapazes de evadir dos mecanismos antimicrobianos impostos pelo hospedeiro, tais como barreiras físico-químicas e o ambiente hostil do interior de macrófagos, nos quais a bactéria dificilmente se replica (VÉSCOVI; SONCINI; GROISMAN, 1996; BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998; ERIKSSON et al., 2003; THOMPSON et al., 2011). Ao analisar o conjunto de dados resultantes das inoculações por diferentes vias, supõe-se que a atenuação de SG $\Delta phoPQ$ em aves susceptíveis é devido a sua incapacidade de superar as barreiras físico-químicas impostas pelo trato gastrointestinal quando inoculado pela via oral e, quando pela via subcutânea, se dá pela sua inabilidade de sobreviver e se replicar no interior de macrófagos.

Os dados apresentados no presente estudo indicam que os genes *phoPQ* desenvolvem papel fundamental na patogenicidade de *Salmonella* Gallinarum visto

que sua deleção do genoma bacteriano (SG $\Delta phoPQ$) foi suficiente para atenuá-la em aves susceptíveis.

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi realizado, é possível concluir que:

- Os genes *phoPQ* são necessários para patogenicidade de *Salmonella Gallinarum*;
- A estirpe mutante SG $\Delta phoPQ$ não é patogênica para aves susceptíveis;
- Independente da via de administração, SG $\Delta phoPQ$ foi incapaz de causar o tifo aviário em aves susceptíveis.

8. REFERÊNCIAS

ALLEN-VERCHOW, E.; SAYERS, A. R.; WOODWARD, M. J. Virulence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 122, n. 3, p. 395-402, 1999.

ALPUCHE-ARANDA, C. M.; SWANSON, J. A.; LOOMIS, W. P.; MILLER, S. I. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 21, p. 10079-10083, 1992.

BATISTA, D. F. A.; FREITAS NETO, O. C.; ALMEIDA, A. M.; BARROW, P. A.; BARBOSA, F. O.; BERCHIERI JUNIOR, A. Molecular identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by a duplex PCR assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 28, n. 4, p. 419-422, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1040638716651466>>.

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid – new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, London, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2010.542575>>.

BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER, J. W. Acid stress responses in enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.147, n. 2, p. 173-180, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10238.x>>.

BEARSON, B. L.; WILSON, L.; FOSTER, J. W.; A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 9, p. 2409-2417, 1998.

BERCHIERI, A. Jr.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. 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**, London, v. 30, n. 3, p. 221-231, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079450120054631>>.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Eds.). **Doenças das Aves**. 2. Ed. Campinas: FACTA, 2009, p. 435-453.

BIJLSMA, J. J.; GROISMAN, E. A. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 85-96, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04668.x>>.

BLANC-POTARD, A. B.; GROISMAN, E. A. The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. **EMBO J.**, Eynsham, v. 16, n. 17, p. 5376-5385, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.17.5376>>.

BLANC-POTARD, A. B.; SOLOMON, F.; KAYSER, J.; GROISMAN, E. A. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 3, p. 998-1004, 1999.

BOWE, F.; LIPPS, C. J.; TSOLIS, R. M.; GROISMAN, E.; HEFFRON, F.; KUSTERS, J. G. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3372-3377, 1998.

BRASIL. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 Set. 1994, seção 1, p. 13. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=13&data=22/09/1994>>. Acesso em: 07 de Novembro de 2016.

BRASIL. Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 nov. 2003, seção 1, p. 3-5. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=3&data=05/11/2003>>. Acesso em: 07 de novembro de 2016.

BRASIL. Instrução Normativa nº 10, de 11 de abril de 2013. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 abr. 2013, seção 1, p. 2-4. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=2&data=12/04/2013>>. Acesso em: 14 de março de 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 out. 2016, seção 1, p. 13-16. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=25/10/2016&jornal=1&pagina=13&totalArquivos=120>>. Acesso em: 07 de novembro de 2016.

BRASIL. Instrução Normativa nº 8, de 17 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 mar. 2017, seção 1, p. 32-33. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=32&data=03/03/2017>>. Acesso em: 14 de março de 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National Salmonella Surveillance Annual Report, 2013**. Atlanta, 2016. 89 p.

CELIS-ESTUPIÑAN, A. L. P.; BATISTA, D. F. A.; CARDOZO, M. V.; SOUZA, A. I. S.; RODRIGUES ALVES, L. B.; ALMEIDA, A. M.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil. **Avian Pathology**, London, v.13, n. 1, p. 1-10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2017.1299922>>.

CHADFIELD, M. S.; BROWN, D. J.; AABO, S.; CHRISTENSEN, J. P.; OLSEN, J. E. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella Gallinarum* and other host-adapted *Salmonella enterica* serovars in the avian host. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1-2, p. 49-64, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00290-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00290-0)>.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.295>>.

CHOI, E.; CHOI, S.; NAM, D.; PARK, S.; HAN, Y.; LEE, J; LEE, E. Elongation factor P restricts *Salmonella's* growth by controlling translation of Mg²⁺ transporter gene during infection. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 42098, p. 1-10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep42098>>.

CHOWDHURY, R.; SAHU, G. K.; DAS, J. Stress response in pathogenic bacteria. **Journal of Biosciences**. New Delhi, v. 21, n. 2, p. 149-160, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02703105>>.

CLEMENTS, M.; ERIKSSON, S.; TEZCAN-MERDOL, D.; HINTON, J. C.; RHEN, M. Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. **Annals of Medicine**, Helsinki, v. 33, n. 3, p. 178-185, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/07853890109002075>>.

CURTISS III, R.; KELLY, S. M.; HASSAN, J. O. Live oral avirulent *Salmonella* vaccines. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 37, n. 3-4, p. 397-405, 1993. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90038-9)>.

DANIEL, W. W.; CROSS, C. L. Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences, 10th Edition. New York: John Wiley & Sons, 2013. p. 960.

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**, Washington, v. 97, n. 12, p. 6640-6645, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>>.

DEIWICK, J.; NIKOLAUS, T.; ERDOGAN, S. HENSEL, M. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 1759-1773, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01312.x>>.

DESIN, T. S.; LAM, P. S.; KOCH, B.; MICKAEL, C.; BERBEROV, E.; WISNER, A. L. S.; TOWNSEND, H. G. G.; POTTER, A. A.; KÖSTER, W. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for but facilitates rapid systemic spread in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 77, n. 7, p. 2866-2875, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00039-09>>.

DORMAN, C. J.; CHATFIELD, S.; HIGGINS, C. F.; HAYWARD, C.; DOUGAN, G. Characterization of porin and ompR mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: ompR mutants are attenuated *in vivo*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, n. 7, p. 2136-2140, 1989.

ELSHEIMER-MATULOVA, M.; VARMUZOVA, K.; KYROVA, K.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RAHMAN, M.; RYCHLIK, I. *phoP*, SPI1, SPI2 and *aroA* mutants of *Salmonella* Enteritidis induce a different immune response in chickens. **Veterinary Research**, London, v. 46, n. 1, p. 96-108, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13567-015-0224-x>>.

ERIKSSON, S.; LUCCHINI, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M.; HINTON, J. C. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 103-118, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x>>.

ERNEST, R. K.; GUINA, T.; MILLER, S. I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 179, n. Supplement 2, p. S326-S330, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/513850>>.

ESWARAPPA, S. M.; NEGI, V. D.; CHAKRABORTY, S.; CHANDRASEKHAR SAGAR, B. K.; CHAKRAVORTTY, D. Division of the *Salmonella* containing vacuole and depletion of acidic lysosome in *Salmonella*-infected host cells are novel strategies of *Salmonella* enteric to avoid lysosomes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 78, n. 1, p. 68-79, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00668-09>>.

FIELDS, P. I.; GROISMAN, E. A.; HEFFRON, F. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. **Science**, New York, v. 243, n. 4894 Pt 1, p. 1059-1062, 1989. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.2646710>>.

FOLEY, S. L.; JOHNSON, T. J.; RICKE, S. C.; NAYAK, R.; DANZEISEN, J. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 77, n. 4, p. 592-607, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00015-13>>.

FOOKS, M.; SCHOROEDER, G. N.; LANGRIDGE, G. C.; BLONDEL, C. J.; MAMMINA, C.; CONNOR, T. R.; SETH-SMITH, H.; VERNIKOS, G. S.; ROBINSON, K. S.; SANDERS, M.; PETTY, N. K.; KINGSLEY, R. A.; BÄUMLER, A. J.; NUCCIO, S.; CONTRERAS, I.; SANTIVIAGO, C. A.; MASKELL, D.; BARROW, P.; HUMPHREY, T.; NASTASIA, A.; ROBERTS, M.; FRANKEL, G.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; THOMSON, N. R. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the Salmonellae. **Public Library of Science – PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. 1-16, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002191>>.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

FOSTER, J. W.; HALL, H. K. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 2, p. 771-778, 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jb.172.2.771-778.1990>>.

FREITAS NETO, O. C.; ARROYAVE, W.; ALESSI, A. C.; FAGLIARI, J. J.; BERCHIERI JUNIOR, A.; Infection of commercial laying hens with *Salmonella Gallinarum*: clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 133-141, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2007000200010>>.

FREITAS NETO, O. C.; SETTA, A.; IMRE, A.; BUKOVINSKI, A.; ELAZOMI, A.; KAISER, P.; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P.; JONES, M. A flagellated motile *Salmonella Gallinarum* mutant (SG Fla+) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 164, n. 3-4, p. 425-433, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.015>>.

GALÁN, J. E. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annual Review of Cell and Development Biology**, Palo Alto, v. 12, n. 1, p. 53-86, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.53>>.

GARCIA, K. O.; BERCHIERI JUNIOR, A.; SANTANA, A. M.; ALARCON, M. F. F.; FREITAS NETO, O. C.; FAGLIARI, J. J. Experimental infection of commercial layers with wild or attenuated *Salmonella Gallinarum* mutant strains: anatomic pathology, total blood cell count and serum protein levels. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 91-104, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2013000200004>>.

GORDEN, J.; SMALL, P. L. Acid resistance in enteric bacteria. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 1, p. 364-367, 1993.

GREENWOOD, P. E.; NIKULIN, M. S. In John Wiley & Sons (Ed.) **A Guide To Chi-Squared Testing**. New York, 1996, p. 280.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 1-17.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***, Institut Pasteur, Paris, France, 2007.

GROISMAN, E. A.; CHIAO, E.; LIPPS, C. J.; HEFFRON, F. *Salmonella* typhimurium phoP virulence gene is a transcriptional regulator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 18, p. 7077-7081, 1989.

GROISMAN, E. A.; KAYSER, J.; SONCINI, F. C. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 22, p. 7040-7045, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jb.179.22.7040-7045.1997>>.

GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. How *Salmonella* became a pathogen. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, n. 9, p. 343-349, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01099-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01099-8)>.

GROISMAN, E. A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 6, p. 1835-1842, 2001. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001>>.

GROISMAN, E. A.; HOLLANDS, K.; KRINER, M. A.; LEE, E. J.; PARK, S. Y. Bacterial Mg²⁺ homeostasis, transport, and virulence. **Annual Reviews of Genetics**, Palo Alto, v. 47, p. 625-646, 2013. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-051313-051025>>.

GUNN, J. S.; MILLER, S. I. PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella* Typhimurium antimicrobial peptide resistance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 23, p. 6857-6864, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jb.178.23.6857-6864.1996>>.

GUO, L.; LIM, K. B.; GUNN, J. S.; BAINBRIDGE, B.; DARVEAU, R. P.; HACKETT, M.; MILLER, S. I. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella* typhimurium virulence genes phoP-phoQ. **Science**, New York, v. 276, n. 5310, p. 250-253, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5310.250>>.

HELAINÉ, S.; THOMPSON, J. A.; WATSON, K. G.; LIU, M.; BOYLE, C.; HOLDEN, D. W. Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 8, p. 3746-3751, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1000041107>>.

HICKS, K. G.; DELBECQ, S. P.; SANCHO-VAELLO, E.; BLANC, M.; DOVE, K. K.; PROST, L. R.; DALEY, M. E.; ZETH, K.; KLEVIT, R. E.; MILLER, S. I. Acidic pH and divalent cation sensing by PhoQ are dispensable for systemic *Salmonellae* virulence. **E-Life**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.06792.001>>.

HOHMANN, E. L.; OLETTA, C. A.; KILLEEN, K. P.; MILLER, S. I. *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 173, n. 6, p. 1408-1414, 1996.

HURLEY, D.; McCUSKER, M. P.; FANNING, S.; MARTINS, M. *Salmonella* – host interactions – modulation of the host innate immune system. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 5, p. 1-11, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00481>>.

IMRE, A.; BUKOVINSZKI, A.; LOVELL, M. A.; LI, HONGYING, L.; ZHOU, X.; BARROW, P. A. Gene expression analysis of *Salmonella enterica* SPI in macrophages indicates differences between serovars that induce systemic disease from those normally causing enteritis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 167, n. 3-4, p. 675-679, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.034>>.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>>.

JONES, M. A.; WIGLEY, P.; PAGE, K. L.; JULME, S. D.; BARROW, P. A. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the SPI 2 type III secretion system but not the SPI 1 type III secretion system for virulence in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5471-5476, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.9.5471-5476.2001>>.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology**, Reading, v. 146, p. 3217–3226, 2000. Disponível em: <10.1099/00221287-146-12-3217>.

KIER, L. D.; WEPPELMAN, R. M.; AMES, B. N. Regulation of nonspecific acid phosphatase in *Salmonella* - *phoN* and *phoP* genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 138, n. 1, p. 155-161, 1979.

KINGSLEY, R. A.; BÄUMLER, A. J. Pathogenicity islands and host adaptation of *Salmonella* serovars. In: HACKER, J.; KAPER, J. (Eds.). **Pathogenicity islands and the evolution of pathogenic microbes**. 1. Ed. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002, p. 67-87.

LEE, E. J.; GROISMAN, E. A. Control of a *Salmonella* virulence locus by an ATP-sensing leader messenger RNA. **Nature**, Basingstoke, v. 486, n. 7402, p. 271-275, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature11090>>.

LEE, E. J.; PONTES, M. H.; GROISMAN, E. A. A Bacterial Virulence Protein Promotes Pathogenicity by Inhibiting the Bacterium's Own F1Fo ATP Synthase. **Cell**, Cambridge, v. 154, n. 1, p. 146-156, 2013. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.004>>.

LEE, J. W.; LEE, E. J. Regulation and function of the *Salmonella* MgtC virulence protein. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 53, n. 10, p. 667-672, 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s12275-015-5283-1>>.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, Paris, v. 2, n. 2, p. 145-156, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2)>.

MASTROENI, P.; CHABALGOITY, J. A.; DUNSTAN, S. J.; MASKELL, D. J.; DOUGAN, G. *Salmonella*: Immune Responses and Vaccines. **Veterinary Journal**, London, v. 161, n. 2, p. 132-164, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/tvjl.2000.0502>>.

MASTROENI, P. Immunity to systemic *Salmonella* infections. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 2, n. 4, p. 393-406, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/1566524023362492>>.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **The Journal of Hygiene**, London, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

MILLER, S. I.; KUKRAL, A. M.; MEKALANOS, J. J. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella* typhimurium virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 13, p. 5054-5058, 1989.

MILLER, S. I.; MEKALANOS, J. J. Constitutive expression of the phoP regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 5, p. 2485-2490, 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-268>>.

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook challenges. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 73, n. 2, p. 245-256, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0043933917000071>>.

OCHMAN, H.; WILSON, A. C. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 26, n. 1-2, p. 74-86, 1987. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02111283>>.

OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, A. C. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 51-56, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000100011>>.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE). **World Animal Health Information Database (WAHID) Interface**. Disponível em: <https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail>. Acesso em: 13 de Maio de 2016.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE). **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2017**. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>>. Acesso em: 20 de Maio de 2017.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Aspectos microbiológicos de La higiene de los alimentos**: Informe de un Comité de Expertos de La OMS reunido com participación de La FAO. Ginebra, 1976. 116 p. (Serie de informes tecnicos).

OSBORNE, S. E.; COOMBES, B. K. Transcriptional priming of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 precedes cellular invasion. **Public Library of Science (PLOS One)**, San Francisco, v. 6, n. 6, 2011. Disponível em: <<https://sx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021648>>.

OWEN, K. A.; MEYER, C. B.; BOUTON, A. H.; CASANOVA, J. E. Activation of Focal Adhesion Kinase by Salmonella Suppresses Autophagy via an Akt-mTOR Signaling Pathway and Promotes Bacterial Survival in Macrophages. **Public Library of Science (PLOS) Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 6, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004159>>.

OWEN, K. A.; ANDERSON, C. J.; CASANOVA, J. E. Salmonella Suppresses the TRIF-Dependent Type I Interferon response in macrophages. **MBio**, Washington, v. 7, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02051-15>>.

PARK, M. K.; CHOI, K. S.; KIM, M. C.; CHAE, J. S. Differential diagnosis of *Salmonella* gallinarum and *S. pullorum* using PCR-RFLP. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 2, n. 3, p. 213-219, 2001.

PINHEIRO, L. A. S.; DE OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JUNIOR, A. Experimental *Salmonella enterica* serovar Pullorum infection in two commercial varieties of laying hens. **Avian Pathology**, London, v. 30, n. 2, p. 129-133, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079450120044524>>.

PONTES, M. H.; YEOM, J.; GROISMAN, E. A. Reducing ribosome biosynthesis promotes translation during low Mg²⁺ stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 480-492, 2016. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.008>>.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Supplement 1996 (No. 40) to the Kauffmann-White Scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 148, n. 9, p. 811-814, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)82457-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)82457-6)>.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F. W.; GHEESLING, L. L. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White Scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, n. 10, p. 907-909, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01274-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01274-8)>.

POPPE, C. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**. 1. ed. New York: CABI Publishing, 2000. cap. 7, p. 107- 132.

PROST, L. R.; DALEY, M. E.; LE SAGE, V.; BADER, M. W.; LE MOUAL, H.; KLEVIT, R. E.; MILLER, S. I. Activation of the Bacterial Sensor Kinase PhoQ by Acidic pH. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 26, n. 2, p. 165-174, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.008>>.

RATHMAN, M.; SJAASTAD, M. D.; FALKOW, S. Acidification of phagosomes containing *Salmonella* typhimurium in murine macrophages. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2765-2773, 1996.

RETAMAL, P.; CASTILLO-RUIZ, M.; MORA, G. C. Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella* enterica Serovar Typhi. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 5, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005551> >.

RYCHLIK, J.; BARROW, P. A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.29, n.5, p. 1021-1040, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.005>>.

RYCHLIK, I; KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; VOLF, J.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; KUMMER, V.; IMRE, A.; SZAMOLKA, A.; NAGY, B. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BioMed Central Microbiology**, London, v. 9, n. 268, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-268>>.

RICHLYK, I.; ELSHEIMER-MATULOVA, M.; KYROVA, K. Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. **Veterinary Research**, London, v. 45, n.1, p. 119-133, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0119-2>>.

RUBIO, M. D. S.; PENHA FILHO, R. A. C.; ALMEIDA, A. M.; BERCHIERI JUNIOR, A. Development of a multiplex qPCR in real time for quantification and differential diagnosis of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum. **Avian Pathology**, London, v. 17, p. 1-8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2017.1339866>>.

SABBAGH, S. C.; FOREST, C. G.; LEPAGE, C.; LECLERC, J. M.; DAIGLE, F. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 305, n. 1, p. 1-13, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x>>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold spring harbor, 2001. v.1, p. 31-50.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity Islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 14-56, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.17.1.14-56.2004>>.

SETTA, A. M.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Exeter, v. 35, n. 5, p. 397-410, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.03.004>>.

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Pullorum disease and fowl typhoid. In: SAIF, Y. M.; FADLEY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of poultry**. 12th. ed. Ames: Iowa State Press, 2008. p.620-636.

SMITH, A. L.; BEAL, R. The avian enteric immune system in health and disease. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. (Ed.). **Avian Immunology**. 1. ed. Londres: Academic Press, 2008. p. 243-271.

SONCINI, F. C.; VÉSCOVI, E. G.; GROISMAN, E. A. Transcriptional autoregulation of the *Salmonella typhimurium* *phoPQ* operon. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 15, p. 4364-4371, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jb.177.15.4364-4371.1995>>.

SRIKUMAR, S.; KRÖGER, C.; HÉBRARD, M.; COLGAN, A.; OWEN, S. V.; SIVASANKARAN, S. K.; CAMERON, A. D.; HOKAMP, K.; HINTON, J. C. RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005262>>.

THOMPSON, J. A.; LIU, M.; HELAINE, S.; HOLDEN, D. W. Contribution of the PhoPQ regulon to survival and replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in macrophages. **Microbiology**, Washington, v. 157, n. 1, p. 2084-2093, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.048926-0>>.

UCHIYA, K.; BARBIERI, M. A.; FUNATO, K.; SHAH, A. H.; STAHL, P. D.; GROISMAN, E. A. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 18, n. 14, p. 3924-3933, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.14.3924>>.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; LEORI, G.; BERNARD, S.; CASADESÚS, J.; PLATT, D. J.; OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology and infection**, Cambridge, v. 125, n. 2, p. 229-255, 2000.

VÉSCOVI, E. G.; SONCINI, F. C.; GROISMAN, E. A. The role of the PhoP/PhoQ regulon in *Salmonella* virulence. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 5-6, p. 473-480, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0923-2508\(94\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0923-2508(94)90096-5)>.

VÉSCOVI, E. G.; SONCINI, F. C.; GROISMAN, E. A. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. **Cell**, Cambridge, v. 84, n. 1, p. 165-174, 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81003-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81003-X)>.

WATERMAN, S. R.; HOLDEN, D. W. Functions and effectors of *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 8, p. 501-511, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00294.x>>.

WIGLEY, P.; HULME, S.; POWERS, C.; BEAL, R.; SMITH, A.; BARROW, P. A. Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. **BMC Veterinary Research**, Londres, v.1, n.2, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-1-2>>.

WING, J. P. Transduction by phage P22 in a recombination-deficient mutant of *Salmonella typhimurium*. **Virology**, New York, n. 36, n. 2, p. 271-276, 1968. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(68\)90144-X](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(68)90144-X)>.

WITHANAGE, G. S.; WIGLEY, P.; KAISER, P.; MASTROENI, P.; BROOKS, H.; POWERS, C.; BEAL, R.; BARROW, P.; MASKELL, D.; McCONNELL, I. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 8, 5173-5182, 2005. Disponível em: <10.1128/IAI.73.8.5173-5182.2005>.

WOOD, M. W.; JONES, M. A.; WATSON, P. W.; SIBER, A. M.; McCORMIC, B. A.; HEDGES, S.; ROSQVIST, R.; WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 293-303, 2000.

WORLEY, M. J.; CHING, K. H.; HEFFRON, F. *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 749-761, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01902.x>>.

WÖSTEN, M. M.; KOX, L. F.; CHAMNONGPOL, S.; SONCINI, F. C.; GROISMAN, E. A. A signal transduction system that responds to extracellular iron. **Cell**, Cambridge, v. 103, n. 1, p. 113-125, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00092-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00092-1)>.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, , v. 13, n. 134, 2012. Disponível em: <10.1186/1471-2105-13-134>.

ZANCAN, F. B.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella* spp. investigation in transport box of day old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 230-232, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000300016>>.

ZEUGIN, J. A.; HARTLEY, J. L. Ethanol precipitation of DNA. **Focus**, Gaithersburg, v.7, n.4, p.1-2, 1985.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; BARROW, P. A. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine**, Amsterdam, v. 14, n. 20-21, p. 2538-2545, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00060-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00060-2)>.