

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

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE, COLONIZAÇÃO E
INVASÃO DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) POR
ESTIRPES DE *Salmonella* Enteritidis E *Salmonella*
Typhimurium CONTENDO DELEÇÕES NOS GENES *clpP* E
*fliD***

**Fernanda de Oliveira Barbosa
Médica Veterinária**

2020

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

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE, COLONIZAÇÃO E
INVASÃO DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) POR
ESTIRPES DE *Salmonella* Enteritidis E *Salmonella*
Typhimurium CONTENDO DELEÇÕES NOS GENES *c/pP* E
*fliD***

Discente: Fernanda de Oliveira Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Prof.Dr. Oliveiro Caetano de Freitas

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal.

2020

B238e **Barbosa, Fernanda de Oliveira**
Estudo da resposta imune, colonização e invasão de aves (*Gallus gallus domesticus*) por estirpes de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* contendo deleções nos genes *clpP* e *fliD* / Fernanda de Oliveira Barbosa. – Jaboticabal, 2020
90 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Angelo Berchieri Junior
Coorientador: Oliveiro Caetano de Freitas Neto

1. Aves. 2. Flagelo. 3. Mutagênese. 4. Paratifo. 5. Salmonelose. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE, COLONIZAÇÃO E INVASÃO DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) POR ESTIRPES DE *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium
CONTENDO DELEÇÕES NOS GENES *clpP* E *fljD*


AUTORA: FERNANDA DE OLIVEIRA BARBOSA

ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

COORIENTADOR: OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO
Departamento de Medicina Veterinária-UFMG / Belo Horizonte/MG


Profa. Dra. JULIANA PERIMER FALCÃO
Departamento de Ciências Farmacêuticas-FCRP/USP / Ribeirão Preto/SP


Jovem Pesquisador RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. RAPHAEL LUCIO ANDREATTI FILHO
Departamento de Clínica Veterinária-FMVZ/UNESP / Botucatu/SP


Pós-doutorando MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de março de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDA DE OLIVEIRA BARBOSA – Nascida em 22 de novembro de 1988, natural de Atibaia, São Paulo, graduou-se em Medicina Veterinária em outubro de 2013, pela Universidade Federal de Lavras. Durante a graduação foi monitora das disciplinas de “Citologia, Histologia e Embriologia” e “Imunologia”. Além disso, foi bolsista de iniciação científica, desenvolvendo projetos nas áreas de morfologia de mucosa ruminal de bovinos e expressão de agonistas de receptores em aves. Em março de 2014, iniciou o mestrado sob supervisão dos professores Angelo Berchieri Junior e Oliveira Caetano de Freitas Neto, sendo matriculada no programa de Medicina Veterinária, área de Patologia Animal pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP/Jaboticabal, com ênfase na importância do flagelo e motilidade em *Salmonella* Enteritidis durante infecção em aves. Em março de 2016, iniciou o doutorado no mesmo programa, realizando o estágio de doutorado no período entre junho e dezembro de 2018, sob supervisão do prof. John Elmerdalh Olsen, na Universidade de Copenhage, Dinamarca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Fátima e Wilian, por todo o apoio, amor e zelo. Sem vocês essa conquista não seria possível. A Gisele, Eric e todos familiares que torcem e compartilham minhas conquistas.

Ao meu orientador Angelo Berchieri, pela oportunidade de participar da equipe, estimular meu crescimento profissional e convivência diária.

Agradeço ao coorientador Oliveira por fornecer a idéia do projeto e todo apoio, dedicação, paciência durante esse período.

Agradeço a todos os membros equipe da Ornitopatologia que me ajudaram ao longo desses quatro anos. Aos colegas e funcionários dos departamentos de Patologia Animal e Tecnologia que me auxiliaram no uso de equipamentos, solução de problemas quando necessário e por toda convivência. Agradeço a todos os funcionários da UNESP que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Agradeço ao meu orientador do estágio de doutorado, prof. John Olsen, por me permitir participar de sua equipe. Aos amigos e colegas da Universidade de Copenhagen, agradeço a convivência e ensinamentos desse período.

Agradeço ao meu namorado Eduardo pelo amor, atenção, companheirismo e paciência.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho.

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro nos processos 2016/18340-0 e 2018/04883-8) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço aos membros da banca pelas sugestões feitas para melhoria do trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
CERTIFICADO DA COMISSÃO CTNBIO.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Taxonomia.....	3
2.2 Salmonelas paratíficas aviárias.....	3
2.3 Salmoneloses em aves.....	7
2.4 Patogenicidade de <i>Salmonella</i> em aves.....	9
2.5 Genes <i>clpP</i> e <i>fliD</i>	11
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Geral.....	15
3.2 Específicos.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Instalações experimentais.....	16
4.2 Bactérias, plasmídios e preparo dos mutantes.....	16
4.3 Mutagênese pela técnica do <i>Lambda-red</i>	18
4.3.1 Substituição do gene alvo pelo fragmento recombinante.....	20
4.3.2 Transdução.....	22
4.3.3 Retirada do marcador de antibiótico.....	23
4.4 Avaliação do fenótipo das estirpes mutantes.....	24
4.4.1 Teste de aglutinação flagelar.....	24
4.4.2 Análise de multiplicação bacteriana.....	25
4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	25
4.4.4 Infecção de macrófagos.....	26
4.5 Experimentos <i>in vivo</i>	27
4.5.1 Aves experimentais.....	27
4.5.2 Preparo do inóculo.....	27
4.5.3 Experimento 01 - avaliação da excreção fecal e mortalidade	28
4.5.4 Experimento 02: avaliação da infecção sistêmica e	
colonização intestinal	28
4.5.5 Experimento 03: estudo da resposta imune.....	29
4.5.6 Imunohistoquímica.....	29
4.5.7 PCR em tempo real.....	31
4.6 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Experimentos <i>in vitro</i>	31
5.1.1 Preparo dos mutantes.....	31
5.1.2 Teste de aglutinação flagelar.....	38
5.1.3 Curva de multiplicação bacteriana.....	38
5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	40

5.1.5 Infecção de macrófagos.....	40
5.2 Experimentos <i>in vivo</i>	41
5.2.1 Aves experimentais.....	41
5.2.2 Preparo do inóculo.....	41
5.2.3 Experimento 01: avaliação da excreção fecal e mortalidade.....	42
5.2.4. Experimento 02: avaliação da infecção sistêmica.....	43
5.2.5 Experimento 03: estudo da resposta imune.....	44
5.2.5.1 Imunohistoquímica.....	44
5.2.5.2 PCR tem tempo real.....	47
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÃO.....	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

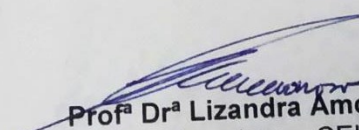
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo da resposta imune, colonização e invasão de aves (*Gallus gallus domesticus*) por estirpes de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* contendo deleções nos genes *clpP* e *fliD*”, protocolo nº 23042/15, 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 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da 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	210
Peso / Idade	35 gramas / 1 dia
Sexo	Macho
Origem	Hy-Line do Brasil LTDA

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2015.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
 Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

CERTIFICADO DA COMISSÃO CTNBio



4

ISSN 1677-7042

Diário Oficial da União - Seção 1

Nº 147, quarta-feira, 2 de agosto de 2017

Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

GABINETE DO MINISTRO

PORTARIA Nº 3.953/SEI, DE 25 DE JULHO DE 2017

O MINISTRO DE ESTADO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES, no uso de suas atribuições, observado o disposto no Decreto nº 5.371, de 17 de fevereiro de 2005, e na Portaria nº 6.738, de 21 de dezembro de 2015, resolve:

Art. 1º Autorizar NOVO INTERIOR COMUNICAÇÕES LTDA a executar o Serviço de Retransmissão de Televisão, ancilar ao Serviço de Radiodifusão de Sons e Imagens, em caráter secundário, com utilização de tecnologia digital no Município de SARAPUL, Estado de SÃO PAULO, por meio do canal 26 (vinte e seis), visando a retransmissão dos seus próprios sinais, por recepção via satélite.

Art. 2º Aprovar o local de instalação da estação e a utilização dos equipamentos, e autorizar o funcionamento em caráter provisorio, condicionado a autorização para uso da radiofrequência, nos termos do Processo nº 01250.015351/2017-45 e da Nota Técnica nº 15246/2017/SEI-MCTIC.

Art. 3º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

GILBERTO KASSAB

PORTARIA Nº 3.965/SEI, DE 25 DE JULHO DE 2017

O MINISTRO DE ESTADO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES, no uso de suas atribuições, observado o disposto no Decreto nº 5.371, de 17 de fevereiro de 2005, e na Portaria nº 6.738, de 21 de dezembro de 2015, resolve:

Art. 1º Autorizar TV ALIANÇA PAULISTA S.A. a executar o Serviço de Retransmissão de Televisão, ancilar ao Serviço de Radiodifusão de Sons e Imagens, em caráter secundário, com utilização de tecnologia digital no Município de CAMPO LIMPO PAULISTA, Estado de SÃO PAULO, por meio do canal 26 (vinte e seis), visando a retransmissão dos seus próprios sinais, por recepção via satélite.

Art. 2º Aprovar o local de instalação da estação e a utilização dos equipamentos, e autorizar o funcionamento em caráter provisorio, condicionado a autorização para uso da radiofrequência, nos termos do Processo nº 01250.007802/2017-18 e da Nota Técnica nº 14411/2017/SEI-MCTIC.

Art. 3º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

GILBERTO KASSAB

PORTARIA Nº 3.969/SEI, DE 25 DE JULHO DE 2017

O MINISTRO DE ESTADO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES, no uso de suas atribuições, observado o disposto no Decreto nº 5.371, de 17 de fevereiro de 2005, e na Portaria nº 6.738, de 21 de dezembro de 2015, resolve:

Art. 1º Autorizar FUNDAÇÃO JOSÉ DE PAIVA NETTO a executar o Serviço de Retransmissão de Televisão, ancilar ao Serviço de Radiodifusão de Sons e Imagens, em caráter secundário, com utilização de tecnologia digital no Município de FOZ DO IGUAÇU, Estado do PARANÁ, por meio do canal 30 (trinta), visando a retransmissão dos seus próprios sinais, por recepção via satélite.

Art. 2º Aprovar o local de instalação da estação e a utilização dos equipamentos, e autorizar o funcionamento em caráter provisorio, condicionado a autorização para uso da radiofrequência, nos termos do Processo nº 01250.004194/2017-90 e da Nota Técnica nº 14560/2017/SEI-MCTIC.

Art. 3º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

GILBERTO KASSAB

AGÊNCIA NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES
CONSELHO DIRETOR

PORTARIA Nº 1.042, DE 31 DE JULHO DE 2017

Fixa os indicadores e as metas institucionais para o 9º Ciclo Avaliativo.

O CONSELHO DIRETOR DA AGÊNCIA NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES, no uso das atribuições que lhe foram conferidas pelo art. 135 do Regimento Interno da Anatel, aprovado pela Resolução nº 612, de 29 de abril de 2013,

CONSIDERANDO a deliberação tomada por meio do Circulo Deliberativo nº 129, de 31 de julho de 2017;

CONSIDERANDO o constante dos autos do Processo nº 53500.061038/2017-10, resolve:

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/interativo.html>, pelo código 0001201708020004

Art. 1º Fixar, de acordo com o Anexo a esta Portaria, os indicadores e as metas institucionais da Anatel e seus respectivos pesos, para o período compreendido de 1º de agosto de 2017 a 31 de julho de 2018, em consonância com o art. 5º do Decreto nº 7.133, de 19 de março de 2010.

Art. 2º Esta Portaria passa a ter efeitos a partir de 1º de agosto de 2017.

JUAREZ MARTINHO QUADROS DO NASCIMENTO
Presidente do Conselho

ANEXO

Indicador	Meta	Responsável	Peso
Porcentual de Realização do Plano Operacional de Focalização - Ifof	Cumprir no ciclo, no mínimo, 70% das ações de focalização previstas no Plano Operacional de Focalização (POF) - <i>sem planejamento no ciclo</i>	SFR	-14,29
Taxa de Solicitações Registradas e Respondidas no prazo	90% das solicitações dos usuários respondidas no prazo	SRC	-14,29
Execução das Fases de Execução de Respostas	Execução de 100% das fases para os usuários respondidos	SFR	-14,29
Notificação de Débito Especificada	85% do quantitativo de débitos apontados a partir da notificação	SAF	-14,29
Taxa de Análise de Controle de Conformidade de Infraestrutura	Analisar 100% da soma de 80% dos centros de conformidade de infraestrutura submetidos à Anatel dentro do ciclo avaliativo, com a quantidade total de eventual passivo remanescente do ciclo anterior	SCP	-14,29
Tempo de Atendimento de Pedido de Homologação	80% das homologações atendidas em até 45 dias	SOR	-14,29
Integração de Pedos no Plano Regime	Incluir no prazo regimental 80% dos Pedos com prazo vencendo no ciclo	SCO	-14,29

SUPERINTENDÊNCIA DE OUTORGA
E RECURSOS À PRESTAÇÃO

ATO Nº 266, DE 19 DE JANEIRO DE 2017

Processo nº 53500.001520/2017-11. Outorga Autorização de Uso de Radiofrequência a TELEVISAO INDEPENDENTE DE SAO JOSE DO RIO PRETO LTDA, CNPJ 61.413.092/0001-26, executora do Serviço de Retransmissão de TV, na localidade de Sant Ana do Livramento/RS.

VITOR ELISIO GOES DE OLIVEIRA MENEZES
Superintendente

ATOS DE 20 DE JUNHO DE 2017

Nº 9.702 - Processo nº 53500.061522/2017-60. Outorga Autorização de Uso de Radiofrequência a EMMANUEL TELÉCOMUNICAÇÕES LTDA-EPP, CNPJ 23.206.796/0001-64, executora do Serviço de Retransmissão de Televisão, utilizando tecnologia digital, na localidade de Franca/SP.

Nº 9.708 - Processo nº 53500.061542/2017-31. Outorga Autorização de Uso de Radiofrequência a RADIO DIFUSORA DE UBERABA LTDA, CNPJ 25.421.330/0001-81, executora do Serviço de Radiodifusão Sonora em Onda Média, na localidade de Uberaba/MG.

VITOR ELISIO GOES DE OLIVEIRA MENEZES
Superintendente

ATOS DE 27 DE JUNHO DE 2017

Nº 9.896 - Processo nº 53500.054478/2017-31. Declara extinta, por renúncia, a partir de 18/04/2017, a autorização outorgada a HOINASKI & SKLASKY LTDA - ME, CNPJ/MF nº 09.385.611/0001-70, por intermédio do Ato nº 6.280, de 04/07/2014, publicado no DOU de 11/07/2014, para explorar o Serviço de Acesso Condicionado, por prazo indeterminado, em todo o território nacional.

Nº 9.898 - Processo nº 53500.054478/2017-31. Declara extinta, por renúncia, a partir de 18/04/2017, a autorização outorgada a HOINASKI & SKLASKY LTDA - ME, CNPJ/MF nº 09.385.611/0001-70, por intermédio do Ato nº 6.281, de 04/07/2014, publicado no DOU de 11/07/2014, para explorar o Serviço Telefônico Fixo Comutado, por prazo indeterminado, em todo o território nacional.

VITOR ELISIO GOES DE OLIVEIRA MENEZES
Superintendente

ATO Nº 10.830, DE 3 DE JULHO DE 2017

Processo nº 53500.018842/2007-28. Declara extinta, por renúncia, a partir de 14/06/2017, a autorização outorgada a INFOMAX PROVEDOR DE ACESSO À INTERNET LTDA, CNPJ/MF nº 08.899.636/0001-29, por intermédio do Ato nº 5809, de 07/10/2009, publicado no DOU de 15/10/2009, para explorar o Serviço de Comunicação Multimídia, por prazo indeterminado, em todo o território nacional.

VITOR ELISIO GOES DE OLIVEIRA MENEZES
Superintendente

ATO Nº 10.883, DE 4 DE JULHO DE 2017

Processo nº 53500.061808/2017-45. Espada autorização a MARIA DO SOCORRO ALEXANDRINO CARDOSO - ME, CNPJ/MF nº 14.861.219/0001-90, para explorar o Serviço de Comunicação Multimídia, por prazo indeterminado, em todo o território nacional.

VITOR ELISIO GOES DE OLIVEIRA MENEZES
Superintendente

ATO Nº 10.526, DE 20 DE JULHO DE 2017

Processo nº 53500.065419/2017-99. Autoriza a substituição de subfrazas de radiofrequências autorizadas associadas ao Distrito de Exploração, no Brasil, do satélite estrangeiro Eutelsat S West B.

VITOR ELISIO GOES DE OLIVEIRA MENEZES
Superintendente

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL
DE BIOSSEGURANÇA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 5.487/2017

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 3º, inciso XIX do Decreto 5.391/05, torna público que na 201ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 06 de abril de 2017, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01200.706006/2016-76

Requerente: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual "Julio Mesquita" de São Paulo - Campus Jaboticabal - UNESP Jaboticabal.
CQB: 88/98

Endereço: Prof. Paulo Donato Castellani s/n - Departamento de Biologia, Jaboticabal - SP CEP: 14884-900.

Assunto: Solicitação de parecer para projeto de pesquisa com OGM da classe de risco II nas instalações da instituição.

Extrato Prévio: 5384/2016, publicado no DOU em 20 de janeiro de 2017.

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação da solicitação de parecer para projeto de pesquisa com OGM da classe de risco II nas instalações da instituição, concluiu pelo deferimento, nos termos deste Parecer Técnico. O presidente da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal, Dr. Odair Aparecido Fernandes, solicita à CTNBio parecer técnico para projeto de pesquisa com OGM da classe II de risco biológico. O projeto a ser executado denomina-se: "Avaliação da patogenicidade de estirpes mutantes de *Salmonella* spp. em aves comerciais", sob a responsabilidade do Dr. Angelo Berchieri Junior. O projeto envolve a utilização de bactérias *Salmonella* entérica subespécie entérica serotipo entérica (*Salmonella gallinarum*). As instalações a serem utilizadas durante a execução do projeto são as do Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária, sob responsabilidade do Dr. Angelo Berchieri Junior. O pesquisador responsável declara que os laboratórios dispõem de infraestrutura adequada e pessoal técnico capaz de gerir o risco associado à atividade proposta. No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.391/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende as normas da CTNBio e a legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

A íntegra deste Parecer Técnico consta do processo arquivado na CTNBio. Informações complementares ou solicitações de maiores informações sobre o processo acima listado deverão ser encaminhadas por escrito à Secretaria Executiva da CTNBio.

EDIVALDO DOMINGUES VELDI

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 5.488/2017

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 3º, inciso XIX do Decreto 5.391/05, torna público que na 201ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 06 de abril de 2017, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01200.706019/2016-45

Requerente: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual "Julio Mesquita" de São Paulo - Campus Jaboticabal - UNESP Jaboticabal.
CQB: 88/98

Endereço: Prof. Paulo Donato Castellani s/n - Departamento de Biologia, Jaboticabal - SP CEP: 14884-900.

Assunto: Solicitação de parecer para extensão de Certificado de Qualidade em Biossegurança para as instalações da instituição com nível de biossegurança NB-1.

Extrato Prévio: 5384/2016, publicado no DOU em 20 de janeiro de 2017.

Decisão: DEFERIDO

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE, COLONIZAÇÃO E INVASÃO DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) POR ESTIRPES DE *Salmonella* Enteritidis E *Salmonella* Typhimurium CONTENDO DELEÇÕES NOS GENES *clpP* E *fliD*

RESUMO – *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium causam infecções em seres humanos e animais que são frequentemente associadas à extensa colonização intestinal e excreção fecal. A presença de estrutura flagelar no patógeno está relacionada à indução de inflamação intestinal e atenuação de infecção sistêmica no hospedeiro. Por outro lado, a infecção por estirpes aflageladas resulta em pouca inflamação e consequente infecção sistêmica grave. No presente estudo, foi avaliada a hipótese de que a síntese de maior quantidade de flagelina em estirpes de *Salmonella* geneticamente modificadas poderia levar a infecção sistêmica menos intensa em aves. Para investigar as consequências da superprodução de flagelina, foram construídas estirpes de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium contendo deleções nos genes *clpP* e *fliD* (que levam à superexpressão de flagelina) e patogenicidade e imunogenicidade foram comparadas com as respectivas estirpes selvagens em aves infectadas. Os resultados indicaram que o aumento da síntese de flagelina por SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ culmina em déficit da taxa de multiplicação bacteriana. Porém, tais alterações não interferiram na capacidade de colonização cecal e excreção fecal das estirpes mutantes. O mesmo foi observado em fígado e baço, mas após 14 dpi as estirpes mutantes tendem a serem eliminadas destes órgãos. Mesmo com síntese mais elevada de flagelina, as estirpes mutantes recrutaram quantidades semelhantes de linfócitos e macrófagos em tonsila cecal, baço e fígado que as estirpes selvagens. Infecções por STM $\Delta clpP\Delta fliD$ produziram sinais clínicos mais brandos em comparação à STM, e alta produção de IL22 em 7 dpi. Enquanto que SE $\Delta clpP\Delta fliD$ desencadeou sinais clínicos semelhantes aos induzidos por SE, porém, com níveis mais elevados de IL22 e IL18, porém com repressão de CCL4, CXCLi2 e IL17 em no intestino no início da infecção. Ao que tudo indica a maior produção de flagelina por ambas as estirpes mutantes alteraram a patogenicidade, possivelmente por alterarem a ativação e modulação do sistema imune da ave.

Palavras-chaves: aves, flagelo, mutagênese, paratifo, salmonelose.

STUDY OF IMMUNE RESPONSE, COLONIZATION AND INVASION OF CHICKENS (*Gallus gallus domesticus*) BY STRAINS OF *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium CONTAINING DELETIONS IN THE *clpP* AND *fliD* GENES

ABSTRACT - *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium cause infections in humans and animals that are often associated with extensive intestinal colonization and faecal shedding. The presence of flagellar structure in the pathogen is related to the induction of intestinal inflammation and attenuation of systemic infection in the host. On the other hand, the absence of flagellin results in severe systemic infection as a result of mild inflammatory intestinal responses provoked by aflagellated strains. The hypothesis that higher flagellin production by *Salmonella* strains could induce immunogenic response during infection in chickens was evaluated in the present study. To investigate the consequences of flagellin overproduction, strains of *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium containing *clpP* and *fliD* deletions (which lead to flagellin overexpression) were constructed, and pathogenicity and immunogenicity were compared with their respective wild-type strains in infected chickens. The results suggested that the increase in flagellin synthesis by SE $\Delta clpP\Delta fliD$ and STM $\Delta clpP\Delta fliD$ culminates in a deficit in the bacterial multiplication rate. However, that changes did not interfere with the capacity for caecal colonization and faecal excretion of mutant strains. The same was observed in the liver and spleen, but after 14 dpi, mutant strains tend to be eliminated from these organs. Even with higher flagellin synthesis, the mutant strains recruited similar amounts of lymphocytes and macrophages in the caecal tonsil, spleen and liver than wild-type strains. and high IL22 production at 7 dpi. While SE $\Delta clpP\Delta fliD$ triggered clinical signs similar to those induced by SE, but with higher levels of IL22 and IL18, but with repression of CCL4, CXCLi2 and IL17 in the intestine at the beginning of the infection. Apparently, the higher production of flagellin by both mutant strains altered the pathogenicity, possibly by altering the activation and modulation of the chicken's immune system.

Keywords: birds, flagellum, fowl paratyphoid, mutagenesis, salmonellosis

LISTA DE ABREVIATURAS

ATPase: adenosinatrifosfatases

°C: graus celsius

CCL4: Quimiocina C-C Ligante 4

clpP: protease caseinolítica P

clpX: Protease Clp dependente de ATP A subunidade de ligação a ATP do tipo clpX

C1: Iniciador reverso de verificação de inserção do cassete de cloranfenicol

C2: Iniciador direto de verificação de inserção do cassete de cloranfenicol

cDNA: Ácido Desoxirribonucléico complementar

CXCLi2: Quimiocina ligante CXC de número dois de galinhas

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DTAs: doenças transmitidas por alimentos

fliD: proteína da extremidade flagelar

h :hora

IFN: interferon

IL-1 β : interleucina um beta

IL6 : interleucina seis

IL17: interleucina dezessete

IL18: Interleucina dezoito

IL22: interleucina vinte e dois

IL8: Interleucina oito

K1: Iniciador reverso de verificação de inserção do cassete de canamicina

K2: Iniciador direto de verificação de inserção do cassete de canamicina

LB: lisogenia

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

Min: minutos

mm: milímetro

mL: mililitro

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

OD: densidade óptica

qPCR: reação em cadeia pela polimerase em tempo- real

Rpm: rotações por minuto

PCR: reação em cadeia pela polimerase

SE selvagem: estirpe selvagem de *Salmonella* Enteritidis P125109

SE $\Delta clpP\Delta fliD$: estirpe mutante proveniente de *Salmonella* Enteritidis P125109 contendo deleções nos genes *clpP* e *fliD*

SPI: ilhas de patogenicidade

STM selvagem: estirpe selvagem de *Salmonella* Typhimurium F98

STM $\Delta clpP\Delta fliD$: estirpe mutante proveniente de *Salmonella* Typhimurium F98 contendo deleções nos genes *clpP* e *fliD*

spp.: gênero

μ m: micrometro

TLR: receptores do tipo toll

%: porcentagem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Contagem de microrganismos viáveis obtidos por diluição seriada de cada cultura microbiana.....	42
Tabela 2. Mortalidade de aves desafiadas no primeiro dia de vida com estirpes de STM Δ clpP Δ fliD, STM selvagem, SE Δ clpP Δ fliD e SE selvagem.....	42
Tabela 3. Número de amostras positivas pelo número de aves examinadas por suabes cloacais desafiados com SE Δ clpPfliD, SE selvagem, STM Δ clpPfliD e STM selvagem para avaliação da excreção fecal.....	43

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1. Representação da degradação de substrato pelo *clpP*. Adaptado de Kirstein et al, 2009.....11
- Figura 2. Representação da localização estrutural da proteína *fliD* no filamento flagelar. Adaptado de Song et al., 2017.....13
- Figura 3. Eletroferograma em agarose 1,5 %, utilizando marcador de tamanho molecular 1 kb (GeneRuler DNA Ladder), ilustrando a amplificação dos fragmentos utilizando o DNA molde de *pKD3* (esquerda) e *pKD4* (direita) respectivamente.....35
- Figura 4. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados para o gene *fliD*. MM: Marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Colunas 2, 5 e 8: mutante *fliD* (contendo o plasmídeo *pkd3*) 1, 4 e 7: selvagem; 3, 6 e 9: controle negativo.....37
- Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados para o gene *clpP*. MM: Marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Colunas 2, 5 e 8: mutante *clpP* (contendo o plasmídeo *pDK3*) 1, 4 e 7: selvagem; 3, 6 e 9: controle negativo.....38
- Figura 6. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % demonstrando tamanho de fragmentos após retirada do marcador de antibiótico. M: 1 kb Ladder, 1: gene *clpP*, 2: gene *fliD*.....37
- Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % de diferenciação entre estirpes de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. M) Marcador Molecular (100pb); 1) Branco – adição de água ultrapura; 2) Amostra de DNA de *S. Enteritidis* (206pb); 3) Amostra de DNA de *S. Typhimurium* (62pb).....38
- Figura 8. Curva de multiplicação bacteriana das estirpes utilizadas no estudo, as quais foram mensuradas em densidade óptica de 600 nm em intervalos de uma hora. (*): comparação A - SE x SE $\Delta clpP\Delta fliD$ ($P < 0.05$); (**) comparação B - STM x STM $\Delta clpP\Delta fliD$ ($P < 0.05$).....39

- Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura de SE $\Delta clpP\Delta fliD$ (A) e SE (B). As setas brancas em A e B indicam a formação do filamento.....40
- Figura 10. Sobrevivência intracelular de SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ durante infecção em células mononucleares primárias de sangue periférico de galinhas em zero, seis e 24 horas pós-infecção. (*): comparação A - SE x SE $\Delta clpP\Delta fliD$ ($P < 0.05$).....41
- Figura 11. Contagem de SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal por dia de colheita. Média do número viável (Log_{10} UFC/g) de SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ em conteúdo cecal, no fígado e no baço de aves experimentalmente infectadas no primeiro dia de vida. (*): comparação A - SE x SE $\Delta clpP\Delta fliD$ ($P < 0.05$).....44
- Figura 12. Porcentagem da população de linfócitos T CD4+ em tonsilas cecais, baço e fígado de aves de um dia de vida não-infectadas e infectadas com SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta fliD$. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística ($P < 0.05$).....45
- Figura 13. Porcentagem da população de linfócitos T CD8+ em tonsilas cecais, baço e fígado de aves de um dia de vida não-infectadas e infectadas com SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta fliD$. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística ($P < 0.05$).....46
- Figura 14. Porcentagem da população de linfócitos macrófagos em tonsilas cecais, baço e fígado de aves de um dia de vida não-infectadas e infectadas com SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta fliD$. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística ($P < 0.05$).....47
- Figura 15. Porcentagem da população de linfócitos macrófagos em tonsilas cecais, baço e fígado de aves de um dia de vida não-infectadas e infectadas com SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM selvagem e STM

ΔclpPΔfliD. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística ($P < 0.05$).....49

Figura 16. Níveis de expressão gênica de CCL4, CXCLi2 e IL6 em baços de aves infectadas com SE, SE *ΔclpPΔfliD*, STM, STM *ΔclpPΔfliD* e aves não-infectadas em 1, 3, 7 e 14 dpi. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística ($P < 0.05$).....50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Iniciadores utilizados neste estudo.....	17
Quadro 2. Plasmídios utilizados nesse estudo.....	18
Quadro 3. Oligonucleotídeos de genes de referência utilizados para PCR em tempo real.....	32
Quadro 4. Oligonucleotídeos utilizados na qPCR	34
Quadro 5. Eficiência, R ² , Y-“intercept” e “slope” de reações de qPCR realizadas para seleção do gene de referência.....	48

1 INTRODUÇÃO

Salmonella spp. são bactérias Gram-negativas, em formato de bastonetes, que pertencem à família Enterobacteriaceae. Atualmente, mais de 2659 sorovares foram identificados mundialmente, e muitos são capazes de causar infecções em seres humanos e animais. Entre esses, apenas os biovars *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum são imóveis por não possuírem flagelos, enquanto que a maioria dos demais sorovares é móvel devido presença de flagelos peritricos.

No estágio inicial da colonização gastrointestinal, *Salmonella* spp. utiliza motilidade mediada por flagelos para atingir o íleo distal e o ceco. A flagelina, principal proteína do flagelo bacteriano, contribui para a inflamação intestinal ao sinalizar receptores do tipo NOD e TLR-5. Essa ativação desencadeia cascata imunológica que estimula as respostas imunes inatas e adaptativas, contribuindo para restringir a disseminação de *Salmonella* spp. do intestino para sítios sistêmicos. Por outro lado, a ausência de flagelos em algumas estirpes de *Salmonella* spp., favorece o desencadeamento de infecção sistêmica grave.

A síntese do flagelo bacteriano é um processo complexo regulado por vários genes transcricionais globais, tais como *fliD* e *clpP*. FliD é uma proteína apical que ocupa temporariamente posição no lugar de flagelina nascente até que uma nova cópia chegue ao final crescente do filamento, impedindo que esta vaze para o ambiente. Portanto, quando o *fliD* está ausente, os monômeros de flagelina são continuamente secretados.

A protease ClpXP, composta pelas subunidades ClpX e ClpP, está envolvida no controle da qualidade das proteínas e na determinação da meia-vida de vários reguladores flagelares, como *RpoS* e *FliDC*. Quando o *clpP* é deletado do genoma, o complexo regulador principal do flagelo *FliDC* não é degradado e grandes quantidades de flagelina são sintetizadas. Portanto, as deleções nos genes *clpP* e *fliD* levam à superexpressão de flagelina.

Nesse contexto, o fato que presença de estrutura flagelar no patógeno está relacionada à indução de inflamação intestinal e atenuação de infecção sistêmica no hospedeiro. Por outro lado, a infecção por estirpes aflageladas resulta em pouca inflamação e conseqüente infecção sistêmica grave, o propósito desse estudo foi investigar as conseqüências da superprodução de flagellina em *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (STM) na infecção e respostas imunes desencadeadas por essas estirpes em aves.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia

Em 1880, Eberth descreveu um bacilo isolado em cortes de nódulos em baço e linfonodos mesentéricos em paciente com febre tifoide. Posteriormente, a nomenclatura deste microorganismo foi modificada diversas vezes, sendo atualmente aceito o esquema descrito por Popoff, Bockemühl e Hickman-Brenner (1996), no qual o gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, constituída por mais de 2.659 sorovares (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

O gênero é dividido em duas espécies, sendo a primeira denominada *enterica* (2.637 sorotipos), subdividida em seis subspecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Os demais sorovares pertencem a segunda espécie denominada de *bongori* formada por apenas 22 sorovares (Grimont e Weill, 2007).

Os sorovares de *Salmonella* spp. são diferenciados por meio da estrutura antigênica dos antígenos somáticos (O), capsulares (Vi) e flagelares (H), segundo esquema conhecido como Esquema White-Kauffmann-Le Minor (Grimont e Weill, 2007), que é baseado em propriedades bioquímicas e sorológicas. O antígeno de virulência (Vi) pode ser identificado somente em sorovares específicos como *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin* (Grimont e Weill, 2007).

Os antígenos somáticos O são polissacarídeos termoestáveis constituintes da porção mais externa da parede bacteriana, comum a todos os sorovares do gênero *Salmonella* e são identificados por números arábicos (Le Minor, 1982; Holt et al., 1994). Sorogrupos (designados com letras maiúsculas) são organizados de acordo com antígenos somáticos.

Os antígenos H são proteínas flagelares, conhecidas por flagelinas, encontradas nas enterobactérias móveis e designadas com letras minúsculas (fase 1) e por números arábicos (fase 2), codificadas pelos genes *fliC* e *fljB*, respectivamente (Echeita et al., 2002; Ferreira e Campos, 2008). A combinação dos antígenos O e H determinam o sorotipo. Portanto, *S. enterica* sorovar Enteritidis (SE) é classificada com base nos antígenos da sorotipagem da bactéria para identificar o antígeno somático (O:1,9,12) e antígeno flagelar de fase 1 (H: g,m) (Grimont e Weill,

2007; Brenner e Farmer, 2015). Algumas estirpes se SE podem apresentar o antígeno flagelar H:p ou H:f ou H:t. Excepcionalmente podem ter o antígeno de segunda fase H:1,7. (Grimont e Weill, 2007).

A nomenclatura correta para o gênero deve ter a primeira letra do nome do sorovar maiúscula e sem itálico, podendo ser escrito todo o nome da bactéria. *S. Typhimurium* torna-se *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ou apenas *Salmonella* serovar Typhimurium. Somente sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* recebem nomes (geralmente geográficos). Sorovares de outras subespécies são designados pela sua fórmula O: H.

As bactérias dessa família possuem formato de bacilos, cujo tamanho varia de 0.3–1.0 × 1.0–6.0 µm de comprimento. Esses são móveis pela presença de flagelos peritríqueos, Gram-negativas, anaeróbicas facultativas e não formam esporos ou microcistos. A maioria dos sorovares possuem fímbrias e raramente encapsulam (Brenner e Farmer, 2015). Desenvolvem-se bem à temperatura de 37 °C, formando colônias em torno de 2 - 4 mm de diâmetro, arredondadas, com bordas lisas, pouco elevadas e brilhantes (Holt et al., 1994). São capazes de metabolizar nutrientes, produzir gás a partir da fermentação de glicose, manitol, dulcitol e não fermentação de sacarose, malonato ou lactose. A maioria produzem gás sulfídrico (H₂S), utilizam citrato como fonte de carbono, reduzem nitrato a nitrito, não hidrolizam uréia, são oxidase negativa, catalase positiva e não produzem urease e indol. A maioria descarboxila lisina e ornitina, não desaminam os aminoácidos fenilalanina e triptofano (Holt et al., 1994).

2.2 Salmonelas paratíficas aviárias

A especificidade da infecção por sorovares de *Salmonella* spp. podem ser definidas em específicas, restritas e generalistas, com implicações importantes para epidemiologia e saúde pública (Gal-Mor, Boyle e Grassi, 2014). Sorovares hospedeiros-específicos somente causam infecção em uma espécie hospedeira, tais como, *Salmonella* Typhi e Paratyphi A em seres humanos e *Salmonella Gallinarum* biovars Gallinarum e Pullorum em aves. Nesses casos, a infecção sistêmica caracterizada por baixa morbidade e alta mortalidade (Baümmler e Fang, 2013).

Os sorovares restritos estão predominantemente associados a uma espécie hospedeira, mas também podem causar infecções em outras espécies. Por exemplo, *Salmonella* Dublin é adaptada a bovinos, mas as infecções em humanos também foram relatadas (Hoelzer, Switt e Wiedmann, 2011).

Por fim, os sorovares generalistas, como *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis, geralmente causam infecções em ampla gama de hospedeiros, (Gal-Mor, Boyle e Grassi, 2014). As infecções com sorovares generalistas são frequentemente caracterizadas por alta morbidade, baixa mortalidade e o sinal clínico predominante são os sintomas gastrointestinais (Baümler e Fang, 2013).

Diversos sorovares de *Salmonella* spp. podem estar presentes nos ambientes de sistemas de produção animal, tais como de aves, suínos e bovinos (Marus et al., 2019). A presença de *Salmonella* spp. em produtos de origem animal destinados ao consumo humano é a principal fonte responsável por surtos de infecção alimentar (Rukambile et al., 2019)

Nestes casos, os seres humanos geralmente apresentam febre, cefaleia, cólica abdominal e diarreia entre 12 a 72 horas após o consumo de alimentos ou bebidas contaminadas (Basler et al., 2016). Geralmente, a infecção persiste de quatro a sete dias e a recuperação ocorre sem tratamento com antimicrobianos, embora os sintomas sejam mais graves e duradouros em crianças. No entanto, nos casos em que a perda de líquidos é substancial, pode ser necessária a reidratação oral ou intravenosa (Kurtz et al., 2017).

Certos grupos de pessoas são particularmente suscetíveis a doenças transmitidas por alimentos, incluindo crianças, idosos, gestantes e pessoas cujo sistema imunológico é suprimido por enfermidades ou medicação (Lund, 2015). Nestes casos, pode ocorrer disseminação da bactéria do intestino para corrente sanguínea atingindo outros órgãos, exigindo o tratamento. Em casos mais graves, pode causar a morte (Eng et al., 2005). Poucas pessoas infectadas com *Salmonella* desenvolvem dor nas articulações, conhecida como artrite reativa, que pode durar meses ou anos e pode levar à artrite crônica, a qual é de difícil tratamento (Hayes et al., 2019).

Já os casos de infecção alimentar podem ser evitados com adoção de medidas de controle prevenção em todas as etapas da produção de alimentos,

desde a produção agrícola, criação de animais de produção, processamento do alimento na indústria, preparação nos estabelecimentos comerciais e até mesmo nas residências e cozinhas industriais (Freitas Neto et al., 2010; Rahman et al., 2018). O manuseio seguro da carne, higiene e preparo do alimento podem prevenir ou reduzir o risco representado pelos alimentos contaminados (Ford et al., 2018). Além dos produtos de origem animal, sabe-se que há outras fontes de infecção como frutas e vegetais, que são comercializados *in natura* (Elias, Decol e Tondo, 2018).

Todos os anos nos Estados Unidos, cerca de um milhão de pessoas são acometidas pela enfermidade, e estima-se prejuízo econômico médio de 3,7 bilhões de dólares (USDA, 2014). De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), os surtos anuais acometem em média 1,2 milhão de pacientes, ocorrendo 23 mil hospitalizações e 450 mortes nos Estados Unidos (CDC, 2018).

No Brasil, em relatório publicado no ano de 2015, pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), embora a incidência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) no país tenha reduzido 35% em relação ao último relatório publicado em 2014, em 58,8% dos surtos não foi realizado o isolamento e identificação dos patógenos envolvidos nesses surtos. Entretanto, quando o agente foi identificado, 14,3% desses isolados foram provenientes de bactérias do gênero *Salmonella* spp., sendo o patógeno mais isolado dentre as amostras analisadas (Brasil, 2015).

Devido à subnotificação, os dados da ocorrência de infecções alimentares por *Salmonella* spp. no Brasil não são precisos. A maioria dos dados disponíveis é do Sul e Sudeste do país, locais que possuem melhores indicadores de desenvolvimento e maior densidade populacional. Além disso, os laboratórios oficiais brasileiros costumam investigar apenas microrganismos clássicos transmitidos por alimentos, mas não agentes etiológicos emergentes (Ritter e Tondo, 2014). Porém, quando há levantamento de dados como o realizado pelo Instituto Adolfo Lutz no ano de 2014, observa-se a presença de *S. Typhimurium* (63,9%) e *S. Enteritidis* (15%) no Estado de São Paulo, fato que confirma a prevalência desses sorovares nos surtos por DTAs (Lourenço et al., 2016).

2.3 Salmoneloses em aves

Salmoneloses aviárias são um complexo de três enfermidades: o tifo aviário, causado por *S. Gallinarum* (SG), a pulorose, cujo agente é *S. Pullorum* (SP) e o paratifo aviário, causado por qualquer *Salmonella* que não sejam os biovares citados (Gast, Shivaprasad, Barrow, 2008). SG é caracterizada por induzir infecção sistêmica aguda, com taxas de mortalidade atingindo 80% dos animais afetados em qualquer idade e animais infectados manifestam sonolência, asas caídas, penas arrepiadas, anorexia e diarreia verde-amarelada (Shivaprasad, 2000).

SP é uma grave enfermidade septicêmica que causa alta morbidade e mortalidade em aves jovens, especialmente em recém-nascidos, manifestando sinais clínicos semelhantes ao tifo aviário, mas com presença de diarreia líquida e branca (Barrow e Freitas Neto, 2011). Ambos biovares são patógenos hospedeiro-específicos de aves, similares entre si, pois compartilham os antígenos somáticos 1,9 e 12, que dificulta a distinção por métodos sorológicos convencionais, sendo a diferenciação realizada mediante características bioquímicas ou moleculares (Batista et al., 2016).

Os sorovares paratíficos são caracterizados por eficiente colonização intestinal, excreção fecal e manifestação de infecção sistêmica envolvendo o sistema reticuloendotelial (Gast et al., 2019). Em geral, o gênero tem predileção pelo trato digestivo de humanos e de animais. Portanto, a presença de *Salmonella* em outros habitats como água, ambiente e em produtos alimentícios representam contaminação fecal (Jajere, 2019).

Infecções por *Salmonella* em aves ocorrem em múltiplas idades por diversas fontes, sendo moscas, roedores, animais domésticos, pombos, ração e os seres humanos importantes veiculadores (Gast, 2007; Dar et al., 2017). Geralmente galinhas e perus são colonizados por *Salmonella* sem apresentarem sinais clínicos evidentes (infecções subclínicas) por transmissão vertical ou horizontal (Zamora-Sanabria e Alvarado, 2017).

Na transmissão vertical, a principal forma de contaminação seria pelo contato direto das fezes com a casca do ovo durante sua passagem pela cloaca ou no meio

ambiente com material contaminado. Durante este processo, a penetração de bactérias é favorecida pela pressão negativa formada pela diferença de temperatura entre o ambiente e ovo pós-eclosão (Messens, Grjspeerdt e Herman, 2005). No entanto, pode também ocorrer contaminação pela via transovariana. Nesse caso a gema, é diretamente contaminada por *Salmonella* spp. a qual está infectando órgãos reprodutivos das galinhas (Messens, Grjspeerdt e Herman, 2005; Gast, 2007).

Em aves, os sorovares paratíficos podem provocar sinais clínicos que variam de acordo com a idade e a condição imunológica, o sorovar e a intensidade da infecção. Em geral, são mais evidentes em aves com sistema imune imaturo, ou seja, em aves jovens (Gama, Berchieri Junior e Fernandes, 2003; Gast, 2020). Sinais de infecção severa em aves jovens são geralmente semelhantes a aqueles observados em outras bactérias que causam septicemia aguda (Gast, 2020).

Em aves com mais de 14 dias de vida, normalmente não há o aparecimento de sinais clínicos, ou aparecem de maneira discreta no lote acometido. Ocorre retardo no crescimento e piora nos índices zootécnicos, sejam em aves destinadas à produção de carne ou de ovos, devido ao acometimento do trato intestinal com um quadro leve de enterite (Berchieri Junior e Freitas Neto, 2009). Embora as infecções paratíficas em aves adultas não sejam caracterizadas por manifestação de sinais clínicos, alguns isolados de SE podem causar perda de apetite, diarreia e reduzir produção de ovos em poedeiras infectadas experimentalmente (Shivaprasad, 1990)

Durante infecção, alterações macroscópicas em cecos são caracterizadas inicialmente por diminuição de volume, espessamento de parede e conteúdo líquido que se torna caseoso de coloração branca a brancoamarelada, podendo conter partes avermelhadas ou enegrecidas. Baço e fígado tornam-se congestos, edemaciados com hemorragias e pontos necróticos. Os rins congestos e aumentados. Hepatite e pericardite fibrinopurulentas podem também ser observadas. Os pintinhos possuem gema não reabsorvida, coagulada, necrótica e caseosa. Outras alterações, menos comuns, seriam panofthalmia artrite purulenta, aerosaculite e onfalite. Aves adultas podem apresentar atrofia de ovário, folículos alterados (murchos, hemorrágicos e caseosos), morbidade e mortalidade (Berchieri Junior e Freitas Neto, 2009; Gast 2019).

A presença de *Salmonella* spp. em animais é um importante fator de risco na contaminação de ovos de mesa e produtos derivados da produção avícola para seres humanos (Hugas e Beloil, 2014). Casos de infecção alimentar por *Salmonella* spp. são comuns em todo o mundo e são consequência da ineficiência ou ausência de programas de controle para reduzir a contaminação ao longo da cadeia produtiva de alimentos (Yue e Schifferli, 2013).

2.4 Patogenicidade de *Salmonella* em aves

A principal forma de infecção por *Salmonella* spp. ocorre por meio da rota fecal-oral (Adhikari et al., 2017). As bactérias invadem o epitélio intestinal e colonizam órgãos internos, como fígado e baço, após poucas horas de inoculação, eventualmente atingem o trato reprodutivo (He et al., 2010; Gast et al., 2019). No intestino, ocorre multiplicação no lúmen e adaptação da expressão gênica para o novo ambiente. *Salmonella* adere às células epiteliais intestinais com auxílio de diferentes adesinas fimbriais ou não-fimbriais (Richlyk, Elsheimer-Matulova, Kyrova, 2014).

Salmonella spp. possuem diversos fatores de virulência, dentre eles as ilhas de patogenicidade (“*Salmonella* Pathogenicity Island” -SPI), grandes regiões do cromossomo que codificam vários fatores de virulência (Foley et al., 2013). O Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3), codificado pela ilha de patogenicidade do tipo 1, permite a injeção de proteínas efetoras bacterianas diretamente no citoplasma da célula hospedeira, ignorando o meio extracelular (Coburn, Sekirov e Finlay, 2007).

As proteínas efetoras interagem com domínios de proteínas e desencadeiam série de reações, induzindo o rearranjo do citoesqueleto de actina da célula hospedeira, que facilita a captação de vacúolos contendo *Salmonella* spp. (Galan, 2001). Após invasão, as bactérias permanecem dentro de um fagossomo modificado denominado vacúolo contendo *Salmonella*, dentro do qual sobrevivem e se replicam (Steele-Mortimer, 2008). Outro papel de SPI- 1 está associado à expressão de proteínas responsáveis pela produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no epitélio intestinal, que leva a infiltração de leucócitos polimorfonucleares

mediados por IL8, e um segundo grupo de proteínas efetoras causa sintomas clínicos como diarreia no hospedeiro (Hensel, 2004).

Durante o processo de ataque e internalização, PAMPs (Padrão Molecular Associado à Patógenos) como a flagelina e LPS (lipopolissacarídeos) ativam o sistema imune do hospedeiro quando são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), entre eles, receptores do tipo Toll (TLR) (Janeway e Medzhitov, 2002; Yang et al., 2012).

Os TLRs são moléculas transmembranas com duas porções, uma externa, particular para cada TLR, responsável pelo reconhecimento dos PAMPs, e uma cauda intracelular para reconhecimento do receptor para a interleucina (IL-1 β) (Gay e Kaith, 1991). A flagelina é detectada pelos TLR-5 e irá ativar genes da resposta inflamatória via Myd88 estimulando, inicialmente, NF- κ B e fatores responsivos a IFN (Interferon), culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo 1 (Yamamoto, Takeda e Akira, 2004; Buzzo et al., 2010).

Outra família de receptores para padrões moleculares são os do tipo NOD (“Nucleotide-binding oligomerization domain”) que reconhecem a flagelina no citoplasma (Lee e Kim, 2007). Em seguida, ativam a enzima caspase-1, culminando na produção de IL1 β e IL18 (Buzzo et al., 2010). Uma vez internalizada, *Salmonella* expressa um segundo tipo de SST3 codificado na ilha de patogenicidade do tipo 2 (SPI-2), que auxilia no processo de infecção sistêmica e patogenicidade intracelular (Hensel, 2000).

SPI-2 está ligada à habilidade de *Salmonella* sobreviver nas células fagocíticas e replicar-se dentro de vesículas nas células eucarióticas, além de inibir atividade antimicrobiana pela prevenção da fusão de lisossomos com o vacúolo fagocítico e pela modulação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e expressão de citocinas que culmina com atração de macrófagos para o local (Chappell et al., 2009). Em seguida, as bactérias são fagocitadas por macrófagos não ativados, sendo então transportados para o fígado e o baço, iniciando a infecção sistêmica (Monack et al., 2000).

A translocação de proteínas efetoras de SPI-1 dentro de macrófagos pode induzir a formação rápida de um processo apoptótico. A proteína SipB codificada pela SPI-1 está envolvida com apoptose do macrófago pela ativação da caspase-1,

a qual cliva a pró-IL1B e pró-IL18, precursores de citocinas pró-inflamatórias e na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL8. Este processo permite a saída do microrganismo do macrófago e o retorno para o lúmen intestinal e posterior eliminação pelas fezes (Chappell et al., 2009).

2.5 Genes *clpP* e *flhD*

ClpP corresponde à sigla de protease caseinolítica P e é uma serina protease auto-compartimentada e altamente conservada (Bhandari et al., 2018). Nas células procarióticas, a protease clpP desempenha papel importante na proteostase sendo que o bloqueio de sua síntese influencia na infectividade e virulência durante o processo de invasão e colonização intestinal por *Salmonella* spp. (Bhandari et al., 2018).

Esse complexo é sintetizado em altos níveis quando há condições de estresse ou síntese anormal de proteínas sendo, então, classificados como proteínas de choque térmico (Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Thomsen et al., 2002). Dessa forma, o mecanismo controlado de degradação de proteínas citoplasmáticas tem sido considerado essencial para a sobrevivência de bactérias sob condições de estresse severas, devido à exigência de remoção eficiente de proteínas defeituosas ou danificadas (Weichart et al., 2003).

A proteína *clpP* é constituída por dois componentes: uma subunidade ATPase (ClpX) e outra subunidade proteoliticamente ativa (peptidase ClpP), como representado na Figura 1.

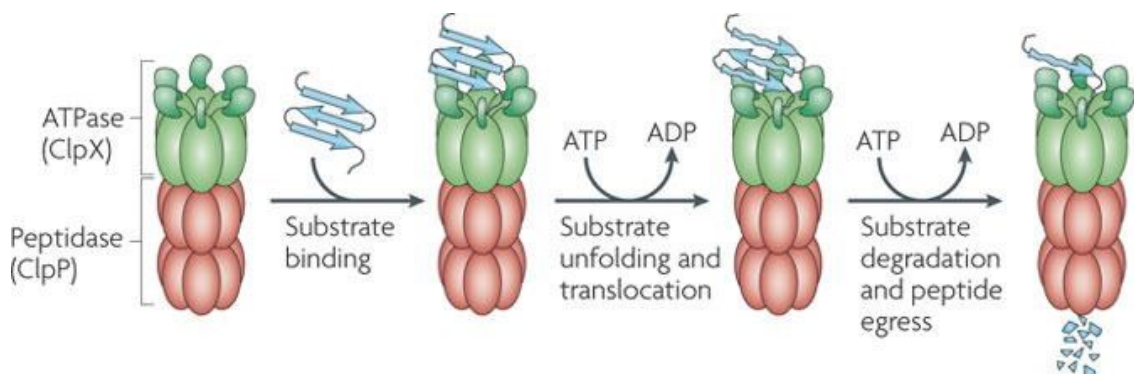


Figura 1. Representação da degradação de substrato pelo clpP. Adaptado de Kirstein et al. (2009).

A figura ilustra o substrato desdobrado sendo transferido para a câmara da peptidase clpP associada (em vermelho), onde a proteólise é realizada por locais ativos que alinham a superfície interna da câmara formada por esta protease auto-compartimentada (Kirstein et al., 2009). Portanto, a subunidade clpX, é responsável pelo reconhecimento de substratos, desdobramento de proteínas e translocação até a protease clpP, cuja função é a degradação proteica (Gottesman, 2003).

O gene *clpP* tem mostrado ser essencial para virulência em *Salmonella enterica*, cuja deleção causa produção excessiva de flagelos devido ausência da degradação de flagelina em *Salmonella* spp. (Tomoyasu et al., 2003, Tennant et al., 2011, Knudsen et al., 2013). Além da regulação flagelar, *clpP* é importante para a degradação de proteínas envolvidas na privação de nutrientes, adaptação da fase estacionária, resposta ao estresse térmico, progressão do ciclo celular, formação de biofilme, motilidade, nutrição e metabolismo (Frees et al., 2003)

Em *Salmonella* spp. esta protease está envolvida na multiplicação e sobrevivência em macrófagos peritoniais durante infecção em camundongos e tem sido considerado essencial para virulência nesse hospedeiro (Thomsen, 2002). Estudos de infecções em aves por salmonelas contendo deleções no gene *clpP* são escassos. Porém em estudo recente publicado por Troxellet al. (2016), demonstrou-se que inativação ou inibição de clpPX é importante para o *fitness* bacteriano em STM durante colonização cecal, pois a contagem bacteriana é reduzida em comparação a estirpe selvagem.

A estrutura flagelar é complexa, sendo expressa por mais de 70 genes (Chevance e Hughes, 2008). Os componentes estruturais dos flagelos incluem principalmente três elementos - corpo basal, gancho e filamento (Macnab, 1992). Enquanto o corpo basal age como uma âncora no flagelo, anexando-o à membrana celular, a rotação do filamento helicoidal impulsiona o movimento adiante. O gancho serve como um elo flexível entre o corpo basal e o filamento rígido. Além disso, a quimiotaxia e as proteínas motoras ajudam a bactéria a perceber o ambiente e se mover para direção apropriada.

Existem três classes de promotores na hierarquia transcricional e vários mecanismos de regulação identificados (Minamino et al., 2018). O complexo FlhDC, é o regulador principal da biogênese flagelar e desempenha papel na ativação da

síntese de genes flagelares da classe 2. Estes são constituídos por elementos estruturais do corpo basal do gancho, proteína apical do filamento (FliD) e outros reguladores (FliA, FlgM, FliZ e FliT) (Das et al., 2018) Além do complexo FlhDC, FliZ e FliT também atuam como fatores reguladores positivos e negativos, respectivamente, para a expressão gênica flagelar da classe 2 (Kutsukake, Ikebe e Yamamoto, 1999).

A proteína FliD consiste em três domínios (D1, D2 e D3) que se agrupam em um em um pentâmero (Song et al., 2017). Nas formas multiméricas, os domínios D2 e D3 formam uma placa que se assemelha a uma estrela de 5 ou 6 pontos (Figura 2).

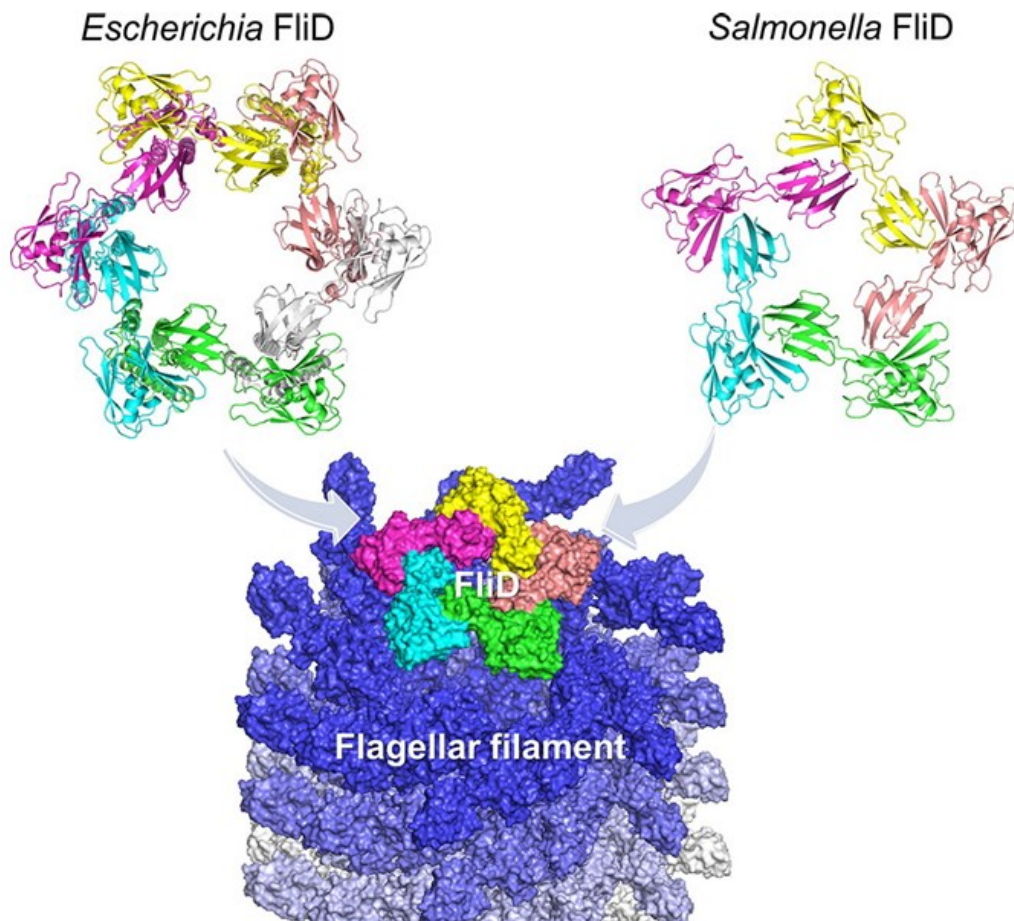


Figura 2. Representação da localização estrutural da proteína fliD no filamento flagelar.

Adaptado de Song et al., 2017.

O domínio D1, que se assemelha à flagelina, forma uma estrutura com 5 ou 6 filamentos, que conectam a placa estrelada à ponta dos flagelos. Um modelo foi

proposto no qual o domínio D1 de *fliD* ocupa temporariamente uma posição no lugar de uma flagelina nascente até que a flagelina atinja o final crescente do filamento, momento em que *fliD* se afastaria para repetir o ciclo (Yonekura et al., 2000; Song et al., 2017). Nesse modelo, a estrutura da placa feita dos domínios D2 e D3 retardaria o trânsito das subunidades flagelares para facilitar sua montagem na ponta. Portanto, esta proteína é essencial para orientação da estrutura do filamento flagelar, bem como regulação do comprimento (até 15 μm), facilitando a polimerização dos monômeros de flagelina na extremidade do filamento (Aldridge et al. 2010, Minamino et al., 2018)

Estudos recentes demonstram que deleções simples do gene *fliD* em SE induzem infecções em aves menos invasivas *in vitro* e *in vivo* do que aquelas induzidas pela estirpe do tipo selvagem (Schmitt, Darnell e O'Brien, 1996, Imre et al., 2015; Szmolka, Matulova e Rychlik, 2018). Este resultado está relacionado a maior quantidade de monômeros de flagelina exportados para o ambiente e apresentam fenótipo imóvel devido a ausência de orientação da estrutura flagelar correta e liberação dos monômeros de flagelina para o ambiente (Ikeda, Oosawa e Hotani, 1996).

As consequências das deleções individuais dos genes *clpP* e *fliD* durante infecções *in vitro* e *in vivo* são bem caracterizadas na literatura. Portanto, a combinação dessas duas deleções resulta em estirpes que expressam fenótipo com super produção de flagelina devido deleção no gene *clpP* e exportam flagelina em maiores quantidade devido ausência do gene *fliD*. Neste estudo, fornecemos dados observados em aves para postura comercial infectadas com mutantes duplos de SE e STM contendo deleções nos genes *clpP* e *fliD*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a infecção e as respostas imunes desencadeadas em aves por estirpes de SE e STM contendo deleções em genes relacionados à superprodução e secreção de flagelina (SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$) em comparação às estirpes selvagens (SE e STM).

3.2 Específicos

3.2.1. Construir por métodos moleculares dois mutantes duplos contendo deleções nos genes *clpP* e *fliD* (SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$).

3.2.2. Avaliar a excreção fecal e colonização intestinal dos mutantes (SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$) em aves de postura comercial de um dia de vida comparando com as respectivas estirpes selvagens (SE e STM).

3.2.3. Avaliar a capacidade de invasão sistêmica dos dois mutantes (SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$), em aves de postura comercial de um dia de vida comparando com as respectivas estirpes selvagens (SE e STM).

3.2.4. Verificar a resposta imune em baço e tonsilas cecais de aves infectadas no primeiro dia de vida por estirpes mutantes (SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$) em comparação com as respectivas estirpes selvagens, SE e STM, considerando-se a quantificação da expressão dos genes responsáveis por citocinas (IL17, IL18, IL22, IL6) e quimionas pró-inflamatórias (CXCLi2 E CCL4).

3.2.5. Caracterização imuno-histoquímica da população de macrófagos e de linfócitos T (CD4/CD8) em fígado, baço e tonsilas cecais em aves infectadas no

primeiro dia de vida por estirpes mutantes (SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$) em comparação as respectivas estirpes selvagens (SE e STM).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instalações experimentais

As estirpes mutantes foram construídas no Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), câmpus de Jaboticabal e os experimentos *in vivo* foram realizados nos infectórios experimentais deste laboratório. Os estudos de curva de multiplicação foram realizados na Universidade de Copenhague, câmpus de Frederiksberg.

4.2 Bactérias, plasmídios e preparo dos mutantes

Para a construção das bactérias mutantes foram utilizadas as estirpes paratíficas de *Salmonella* Enteritidis (P125109) e *Salmonella* Typhimurium (F98) ambas inicialmente isoladas de aves. Ambas foram doadas pelo Dr. Paul Barrow (Universidade de Nottingham) e possuem patogenicidade conhecida por estudos prévios e sofreram indução de resistência ao ácido nalidíxico (100 µg/ mL).

Inicialmente os iniciadores foram desenhados a partir do genoma sequenciado de *Salmonella* Enteritidis P125109, disponível no banco de dados Genbank (AM 933172.1), o qual as regiões dos genes deste estudo foram identificadas. Para inativação dos genes *fliD* e *clpP*, selecionou-se as 50 bases nitrogenadas anteriores a sequência alvo e as últimas 50 bases ao final da fita complementar.

A sequência das 50 primeiras bases juntamente com 20 bases da sequência do cassete do antibiótico (sequência que antecede o código de início do cassete)

formou o iniciador direto de mutagênese. As 50 últimas bases da fita complementar e 20 bases da fita complementar do cassete do antibiótico (sequência posterior ao código de parada) formaram o iniciador reverso de mutagênese. Iniciadores direto e reverso (denominados de controle), utilizados para verificação da correta inserção dos cassetes, foram construídos tendo como alvo as sequências anterior e posterior ao local de inserção dos cassetes.

Também com o objetivo de verificar a inserção dos cassetes, foram construídos iniciadores direto (C2 e K2) e reverso (C1 e K1), tendo como alvo a sequência central dos cassetes de cloranfenicol e canamicina. Para construção dos iniciadores foram utilizados os softwares *CLC sequence viewer 6.3* (CLC BIO), *Artemis v11* (Carver et al., 2005) e *Primer premier 5* (PREMIER BIOSOFT INTERNATIONAL). O Quadro 1 contém as sequências dos iniciadores utilizados e as sequências referentes ao cassete do antibiótico estão representadas em negrito:

Quadro1. Iniciadores utilizados neste estudo

Número	Iniciadores	Sequência (5'-3')	Referência
1	fliD F*	cccacggtttctcaccgtaa	Este estudo
2	fliD R*	tcaatcaactgatgcgggct	Este estudo
3	fliD 50F**	atggcttcaattcatcattaggtgtagggctc aaacttacctctggattc gtgtaggctgga gctgcttc	Este estudo
4	fliD 50R**	tcaggactgtttcatagcattaaattgctggg tcaaataagtactggtgt catatgaatc ctccttag	Este estudo
5	clpP F*	cgaaaaccgcggttcagtgt	Este estudo
6	clpP R*	ttgtgccgcccttcattagt	Este estudo
7	clpP 50F*	atgtcatacagcggagaacgagataatttg gcccctcatatggcgctggt gtgtaggctg gagctgcttc	Este estudo
8	clpP 50R*	tcaattacgatgggtcaaaattgagtcaac caaaccgtactctaccgctt catatgaata tcctccttag	Este estudo
9	C1	ttatacgcaaggcgacaagg	Datsenko e Wanner(2000)
10	C2	gatcttccgtcacaggtagg	Datsenko e Wanner(2000)
11	K1	cagtcatagccgaatagcct	Datsenko e Wanner(2000)

12	K2	cggtgccctgaatgaactgc	Datsenko e Wanner(2000)
----	----	----------------------	-------------------------

*iniciadores de mutagênese utilizados para verificação da inserção dos marcadores de antibióticos. ** iniciadores de mutagênese utilizados para produção de fragmento de DNA recombinante

A técnica do Lambda-Red adaptada de Datsenko e Wanner (2000) e de Freitas Neto et al. (2013) foi utilizada para deleção dos genes *fliD* e *clpP*. Todos os plasmídeos utilizados foram extraídos com auxílio do *kit* comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilder, Alemanha), e as informações técnicas dos plasmídios estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Plasmídios utilizados nesse estudo

Plasmídios	Descrição	Referência
pKD46	Amp ^r contém genes constituintes do sistema de recombinação λ Red.	Datsenko e Wanner (2000)
pKD3	Amp ^r , Cm ^r , plasmídio molde para construção do cassete de recombinação.	Datsenko e Wanner (2000)
pKD4	Amp ^r , Kn, plasmídio molde para construção do cassete de recombinação.	Datsenko e Wanner (2000)
pCP20	Amp ^r , Cm ^r , plasmídio que codifica a recombinase FLP.	Cherepanov e Wackernagel (1995)

Estes plasmídios estavam inseridos em estirpes de *E.coli* armazenadas a - 80 °C. Com auxílio de alça bacteriológica estéril, as bactérias congeladas foram transferidas às superfícies de placas de Petri contendo ágar LB com o antibiótico correspondente à resistência conferida por cada plasmídio. As placas foram incubadas em estufa à 28 °C/ 24 h. A partir de colônias isoladas desta placa, foi feita a semeadura em caldo lisogenia (LB – Difco, Bordeaux, França) contido em tubo do tipo Falcon de 15 mL, incubado à 28 °C por 18 h a 150 rpm em incubadora automática.

4.3 Mutagênese pela técnica do *Lambda-red*

A técnica de mutagênese utilizada para deleção dos genes *fliD* e *clpP* será descrita com a estirpe SE P125109, sendo exatamente o mesmo procedimento adotado com a estirpe STM F98.

Inicialmente, foi realizada a semeadura da estirpe selvagem congelada em freezer - 80 °C em 10 mL de caldo LB, que foi incubado em agitação a 150 rpm por 18 h. Em seguida, 500 µL desse cultivo foram transferidos para tubo Falcon de 50 mL contendo 20 mL de caldo LB e incubados em agitação a 37 °C até atingir a densidade óptica (DO) de aproximadamente 0.6. A cultura foi centrifugada a 4000 g por 10 minutos a 4 °C em Sorvall Ultracentrífuga Sorvall Legend Mach 1.6R (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts), e em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 30 mL de água ultrapura gelada (Sigma, San Luis, Estados Unidos da América). Este procedimento foi repetido três vezes. Por fim, o pellet foi ressuscitado em 200 µL de água ultrapura gelada e armazenado em gelo até o momento da eletroporação.

Para este procedimento, 40 µL da suspensão bacteriana de SE foi homogeneizada com 2 µL de plasmídeo pKD46. A eletroporação foi realizada no equipamento Gene Pulser Xcell (BIO-RAD, Hercules, Estados Unidos da América), utilizando-se cubetas de 2 mm de largura, voltagem de 2,5 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 mΩ. Após pulso elétrico, 1,5 mL de caldo LB foram adicionados à cubeta e homogeneizado com a suspensão bacteriana + plasmídeo pDK46 e então o conteúdo foi transferido para tubo Falcon de 10mL e incubado a 28 °C, a 150 rpm por uma hora e meia.

Em seguida, este cultivo microbiano foi transferido para microtubos de 1,5 mL, que foram centrifugados a 12000 rpm por 2 minutos e o volume inicial foi concentrado em 100 µL. Por fim, foi homogeneizado e despejado em ágar LB contendo 100 µg/ mL de ampicilina e incubados à 28 °C por 24 horas. Foram selecionadas oito colônias, nos quais sugerem inserção do plasmídeo pKD46, e foram semeadas em placa de petri contendo ágar LB contendo 100 µg/ mL de ampicilina e incubadas à 28 °C por 24 horas.

Todos os clones obtidos foram inspecionados para rugosidade com solução de acriflavina (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA), diluída em água ultrapura na proporção de 1: 500. Inicialmente, cada colônia foi homogeneizada em 30 µL de

tampão salino fosfatado (PBS, pH 7,4) e em seguida, 20 µL de acriflavina foram adicionados a essa solução. Em caso de aglutinação, as colônias eram classificadas como rugosas e eram descartadas. O protocolo prosseguiu com seleção de uma colônia lisa (ausência de aglutinação), que foi selecionada e estocada em freezer - 80 °C, em criotubo contendo solução de caldo LB + glicerol (proporção 7: 3).

4.3.1. Substituição do gene alvo pelo fragmento recombinante

A amplificação do DNA recombinante foi realizada por meio da PCR convencional, cuja reação consistia de: 34,2 µL de água ultrapura, 5 µL de 10X Tampão para PCR, 1,8 µL de MgCl₂ 50mM ; 5 µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP) 2mM ; 200 nanomolares (nM) dos iniciadores de mutagênese 1 e 2; ; 1µL de Taq DNA polimerase (5 U/ µL) e 1 µL de DNA plasmidial. Esta reação foi repetida em cinco microtubos, utilizando termociclador convencional MyCycler (BIO-RAD, Hercules, Estados Unidos da América) com a seguinte programação: um ciclo de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60°C por 30 s e 68 °C por 120 s; um ciclo final de alongação de 68 °C por 7 min e o resfriamento da amostra a 4 °C até armazenamento em -20 °C.

Portanto, para o gene *clpP* foram utilizados os iniciadores *clpP50F* e *clpP50R* e como DNA molde o plasmídeo *pKD3* (confere resistência ao cloranfenicol - Cf^r). Para o gene *fliD* foram utilizados os iniciadores *fliD50F* e *fliD50R*, e como DNA molde o plasmídeo *pKD4* (confere resistência a canamicina - Km^r).

O tamanho de fragmento esperado dos produtos utilizando os plasmídios *pKD3* e *pKD4* como DNA molde são de respectivamente 1,1 kb e 1,6 kb, independente do gene a ser trabalhado. Assim, os produtos provenientes destas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para verificação dos pesos moleculares (Consort E863, cuba Horizon 11-14 CE - Life Technology, Carlsbard, Estados Unidos da América). Utilizou-se 30 mL de gel composto por agarose a 1,5 %, diluído 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) e acrescido de 3 uL de SybrSafe (Invitrogen, Carlsbard, Estados Unidos da América). Após preparo do gel, foram adicionadas as amostras em cada poço e o marcador de

tamanho molecular (1 kb DNA Ladder – Fermentas, Waltham, Estados Unidos da América; e 1 µL de solução corante – Sinapse, São Paulo, Brasil), e submetidos a corrente elétrica de 60 V por 1 h. O gel foi colocado sob luz ultravioleta (GelDoc EZ, Bio-rad, Hercules, Estados Unidos da América), e fotografado para visualização das bandas.

Os produtos da PCR de cada fragmento (volume total 250 µL) foram transferidos para microtubos de 2 mL e precipitados utilizando-se o kit comercial “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” (ThermoFisher, Waltham, Estados Unidos da América), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi então eluído em 20 µL de água ultrapura e armazenamento a -20 °C até o momento da eletroporação. A concentração foi verificada em espectrofotômetro Denovix DS-11 (Uniscience, Miami, Estados Unidos da América) e qualificada observando-se as relações 260/280 e 260/230.

Para a substituição do gene alvo (*fliD* e *clpP*), pelo marcador de antibiótico, todo o procedimento do item 3.2.1. foi repetido, sendo então gerado o pulso elétrico na bactéria SE + pkd46, previamente construída e multiplicada a 28 °C, juntamente com o fragmento amplificado por PCR e purificado com kit comercial. Após eletroporação, as colônias presentes em placas de Petri contendo ágar LB e 20 µg/mL de cloranfenicol (para o gene alvo *clpP*) e 30 µg/mL de canamicina (para o gene *fliD*) foram incubados a 37 °C por 24 h. Em seguida, colônias foram selecionadas e transferidas com auxílio de alça bacteriológica para outra placa de petri contendo ágar LB contendo os antibióticos correspondentes e então incubados nas mesmas condições anteriores. O teste de rugosidade foi realizado e a confirmação da inserção do fragmento realizada por PCR nas colônias lisas.

Após confirmação da inserção do marcador de antibiótico nos genes alvos *clpP* (oligonucleotídeos *clpP* F e *clpP* R) e *fliD* (*fliD* F e *fliD* R), a PCR foi realizada com três combinações de iniciadores para os dois genes do estudo: Direto controle + reverso controle, direto controle + C1 e reverso controle + C2. As concentrações de reagentes utilizadas para a amplificação dos fragmentos de DNA consistiam de: 16 µL de água ultrapura; 2,5 µL de 10X Tampão para PCR; 1 µL de MgCl₂ 50 mM; 1 µL de dNTP 10 mM; 800 nM dos iniciadores 1 e 2; 0,5 µL de Taq DNA polimerase (500U) e 1 µL de DNA. A ciclagem foi realizada com a seguinte programação: um

ciclo de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94° por 20 s, 62 °C por 30 s e 72 °C por 120 s; um ciclo final de alongação de 72 °C por 5 min e o resfriamento da amostra a 4 °C por 30 min. A visualização dos fragmentos foi realizada em gel de agarose a 1,5 %, submetidos a corrente elétrica de 40 V por duas horas.

A confirmação dos sorovares de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* eram realizadas a cada inserção ou retirada de plasmídeo (Malorny, Bunge, Helmuth, 2007, Park et al., 2013).

4.3.2 Transdução

A transdução é uma ferramenta que fornece *background* genético limpo. Portanto, a partir da estirpe obtida no procedimento anterior, foi realizada a transdução da estirpe mutante para estirpe selvagem utilizando o bacteriófago ØP22 (Sambrook e Russel, 2001). A multiplicação prévia do bacteriófago foi realizada a partir da infecção individual em estirpes selvagens de SE e STM, que cada uma foi multiplicada em 10 mL de caldo em LB contido em béquer de 250 mL submetido à agitação constante em incubadora (Cientec, São Paulo, Brasil) a 150 rpm até o cultivo atingir a OD de 0.6.

Imediatamente, 1 mL de bacteriófago ØP22 foi adicionado ao béquer contendo os cultivos microbianos de SE e STM que permaneceram nas mesmas condições anteriores por 24 horas. Cada conteúdo foi transferido para tubo falcon de 15 mL e então centrifugado a 4000 g por 10 minutos e utilizados filtros para seringa com poros de 0,22 µm (Kasvi, Curitiba, Brasil).

A partir de 20 µL do filtrado, foi realizada a diluição seriada em 180 µL de MgSO₄, até a décima diluição seriada. Desta última, 100 µL foram despejados em ágar LB cuja superfície foi previamente despejada o cultivo microbiano de SE ou STM, e o mesmo procedimento realizado em todas as diluições. A placa foi incubada em estufa a 37 °C por oito horas e realizada a contagem de bacteriófagos contido em cada diluição. Contagens acima de 10⁹ são ideais para a realização da transdução.

Para este procedimento, as estirpes doadoras (*SE ΔclpP* e *SE ΔfliD*; *STM ΔclpP* e *STM ΔfliD*) foram multiplicadas em 10 mL de caldo LB a 37 °C por 18 h. Em

seguida, 100 µL de cada cultivo foi transferido para frasco Enlemeyer de 250 mL contendo 10 mL de caldo LB, mantidos sob agitação a 150 rpm aproximadamente por três horas até atingir a OD de 0.6. Imediatamente, foi adicionado 1 mL do bacteriófago multiplicado anteriormente e mantidos em agitação por 18 horas. Em seguida, todo o conteúdo foi transferido para tubo Falcon de 50 mL, centrifugado a 4000 g por 10 min e utilizando filtros contendo poros de 0,22 µm para obtenção dos bacteriófagos contendo os marcadores de antibióticos.

As estirpes receptoras (SE P1250109 selvagem ou STM 98 selvagem) foram multiplicadas em 10 mL de caldo LB a 37 °C por 18 h. Em seguida, a estirpe receptora foi homogeneizada com o bacteriófago P22 (contendo marcador de antibiótico dos genes alvos do estudo) em microtubos contendo os seguintes volumes: 200 µL de SE ou STM + 1 µL de bacteriófago, 200 µL de SE ou STM + 5 µL de bacteriófago, 200 µL de SE ou STM + 10 µL de bacteriófago.

Os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida, incubados em agitação de 150 rpm a 37 °C, por uma hora. O conteúdo de cada microtubo foram despejados em ágar LB com cloranfenicol (para bacteriófagos contendo o marcador de antibiótico para o gene alvo *fliD*) e canamicina (para bacteriófagos contendo o marcador de antibiótico para o gene alvo *clpP*) e incubados a 37 °C por 18 h. Foram selecionadas oito colônias sugestivas que continham os marcadores de antibióticos correspondentes a cada gene alvo do estudo, que foram submetidas ao teste de rugosidade e confirmação por PCR como descrito anteriormente.

Para junção dos dois genes na mesma bactéria foi utilizada o mesmo procedimento de transdução. Neste caso, a bactéria receptora continha o gene *fliD* e a doadora continha o gene *clpP*. Estas foram incubadas em placas de LB contendo simultaneamente cloranfenicol e canamicina, a 37 °C por 24 h. Foram selecionadas oito colônias sugestivas que continham os marcadores de antibióticos correspondentes a cada gene alvo do estudo, que foram submetidas ao teste de rugosidade e confirmação por PCR como descrito anteriormente. Os clones positivos foram estocados a - 80 °C.

4.3.3 Retirada do marcador de antibiótico

Para a retirada dos marcadores de antibiótico foram utilizadas as estirpes mutantes obtidas na etapa de transdução as quais foram e submetidas ao mesmo protocolo de eletroporação descrito no item 3.2 utilizando 40 μ L de bactéria e 2 μ L de plasmídeo pCP20. Após o pulso elétrico, as colônias presentes em placas de Petri contendo ágar LB e antibiótico ampicilina na concentração de 100 μ g/mL foram incubadas a 28 °C por 24 h.

Oito colônias foram selecionadas e transferidas nova placa de petri contendo ágar LB com ampicilina e novamente incubadas nas mesmas condições anteriores. O teste de rugosidade foi realizado e uma colônia foi selecionada, inoculada em 10 mL de caldo LB e incubada a 40 °C por 24 h sob constante agitação (175 rpm). Após a incubação, cada clone foi semeado por esgotamento sobre quatro placas de ágar LB com as seguintes características: uma placa sem antibiótico, uma placa contendo 100 μ g / mL de ampicilina, uma placa contendo 20 μ g / mL de cloranfenicol, uma placa contendo 20 μ g /mL de canamicina e uma placa contendo cloranfenicol e canamicina nas mesmas concentrações das anteriores.

O clone foi considerado adequado para uso em experimentos subsequentes somente quanto capaz de se multiplicar na placa de ágar LB sem antibiótico. As mutantes finais foram novamente verificadas por PCR e quanto à rugosidade. Os clones positivos foram estocados a - 80 °C até o momento do uso.

4.4 Avaliação do fenótipo das estirpes mutantes

4.4.1. Teste de aglutinação flagelar

As estirpes SE, STM, SE Δ *clpP* Δ *fliD* e STM Δ *clpP* Δ *fliD* foram avaliadas por meio do teste de aglutinação utilizando colônias provenientes de cultivo microbiano estriado em ágar LB e incubados por 18 h. Foi realizada suspensão bacteriana em 1 mL de solução salina 0,85% esterilizada a partir de uma colônia de cada bactéria do estudo. Vinte microlitros dessa suspensão bacteriana foram transferidos para superfície de lâmina de vidro e homogeneizados. Em seguida, o mesmo volume do antissoro polivalente flagelar (Probac, São Paulo, Brasil) foi homogeneizado à

solução anterior. A intensidade da aglutinação foi mensurada por escala classificada em: 0 = sem aglutinação, + = aglutinação normal e ++ = aglutinação intensa.

4.4.2. Análise de multiplicação bacteriana

Cada estirpe de SE, STM, SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ foi inoculada em 10 mL de caldo LB em agitação contínua de 150 rpm a 37 °C durante 18 horas. Em caldo LB, cada cultivo microbiano foi diluído na proporção de 1:1000 e as curvas de multiplicação foram realizadas em equipamento BioScreenC (Thermo LabSystems, Waltham, Estados Unidos da América). Dez microlitros de cada suspensão bacteriana foram adicionados a 190 μ L de caldo LB em quintuplicata e inoculados em poços da placa do equipamento em constante agitação a 37 °C. Os valores da DO (densidade óptica) foram mensurados automaticamente a cada 15 minutos (filtro de 600 nm). Além disso, o caldo LB foi adicionado como controle negativo.

4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura

As estirpes SE, STM, SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ foram inoculadas em 10 mL de caldo LB em agitação contínua de 150 rpm a 37 °C durante 18 horas. Cada cultivo foi inoculado em placas de petri contendo ágar LB e utilizou-se a técnica de esgotamento para obterem-se colônias isoladas após incubação em estufa, a 37 °C por 18 horas.

Em seguida, o ágar LB foi recortado em quadrados de 3 mm em cada lateral e realizado o protocolo seguindo metodologia estabelecida pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV - UNESP, o qual as amostras foram transferidas para microtubos contendo glutaraldeído a 3% diluído em 0.1 M de PBS (pH 7.4) por 72 horas. As amostras foram lavadas em PBS e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2 % por 24 horas e refrigeradas a 4 °C por 24 hours.

As amostras foram desidratadas em série crescente de álcool (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 100 % e 100%) por 20 minutos em cada solução, seguida de secagem em ponto crítico em CO₂ líquido em aparelho EMS 850

(Science Services, Munique, Alemanha), metalizadas com átomos de ouro em DESK II7 (Denton Vacuum LLC, Moorestown, Estados Unidos da América) e examinados ao microscópio eletrônico de varredura JEOL8, operando com feixe de elétrons de 15 keV (JEOL, Tokio, Japão).

4.4.4 Infecção de macrófagos

Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas de galinhas adultas (*Brown Leghorn*). Aproximadamente 100 mL de sangue periférico foram coletados em tubos contendo heparina sódica (BD, EUA) e aplicados lentamente em tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 50mL (BD Biosciences, EUA) contendo tampão PBS na proporção de 1:1. Em seguida, foram homogeneizados delicadamente por inversão e 20 mL foram distribuídos em tubos contendo 20mL de solução Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, EUA).

Posteriormente os tubos foram centrifugados a 1200 g por 40 minutos a 20 °C. Ao término da centrifugação formou-se um anel contendo as células na interface entre plasma e eritrócitos o qual foi coletado e transferido para outros tubos cônicos contendo PBS, os quais foram centrifugados. O sobrenadante foi descartado e este procedimento foi repetido por três com tampão DPBS. Ao final das lavagens, o “pellet” de células foi ressuscitado em meio RPMI-640 suplementado com 5 % de soro de galinha, 5 % de soro fetal bovino, 25 ug / mL de gentamicina e 200 uM de L-glutamina.

A quantidade de células foi ajustada para 5×10^6 células/mL e semeadas em cultura de tecidos de 8 poços (Trasadingen, Suíça) e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e as células aderentes restantes foram lavadas com RPMI sem suplementação e incubadas com meio por mais 48 horas para cultivar os macrófagos. Bactérias foram adicionadas aos macrófagos com fator de multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1, e posteriormente incubados por 30 minutos e então lavados com tampão FK por três vezes.

Contagem bacteriana foram realizadas em zero, seis e 24 horas pós-infecção adicionando 100 ug/ml de gentamicina (D0). Células foram desprendidas com adição de 0,1 % de Triton, homogeneizadas e realizada a diluição decimal seriada. Os

resultados são expressos como valores médios \pm desvios padrão de pelo menos três replicatas.

4.5 Experimentos *in vivo*

Foram realizados três experimentos *in vivo* utilizando aves de linhagem semipesada comercial para postura de ovos de mesa. No primeiro foi avaliada mortalidade, sinais clínicos e a excreção fecal em aves infectadas com os mutantes SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ em comparação com aquelas infectadas com as respectivas estirpes selvagens. No segundo foi avaliada a infecção sistêmica e colonização intestinal das aves infectadas com as estirpes mencionadas. Por fim, o último experimento avaliou a resposta imune por estimativa da população de macrófagos e linfócitos T por imunohistoquímica e da expressão gênica de quimiocinas e citocinas (por qPCR) induzidas em aves infectadas com as estirpes mutantes em comparação com as estirpes selvagens.

4.5.1 Aves experimentais

Foram utilizadas 332 aves de uma linhagem semipesada para postura comercial, com um dia de vida. Estas foram alojadas em baterias em ambiente climatizado, recebendo água e ração *ad libitum*. No momento da chegada dos animais, foram colhidas amostras de mecônio do interior das caixas para pesquisa de *Salmonella* spp. seguindo a metodologia descrita por Zancan et al. (2000). Os suabes foram colocados em frascos contendo caldo selenito (SN - Oxoid, Hampshire, Estados Unidos da América) com 0,04 % de novobiocina. Após incubação a 37 °C por 18 horas, placas contendo ágar verde brilhante (VB - Oxoid, Hampshire, Estados Unidos da América) foram semeadas por método de esgotamento a partir do caldo SN. Essas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e posteriormente analisadas para identificação de colônia sugestiva de *Salmonella* spp.

4.5.2 Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados como descrito por Berchieri et al. (2001). A partir de uma colônia do ágar LB, foi feita cultura em caldo LB para cada uma das estirpes a serem inoculadas (selvagens e mutantes). Dessa forma, uma colônia de cada ágar foi levemente tocada com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril e inoculada em 10 mL de caldo LB e incubada a 37 °C por 24 h sob agitação constante. A contagem do inóculo foi feita por meio de diluição seriada em PBS. Cada diluição contendo 100 µL foram despejados em ágar verde brilhante e posteriormente incubado a 37 °C por 24 h para contagem das UFC/mL.

No primeiro dia de vida, as aves receberam 0,1 mL de cultura microbiana preparada em caldo LB por 24 h a 37 °C em agitação (contendo aproximadamente 1×10^9 UFC/mL) por gavagem diretamente no papo.

4.5.3. Experimento 01 - avaliação da excreção fecal e mortalidade

Foram adquiridas 60 aves de linhagem semipesada para postura comercial, com um dia de vida, instaladas em baterias contendo água e ração *ad libitum*, divididas em quatro grupos com quinze animais cada. Nos primeiro e segundo grupos, as aves foram infectadas com a estirpe *SEΔclpPΔfliD* e a respectiva selvagem, enquanto que no terceiro e quarto grupos, as aves foram infectadas com a estirpe mutante *STMΔclpPΔfliD* e a respectiva estirpe selvagem.

As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se a mortalidade e procedendo-se à pesquisa da excreção fecal das estirpes do estudo por meio da colheita de excretas com suabes estéreis de algodão, duas vezes por semana. Os suabes foram colocados em tubos contendo dois mL de caldo SN e após agitação, incubados em estufa a 37 °C por 24 horas e então semeados em ágar VB Nal^r e incubados nas mesmas condições anteriores.

4.5.4 Experimento 02: avaliação da infecção sistêmica e colonização intestinal

Para esse estudo foram adquiridas 140 aves de linhagem semipesada para postura comercial, com um dia de vida, divididas em quatro grupos de trinta e cinco animais cada. Nos primeiro e segundo grupos, as aves foram infectadas com a estirpe SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e a respectiva selvagem, no terceiro e quarto grupos com a estirpe mutante STM $\Delta clpP\Delta fliD$ e a respectiva estirpe selvagem.

Para a avaliação da infecção sistêmica e colonização intestinal, foram eutanasiadas nos dias dois, três, cinco, sete, 14, 21 e 28 pós-infecção (dpi), cinco aves de cada grupo, para a estimativa de *Salmonella* em baço, fígado e conteúdo cecal.

As amostras colhidas foram armazenadas em solução salina tamponada pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10, baço e fígado macerados e o conteúdo cecal homogeneizado, em seguida foi realizada a diluição seriada decimalmente em PBS. De cada diluição foi retirado 0,1 mL, espalhando em placas contendo VB Nal^r. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 h.

O número de colônias por grama de órgão foi convertido em log₁₀ para análise dos resultados. Na ausência de colônias, aos respectivos frascos contendo as amostras homogeneizadas em PBS (1:10), foi adicionado igual volume de SN, preparado em concentração dupla e incubado à 37 °C por 24 h que em seguida, foi semeado em VB Nal^r, com incubação à 37 °C por 24 h. Em caso de presença de colônias sugestivas de *Salmonella*, era contabilizado o valor de 100 UFC / mL.

4.5.5. Experimento 03: estudo da resposta imune

Para estudo da expressão gênica e quantificação da população de macrófagos e linfócitos T foram adquiridas 120 aves de linhagem semipesada para postura comercial, com um dia de vida, e estas divididas em quatro grupos inoculados com SE, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM, STM $\Delta clpP\Delta fliD$ e por fim, um grupo de 12 aves não infectadas. Três aves de cada grupo foram eutanasiadas para a colheita do material aos um, três, sete e 14 dpi.

4.5.6. Imunohistoquímica

Fragmentos de fígado, baço e tonsila cecal foram embebidos em formaldeído tamponado a 4%, (pH - 7,2), na proporção de 20:1 (solução de formaldeído: fragmento de órgãos) e armazenados pelo tempo mínimo de 24 horas.

Em seguida, as amostras foram transferidas para frascos contendo álcool 70% e processadas segundo o procedimento histológico padrão até obtenção do bloco de parafina. Os fragmentos de corte histológico com 4 µm de espessura, foram transferidos para lâminas de vidro para imunohistoquímica e estocados a temperatura ambiente até o uso.

Os protocolos de imunohistoquímica para os diferentes anticorpos foram constituídos por desparafinização das lâminas em estufa (60°C) por uma hora e em seguida a imersão das lâminas em xilol (20 min). Após as lâminas foram hidratadas em soluções de concentrações decrescentes de álcool até a lavagem em água destilada. A recuperação antigênica foi feita pelo calor, utilizando stemer contendo tampão Tris-EDTA pH 9 (marcadores de linfócitos) e Citrato pH 6 (marcador de macrófago). No bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se produto comercial (Hydrogen Peroxide Block, Spring, cód. DHP125), por 30 min ou com solução de metanol e água oxigenada a 10%, por 30 min, protegido da luz.

Os cortes foram bloqueados com solução Protein Block® (Dako, EUA) durante 20 min à temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram incubadas por 18 horas a 4°C com os anticorpos monoclonais CD8+, CD4+ e KUL01 de galinha, diluídos respectivamente na razão de 1:100, 1:250 e 1:100 (8220-01, 8210-01 e 8420-01, Southern Biotech, EUA). Após incubação, os cortes foram lavados com PBS durante cinco minutos e incubadas durante 30 minutos com o anticorpo secundário biotinilado (DCMT-999, REVEAL Complement, SpringBioscience, CA, USA) e 30 minutos utilizando substrato estreptavidina-biotina peroxidase (DHRR-999, REVEAL HRP Conjugate, Spring Bioscience, California, USA). A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Entre cada passo foram realizadas lavagens dos cortes com solução tampão de TRIS HCl, pH 7,4 / 5 min e água destilada / 5 min.

Posteriormente, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados utilizando Entellan (Merck, Alemanha). Para cada corte, quatro regiões de interesse foram aleatoriamente fotografadas em microscópio de luz (Eclipse E200, Moticam

2300; Nikon, Japão) em objetiva 40x (área de 0,19625 mm²). A porcentagem de linfócitos T CD8+, T CD4+ e macrófagos marcados foi calculada com o “software” ImageProPlus de análise de imagem (MediaCybernetics, EUA).

4.5.7 PCR em tempo real

Amostras de baço e tonsilas cecais foram colhidas assepticamente e submergidas imediatamente em RNAlater (Qiagen, Hilder, Alemanha), para a estabilização do RNA, armazenadas a - 4 °C por 24 horas. Em seguida, o excesso de RNAlater foi retirado por pipetagem e as amostras armazenadas a - 80°C até o momento do processamento.

Amostras congeladas de baço e tonsila cecal foram individualmente submetidas à extração de RNA total por meio do RNeasyMini Kit (Qiagen, Hilder, Alemanha) segundo as instruções do fabricante. O material genético foi quantificado em espectrofotômetro DeNovix e quantificado observando-se as relações 260/280 e 260/230 (Sambrook e Russel, 2001). Amostras que não tiveram valor em torno de dois foram extraídas novamente.

A integridade do RNA de amostras representativas foi avaliada utilizando o Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilente, Waldbronn, Alemanha) em que valores de RIN (índice de integridade do RNA) deveriam ser superiores à 7.0. O RNA total foi mantido à -80 °C até o uso.

As moléculas de DNA complementares (cDNA) foram sintetizadas a partir do RNA total, utilizando o kit comercial “QuantiTect® Reverse Transcription kit” (Qiagen, Hilter, Alemanha). Os RNAs totais foram diluídos até atingirem concentração de 300 ng / µL e dois microlitros (600 ng) de RNA total utilizados para obtenção dos cDNAs segundo as instruções do fabricante. Ao final da transformação, o material foi novamente avaliado quanto a qualidade por espectrofotometria (Sambrook e Russel, 2001).

Foram utilizados os processos de validação de métodos de qPCR atendendo aos requisitos do MIQE para seleção dos genes de referência (Bustin et al., 2009). A estabilidade dos genes normalizadores ubiquitina (UBB), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT), β-

actina (ACTB) e 28S rRNA (28S), foi testada por meio de conjunto representativo de amostras comparando-se aquelas provenientes de aves infectadas com as estirpes do estudo em comparação com as aves não infectadas, abrangendo todos os momentos de coleta. As informações dos oligonucleotídeos utilizados se encontram no Quadro 3.

Quadro 3. Oligonucleotídeos de genes de referência utilizados para PCR em tempo real.

Gene	Número de acesso	de Sequência (5' -> 3')	Amplicon (bp)	Referência
UBB	M11100	F: GGGATGCAGATCTTCGTGAAA R: CTTGCCAGCAAAGATCAACCTT	147	Fan et al. 2012
GAPDH	K01458	F: GGCACGCCATCACTATC R: CCTGCATCTGCCCATTT	61	De Boever et al. 2008
HPRT	AJ132697	F: CCCAAACATTATGCAGACGA R: TGTCCTGTCCATGATGAGC	66	De Boever et al. 2008
ACTB	L08165	F: CACAGATCATGTTTGAGACCTT R: CATCACAATACCAAGTGGTACG	101	De Boever et al. 2008
28S	XR_003078040.1	F: GGCGAAGCCAGAGGAAACT R: GACGACCGATTTGCACGTC	61	Setta et al., 2012

A reação em PCR em tempo real foi realizada com 6,25 µL de SYBR Green Jump StartTaqReady Mix (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos da América), 0,6 µM de cada primer (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos da América cerca de 50 ng de DNA molde (cDNA) e água ultrapura (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos da América) até completar volume final de 12,5 µL. O teste foi realizado em triplicada para cada amostra.

As condições de ciclagem foram de 94 ° C por 2 minutos, seguidas de 40 ciclos a 94 ° C por 15 s e 58 ° C por 30 s. As curvas de *melting* foram geradas após os ciclos de amplificação, aumentando gradualmente a temperatura de 65 ° C para 95 ° C enquanto o sinal era captado a cada 0,5 ° C de aumento de temperatura.

Os valores de Cq a partir dos cinco genes normalizadores avaliados neste estudo foram convertidos em quantidades relativas, corrigidos pelos valores de eficiência de amplificação para cada par de genes, utilizando a fórmula descrita por Livak e Schmittgen (2001). O valor de Ct do gene-alvo é normalizado pelo valor de Cq do gene de referência, com o número de cópias conhecido ($\Delta Cq = Cq_{\text{alvo}} - Cq_{\text{referência}}$).

Pelo fato de o número de cópias do gene de referência permanecer constante, a alteração no valor de ΔCq corresponde a uma variação no número de cópias do gene alvo. Pela comparação do valor de ΔCq de amostras desconhecidas com o ΔCq de uma amostra calibradora, o valor de $\Delta\Delta Ct$ é obtido. Assim, o número de cópias é calculado aplicando-se a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, método de quantificação relativa para quantificar a expressão de genes. Esses valores normalizados foram importados para o “software” NormFinder (Andersen, Jensen e Ørntoft, 2004).

Após a seleção do gene alvo para o estudo, as transcrições de CCL4, CXCLi2, IL6, IL22, IL17 e IL18 foram mensuradas em tonsilas cecais colhidas a 1, 3, 7 e 14 dpi e nos mesmo mesmos momentos em baços, foram mensurados o CCL4, CXCLi2 e IL6.

As curvas de eficiência foram adquiridas a partir de uma diluição em série (1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) de amostras do estudo, compostas por volumes iguais de cDNA provenientes de baço e tonsilas cecais de aves infectadas e não-infectadas, em todos os momentos do estudo. As curvas de eficiência foram executadas em triplicatas e repetidas a cada nova análise. As sequências de iniciadores estão listadas no Quadro 4.

Quadro 4. Oligonucleotídeos utilizados na qPCR

Gene	Número de acesso	Sequência (5' -> 3')	Amplicon (bp)	Referência
CCL4	NM_204720	F: CCCCTTGTCATCGGTCAC R: GAGGCAGGAGCAGAGCA	166	Truong et al., 2016
IL22	NM_001199614.1	F: CAGACTCATCGGTCAGCAA R: GGTACCTCTCCTTGGCCTCT	217	Crhánová et al., 2011
IL18	NM_204608.1	F: ACGTGGCAGCTTTTGAAGAT R: GCGGTGGTTTTGTAACAGTG	88	Rychlik, et al., 2009
CXCLi2	NM_205498.1	F: GCCCTCCTCCTGGTTTCAG R: TGGCACCGCAGCTCATT	74	Setta et al, 2012
IL6	NM_204628.1	F: GCTCGCCGGCTTCGA R: GGTAGGTCTGAAAGGCGA	71	Setta et al., 2012
IL17	NM_204460.1	F: TATCAGCAAACGCTCACTGG R: GACGACCGATTTGCACGTC	110	Crhánová et al., 2011

4.6 Análise estatística

Os dados relativos à mortalidade e excreção fecal foram analisados pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado. O teste de comparação múltipla de Tukey foi utilizado para contagens das salmonelas nos órgãos, taxa da infecção de macrófagos e curva de multiplicação bacteriana. Porcentagem de macrófagos e linfócitos marcados por imunohistoquímica foram angularmente transformados e submetidos ao teste de Tukey.

Variações na expressão do mRNA de cada gene codificador de citocina foi calculada em comparação com o gene de referência em aves infectadas com as

estirpes mutantes e selvagens, além do grupo não infectado, usando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Todos os testes estatísticos e gráficos foram gerados utilizando o “software” GraphPad Prism versão 7 para Windows. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Experimentos *in vitro*

5.1.1. Preparo dos mutantes

Após a extração dos plasmídios necessários para a construção das bactérias mutantes do estudo, a confirmação foi realizada por meio de gel de agarose a 1,5%, encontram-se o perfil esperado para pKD3 (2,9kpb), pKD4 (3,2 kpb), (pKD46 (6,0kpb) e pCP20 (9,8Kpb). A amplificação do cassete de antibiótico foi realizada por PCR foi confirmada utilizando os primers do Quadro 1. A sequência alvo dos iniciadores de mutagênese no plasmídio pKD3 possui 1.014 pb, enquanto que a sua correspondente no plasmídio pKD4 contém 1.477 pb. A Figura 3 ilustra o produto de amplificação desses plasmídios utilizando os oligonucleotídeos correspondentes aos genes *fliD* e *clpP*, respectivamente.

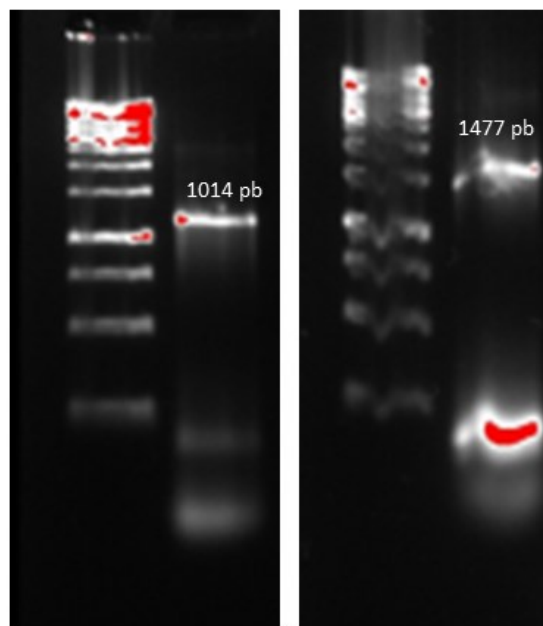


Figura 3. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, utilizando marcador de tamanho molecular 1 kb (GeneRuler DNA Ladder), ilustrando a amplificação dos fragmentos utilizando o DNA molde de pKD3 (esquerda) e pKD4 (direita) respectivamente.

A confirmação da inserção do cassete foi realizada por meio da combinação de três iniciadores como explicado previamente no item 3.2.2. As figuras 4 e 5 ilustram a confirmação da inserção do cassete após a transdução, respectivamente, para os genes *clpP* e *fliD*.

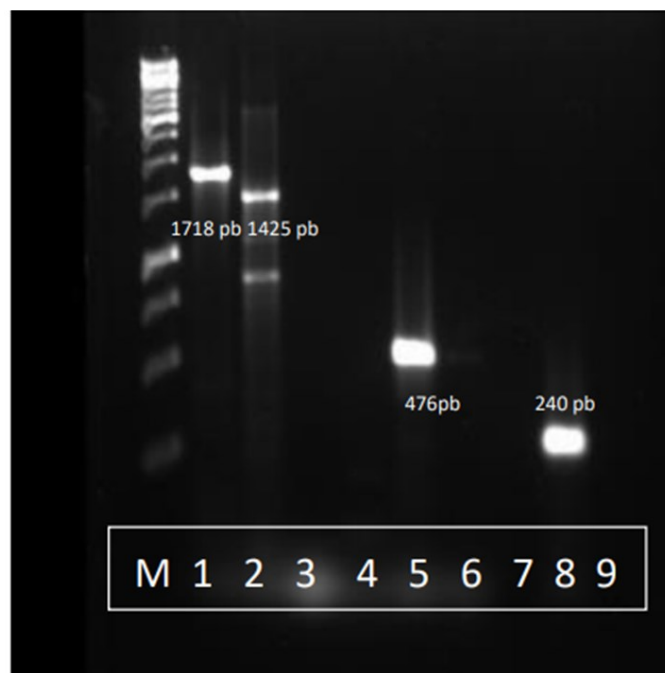


Figura 4. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados para o gene *fliD*. MM: Marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Colunas 2, 5 e 8: mutante *fliD* (contendo o plasmídeo pkd3) 1, 4 e 7: selvagem; 3, 6 e 9: controle negativo.

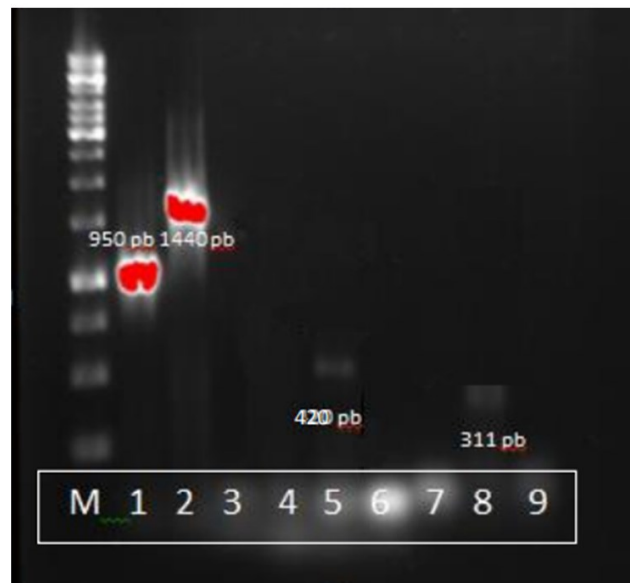


Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados para o gene *clpP*. MM: Marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Colunas 2, 5 e 8: mutante *clpP* (contendo o plasmídeo pDK3) 1, 4 e 7: selvagem; 3, 6 e 9: controle negativo.

A bactéria mutante dupla obtida após a segunda transdução, foi confirmada por PCR e obtendo-se resultados idênticos ao da figura anterior.

Por fim, a confirmação da retirada do cassete foi realizada por PCR e está ilustrado na Figura 6.

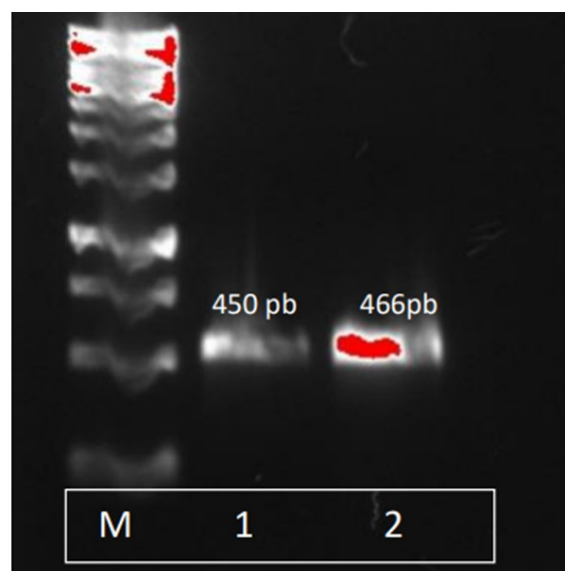


Figura 6. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % demonstrando tamanho de fragmentos após retirada do marcador de antibiótico. M: 1 kb Ladder, 1: gene *clpP*, 2: gene *fliD*.

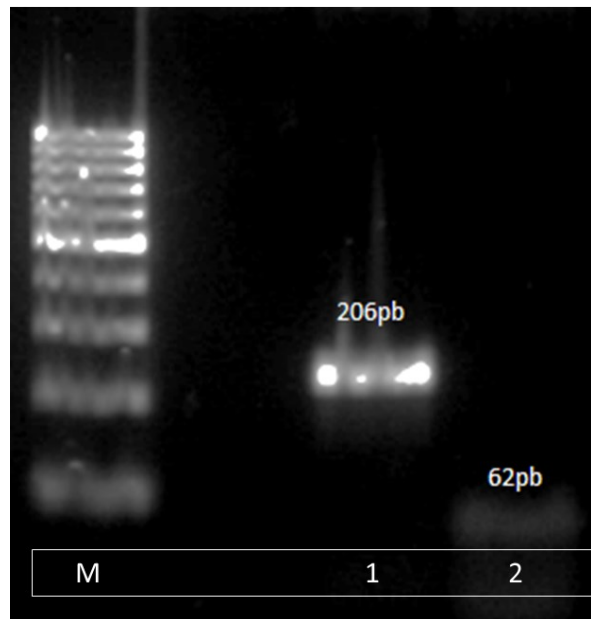


Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % de diferenciação entre estirpes de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. M) Marcador Molecular (100pb); 1) Branco – adição de água ultrapura; 2) Amostra de DNA de *S. Enteritidis* (206pb); 3) Amostra de DNA de *S. Typhimurium* (62pb).

5.1.2. Teste de aglutinação flagelar

O teste de soroaglutinação contra o antígeno polivalente flagelar foi positivo para todas as estirpes, porém a reação foi mais intensa para as mutantes SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ (++) do que as respectivas estirpes selvagens SE e STM (+).

5.1.3. Curva de multiplicação bacteriana

Resultados da curva de multiplicação demonstram que a fase lenta de multiplicação (fase “lag”) de todas as estirpes durou duas horas desde a incubação até início da fase logarítmica (fase “log”). De modo geral, as deleções nos genes *clpP* e *fliD* alteraram o *fitness* bacteriano, evidenciado pelos menores valores de OD atingidos pelas estirpes mutantes do estudo, sendo este mais evidente na comparação utilizando a estirpe SE.

A estirpe STM apresentou maior DO ($P < 0.05$) em relação a STM $\Delta clpP\DeltafliD$ entre 4 e 5 horas pós-inoculação e posteriormente foi menor durante o período de 10 horas até 18 horas de multiplicação. Já a estirpe SE apresentou maior OD ($P < 0.05$) desde 3 horas pós-inoculação até 18 horas (Figura 8).

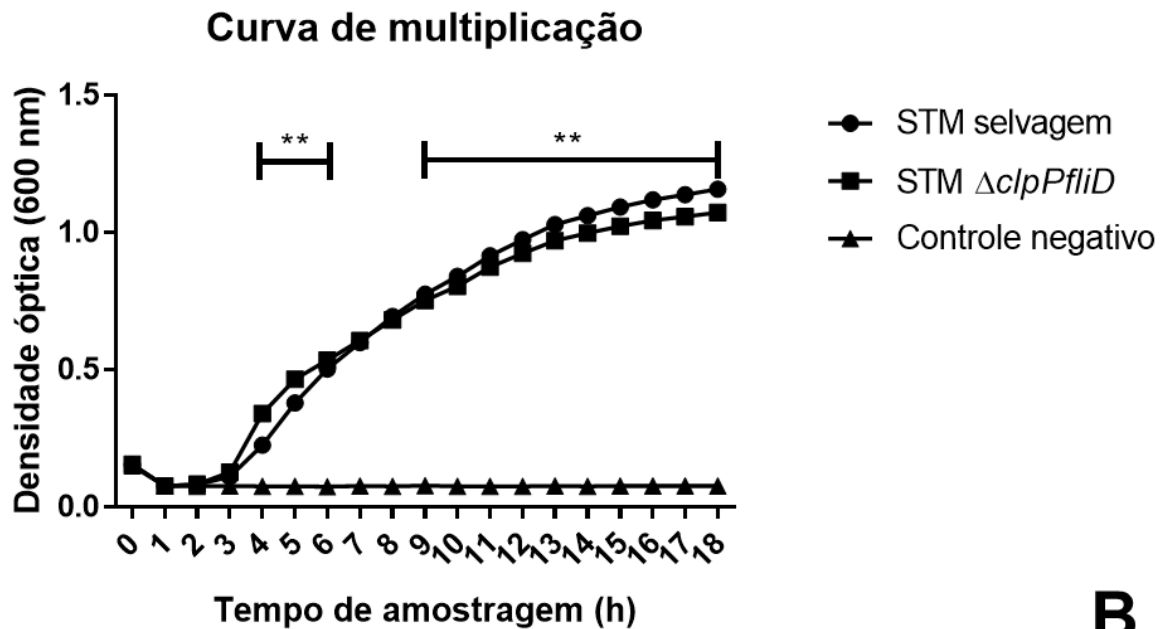
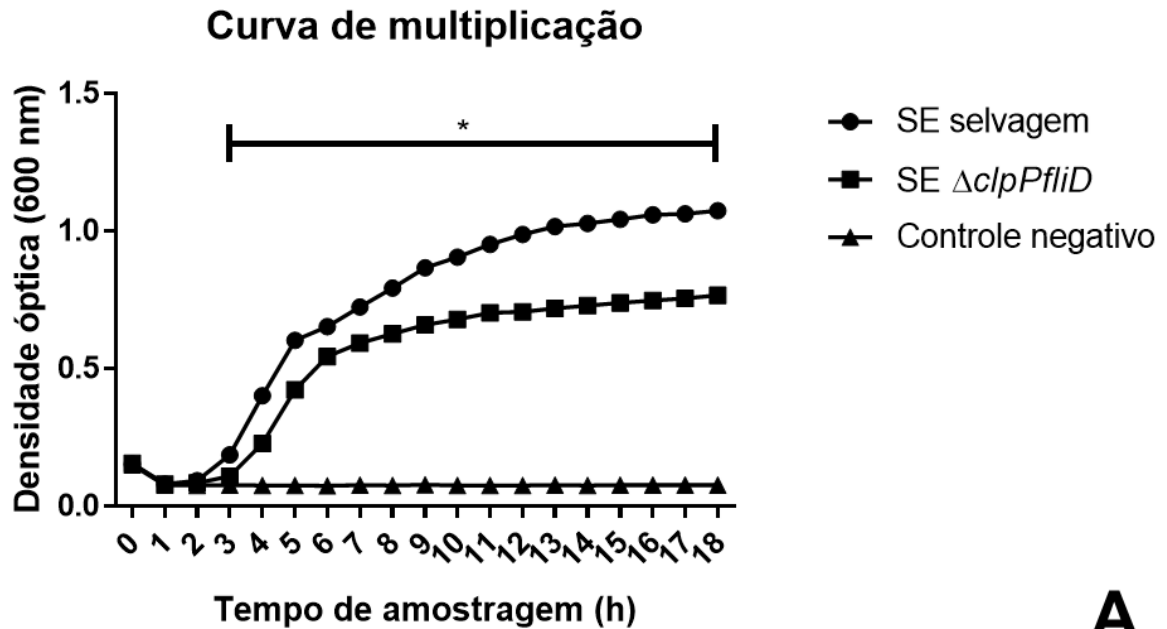


Figura 8. Curva de multiplicação bacteriana das estirpes utilizadas no estudo, as quais foram mensuradas em densidade óptica de 600 nm em intervalos de uma hora. (*): comparação A - SE x SE $\Delta clpP\DeltafliD$ ($P < 0.05$); (**) comparação B - STM x STM $\Delta clpP\DeltafliD$ ($P < 0.05$)

5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

Bactérias contendo deleções nos genes *clpP* e *fliD* aumentam a formação de filamentos na superfície bacteriana em comparação com a estirpe selvagem. A Figura 9 ilustra alterações nos fenótipos em SE e SE $\Delta clpP\Delta fliD$, sendo o mesmo padrão também observado com STM e STM $\Delta clpP\Delta fliD$.

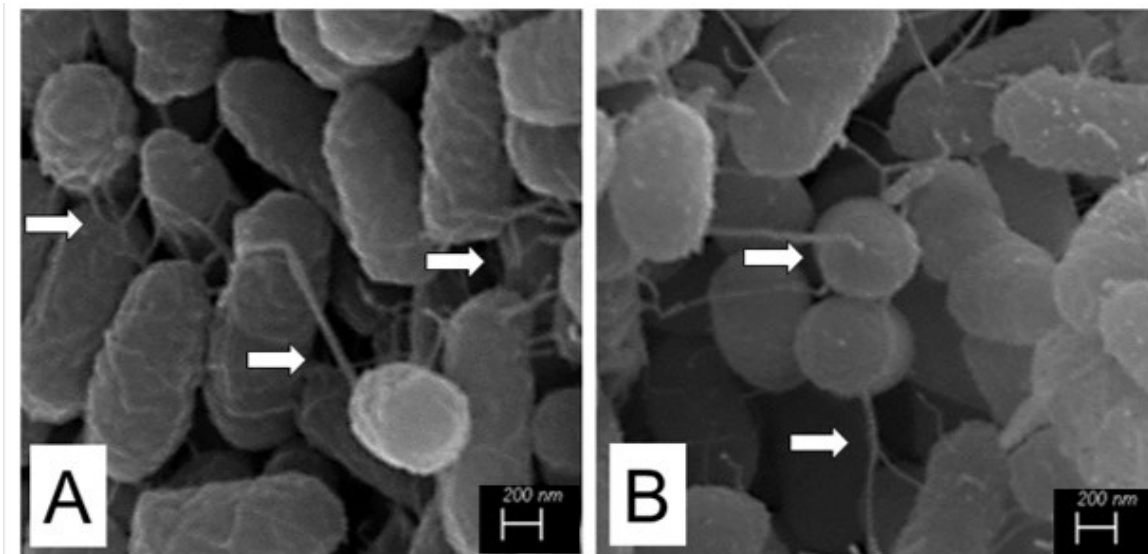


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura de SE $\Delta clpP\Delta fliD$ (A) e SE (B). As setas brancas em A e B indicam a formação do filamento.

5.1.5 Infecção de macrófagos

A Figura 10 ilustra a estimativa de UFC/ mL de infecção e multiplicidade das estirpes do estudo durante infecção em células mononucleares primárias de sangue periférico de galinhas. A internalização da estirpe *S. Enteritidis* $\Delta clpP\Delta fliD$ foi danificada em macrófagos primários no momento de aderência (0h) e infecção (6h) quando comparados com a cepa do tipo selvagem. Por outro lado, a estirpe STM $\Delta clpP\Delta fliD$ é semelhante a cepa de tipo selvagem durante todo o experimento.

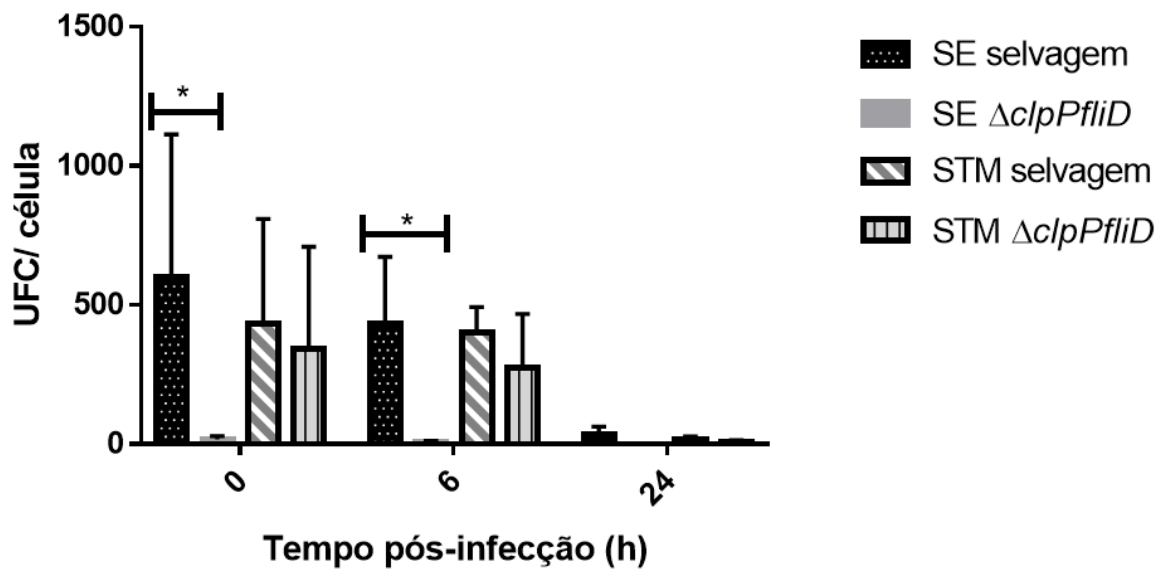


Figura 10. Sobrevivência intracelular de SE selvagem, SE $\Delta clpP\DeltafliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\DeltafliD$ durante infecção em células mononucleares primárias de sangue periférico de galinhas em zero, seis e 24 horas pós-infecção. (*): comparação A - SE x SE $\Delta clpP\DeltafliD$ ($P < 0.05$).

5.2 Experimentos *in vivo*

5.2.1 Aves experimentais

Os suabes de fundo de caixa realizados no momento da chegada das aves apresentaram-se negativos para *Salmonella* spp.

5.2.2. Preparo do inóculo

A estimativa do inóculo de cada cultura foi realizada um dia antes da infecção e o número de UFC / mL pelo método de diluição seriada dos experimentos estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Contagem de microrganismos viáveis obtidos por diluição seriada de cada cultura microbiana

Microrganismo	Pré-Inóculo (UFC/ mL)		
	Experimento 01	Experimento 02	Experimento 03
SE $\Delta clpP\DeltafliD$	$8,9 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$	$8,2 \times 10^8$
SE selvagem	$1,2 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$
STM $\Delta clpP\DeltafliD$	$9,3 \times 10^8$	$9,0 \times 10^8$	$8,7 \times 10^8$
STM selvagem	$1,8 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$

5.2.3 Experimento 01: avaliação da excreção fecal e mortalidade

A mortalidade induzida por infecções por SE e SE $\Delta clpP\DeltafliD$ produziram 13,33% (n=2/15 infectados) e não houve significância estatística entre as taxas de mortalidade. STM (46,66 %; n = 7/15 infectados) elevou a mortalidade em 40% (p < 0.05) quando comparada a STM $\Delta clpP\DeltafliD$ (6,66 %; n = 1/15 infectados) (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade de aves desafiadas no primeiro dia de vida com estirpes de STM $\Delta clpP\DeltafliD$, STM selvagem, SE $\Delta clpP\DeltafliD$ e SE selvagem.

Dpi	Mortalidade			
	STM $\Delta clpPfliD$	STM	SE $\Delta clpPfliD$	SE
2	1	4	-	-
6	-	-	-	1
8	-	1	-	-
13	-	-	1	-
15	-	1	-	-
20	-	-	1	-
22	-	1	-	-
27	-	-	-	1
Total	1 ^a (6,66 %)	7 ^b (46,66%)	2 ^a (13,33%)	2 ^a (13,33 %)

Dpi: Dias pós infecção. letras diferentes nas colunas indicam que há diferença com nível de significância de 5% (P < 0,05)

O número de suabes cloacais positivos de cada estirpe inoculada foram semelhantes entre os animais infectados com STM $\Delta clpP\DeltafliD$ (64,60%), STM (76,9%), SE $\Delta clpP\DeltafliD$ (50,90%) e SE (62,72 %) e não foram estatisticamente significante (p > 0,05) (Tabela 3).

Tabela 3. Número de amostras positivas pelo número de aves examinadas por suabes cloacais desafiados com SE $\Delta clpP\Delta fliD$, SE selvagem, STM $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM selvagem para avaliação da excreção fecal.

Dpi	STM $\Delta clpP\Delta fliD$	STM	SE $\Delta clpP\Delta fliD$	SE
1	15/15 (100 %)	15/15 (100 %)	14/15 (93,33 %)	12/15 (80 %)
6	13/14 (92,85 %)	7/9 (77,77 %)	15/15 (100 %)	14/14 (100 %)
8	13/14 (92,85 %)	9/9 (100 %)	14/15 (93,33 %)	14/14 (100 %)
13	11/14 (78,57 %)	6/9 (66,66 %)	8/13 (61,53 %)	13/14 (92,85 %)
15	5/14 (35,71 %)	7/9 (77,77 %)	2/13 (15,38%)	10/14 (71,42 %)
20	6/14 (42,85 %)	6/9 (66,66 %)	2/13 (15,38%)	3/13 (23,07 %)
22	2/14 (14,28 %)	6/9 (66,66 %)	0/13 (0 %)	1/13 (7,69 %)
27	8/14 (57,14 %)	4/9 (44,44 %)	1/13 (7,69 %)	2/13 (15,38 %)
Total	73/113 ^a (64,50%)	60/78 ^a (76,92 %)	56/110 ^a (50,90 %)	69/110 ^a (62,72 %)

Dpi: Dias pós infecção. Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença com nível de significância de 5% ($P < 0,05$)

5.2.4 Experimento 02: avaliação da infecção sistêmica e colonização intestinal

Os sinais clínicos em aves infectadas por STM iniciaram com diarreia sanguinolenta aos 2 e 3 dpi, além da presença de oftalmite unilateral, anorexia, depressão e prejuízo no ganho de peso durante o experimento. Ao mesmo tempo, em aves infectadas com STM $\Delta clpP\Delta fliD$, foi observada apenas discreta diarreia aos 4 dpi. Em aves desafiadas como SE os sinais de apatia iniciaram aos 4 dpi, mas logo desapareceram. Enquanto que em aves desafiadas com SE $\Delta clpP\Delta fliD$ não foram notados sinais clínicos aparentes.

Os resultados das contagens bacterianas em fígado, baço e conteúdo cecal estão ilustrados na Figura 11. Todas as estirpes foram capazes de invadir o intestino e atingir fígado e baço, mas a recuperação de STM e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ nesses órgãos foram similares (fígado $P = 0.3160$, baço $P = 0.1108$ e conteúdo cecal $P = 0.1104$) durante o experimento.

Aos 2 dpi, SE $\Delta clpP\Delta fliD$ foi recuperada em quantidades inferiores à SE selvagem em baço ($P < 0.05$). O mesmo ocorreu aos 14 dpi em fígado ($P < 0.05$).

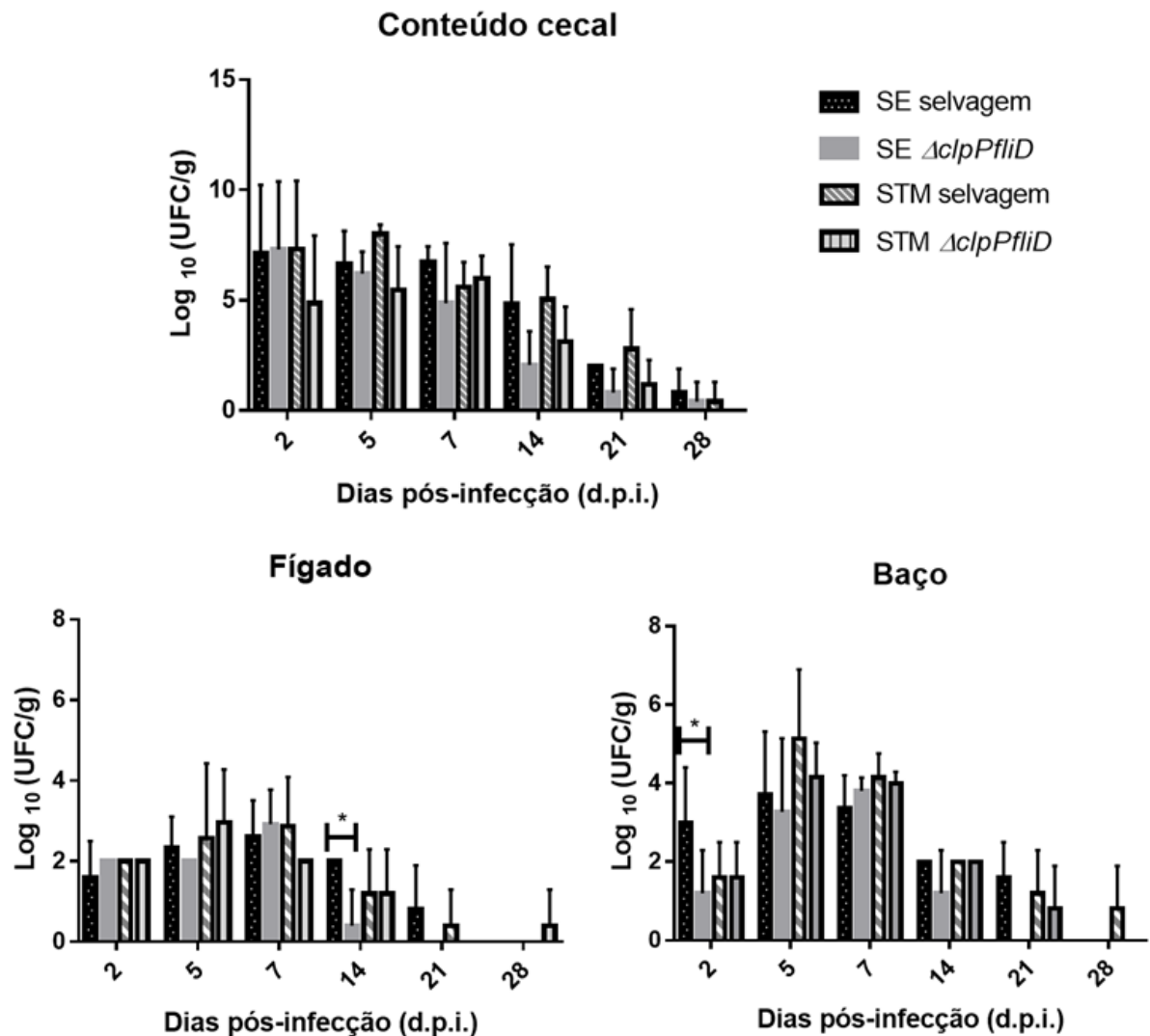


Figura 11. Contagem de SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal por dia de colheita. Média do número viável (Log_{10} UFC/g) de SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ em conteúdo cecal, no fígado e no baço de aves experimentalmente infectadas no primeiro dia de vida. (*): comparação A - SE x SE $\Delta clpP\Delta fliD$ ($P < 0.05$).

5.2.5 Experimento 03: estudo da resposta imune

5.2.5.1 Imunohistoquímica

Após a infecção, as alterações nas populações de macrófagos e células T CD4⁺ e CD8⁺ foram avaliadas em fígado, baço e tonsilas cecais de aves infectadas com SE, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ (Figura 12 a 14). As diferenças nas

populações de linfócitos ($CD4^+$ e $CD8^+$) e macrófagos, entre aves dos grupos infectados e não infectados foram observadas principalmente até 7 dpi em tonsilas cecais. No fígado e baço, as populações de macrófagos, células T $CD4^+$ e $CD8^+$ diferiam entre aves dos grupos não infectados e infectados, principalmente aos 14 dpi.

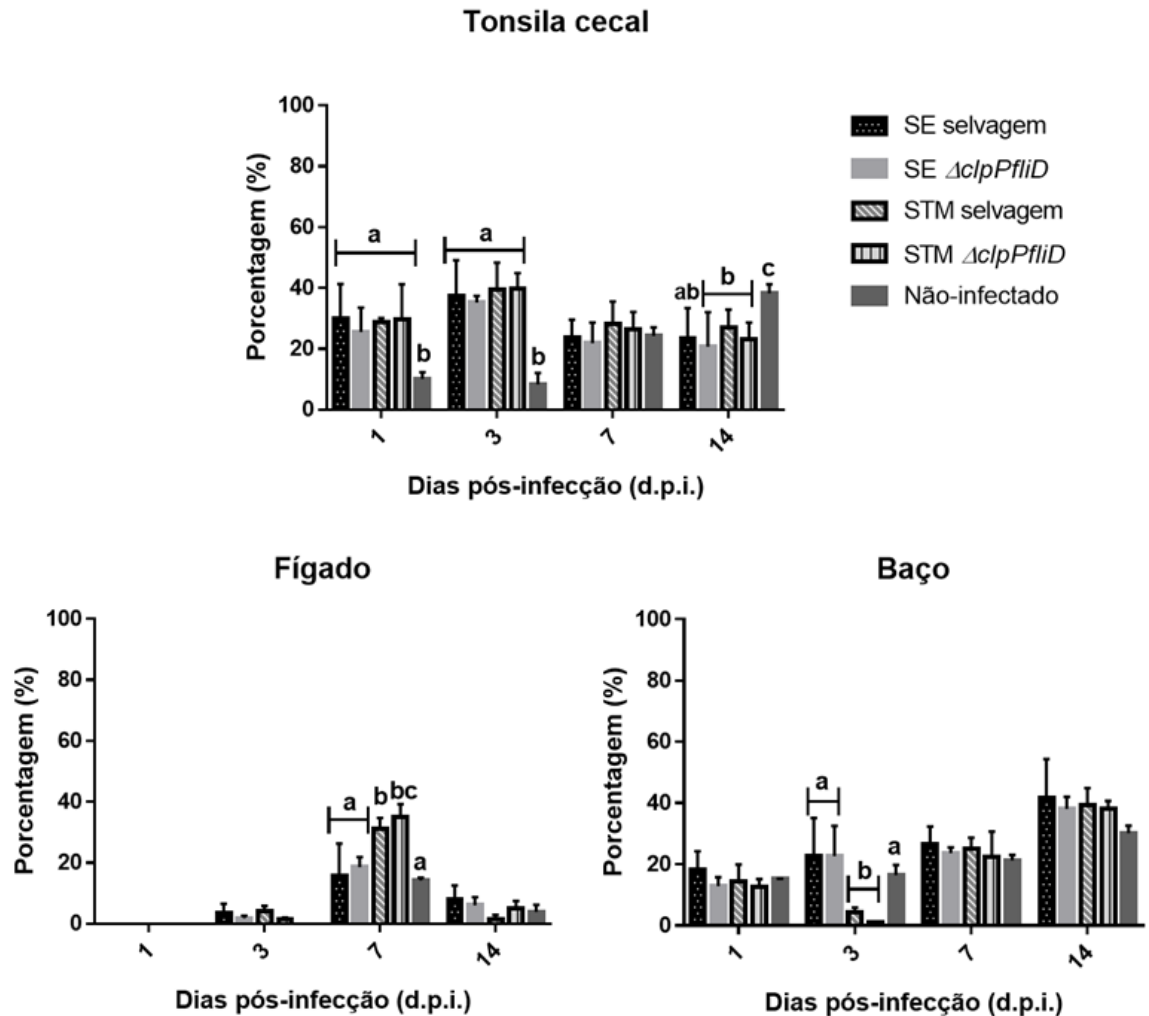


Figura 12. Porcentagem da população de linfócitos T $CD4^+$ em tonsilas cecais, baço e fígado de aves de um dia de vida não-infectadas e infectadas com SE selvagem, SE $\Delta clpP\DeltafliD$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\DeltafliD$. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística ($P < 0.05$).

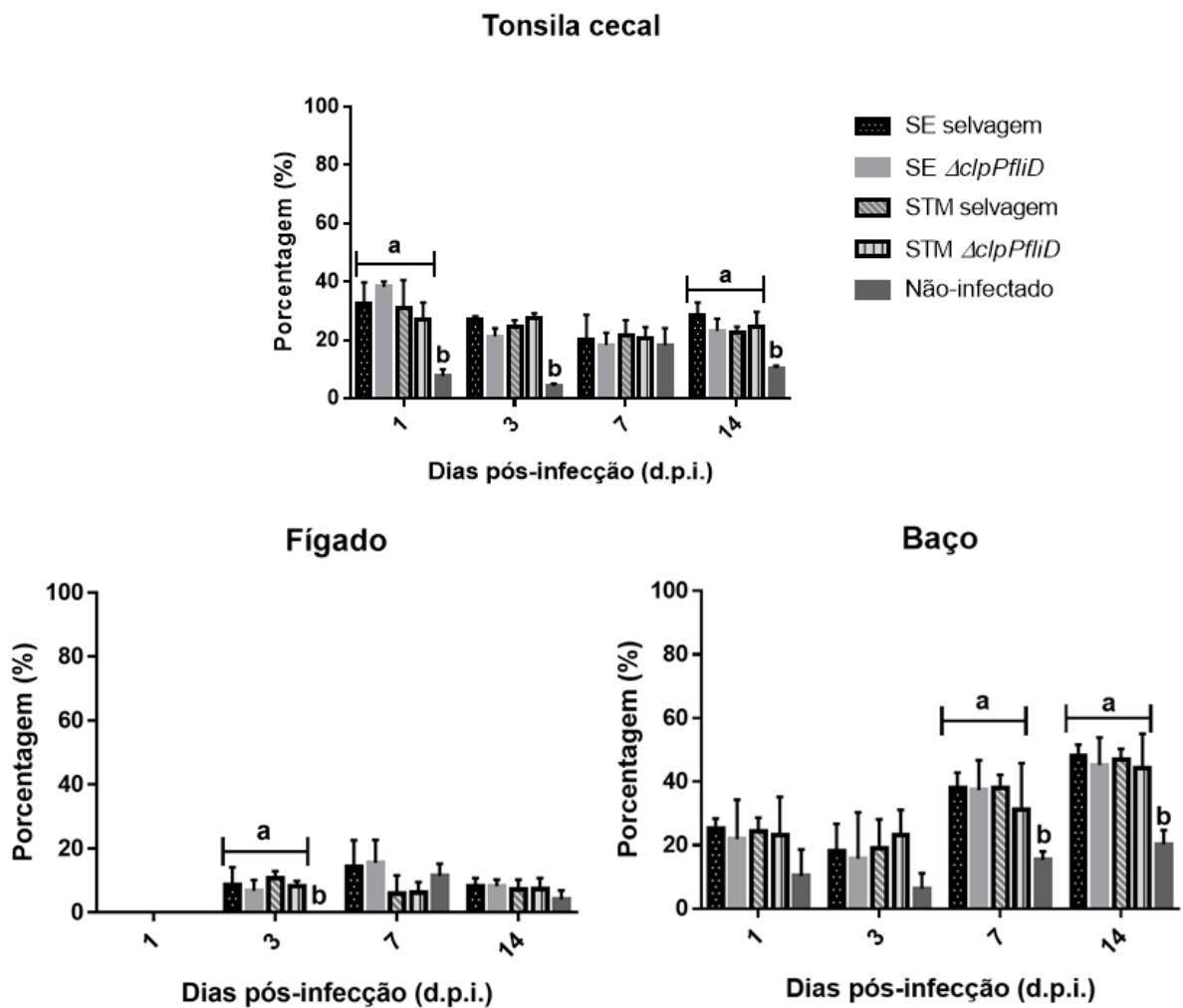


Figura 13. Porcentagem da população de linfócitos T CD8+ em tonsilas cecais, baço e fígado de aves de um dia de vida não-infectadas e infectadas com SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta fl i D$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta fl i D$. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística ($P < 0.05$)

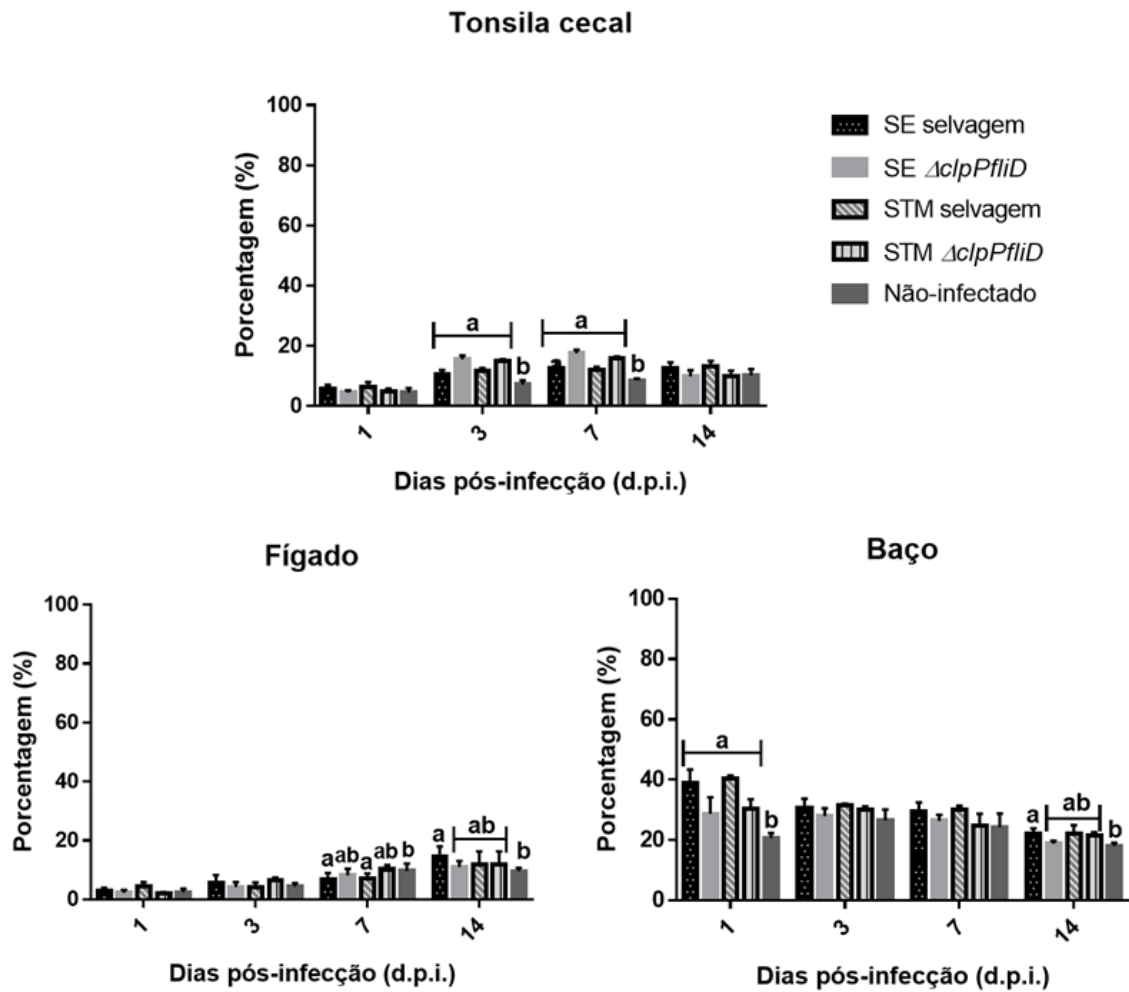


Figura 14. Porcentagem da população de linfócitos macrófagos em tonsilas cecais, baço e fígado de aves de um dia de vida não-infectadas e infectadas com SE selvagem, SE $\Delta clpP\Delta flid$, STM selvagem e STM $\Delta clpP\Delta flid$. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística ($P < 0.05$).

5.2.5.2 PCR em tempo real

As eficiências de amplificação do ensaio de PCR em tempo real para escolha do gene de referência variaram entre 90 % e 103 %. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,923. A especificidade dos primers foi avaliada pela observação de único pico de curva de “melting” e não detecção de dímeros de primers indicando ótimo desempenho. Os controles negativos inclusos em todas as reações não apresentaram Cq positivos durante o estudo. A análise do NormFinder indicou como

o gene de referência mais estável o HPRT= 0,4999. Portanto, este foi utilizado para normalizar a expressão gênica dos outros genes do estudo. Dados de eficiência das reações de qPCR realizadas para seleção do gene de referência estão disponíveis no Quadro 5.

Quadro 5. Eficiência, R^2 , Y-“intercept” e “slope” de reações de qPCR realizadas para seleção do gene de referência.

Gene	Eficiência	R^2	Y-“intercept”	“Slope”
HPRT	90.0	1	38.96	-3.02
GAPDH	98.7	0.98	37.33	-3.55
UBB	100.3	0.98	34.5	-3.66
ACTB	102.7	0.99	35.53	-3.98
28S	103.0	0.98	38.91	-3.19

Os resultados da expressão gênica estão ilustrados nas Figuras 15 e 16.

Não foram encontradas diferenças estatísticas para IL6 em baço e tonsilas cecais. Aves inoculadas com a estirpe SE $\Delta clpP\Delta fliD$ induziram altos níveis de expressão de IL22 e IL18 em tonsilas cecais quando comparadas àquelas infectadas com SE na primeira semana de infecção. O mesmo foi observado no baço em expressão de mRNA de CXCLi2 em 14 dpi. A estirpe SE induziu altos níveis de expressão de, enquanto esta induziu altos níveis de IL17, CXCLi2 e CCL4 em tonsilas cecais e CCL4 em baço durante a primeira semana de infecção.

Aves inoculadas com a estirpe STM $\Delta clpP\Delta fliD$ induziram níveis elevados de expressão de IL22 (7 dpi) em comparação à respectiva selvagem. Enquanto que STM induziu maiores níveis de CCL4 em baço (14 dpi) em relação a esta mutante.

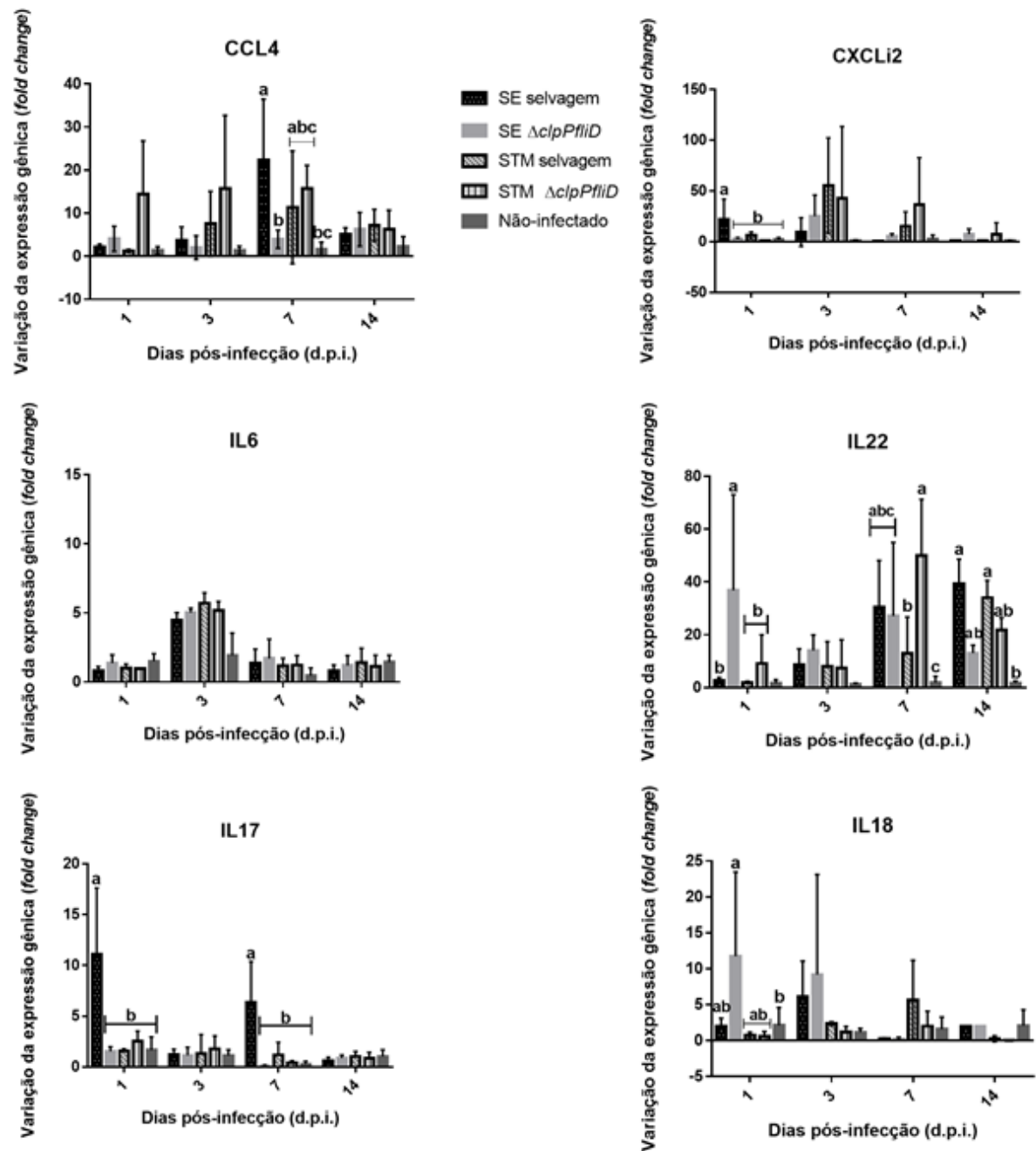


Figura 15. Níveis de expressão gênica de CCL4, CXCLi2, IL6, IL22, IL17 e IL18 em tonsilas cecais de aves infectadas com SE, SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM, STM $\Delta clpP\Delta fliD$ e aves não-infectadas em 1, 3, 7 e 14 dpi. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística (P<0.05)

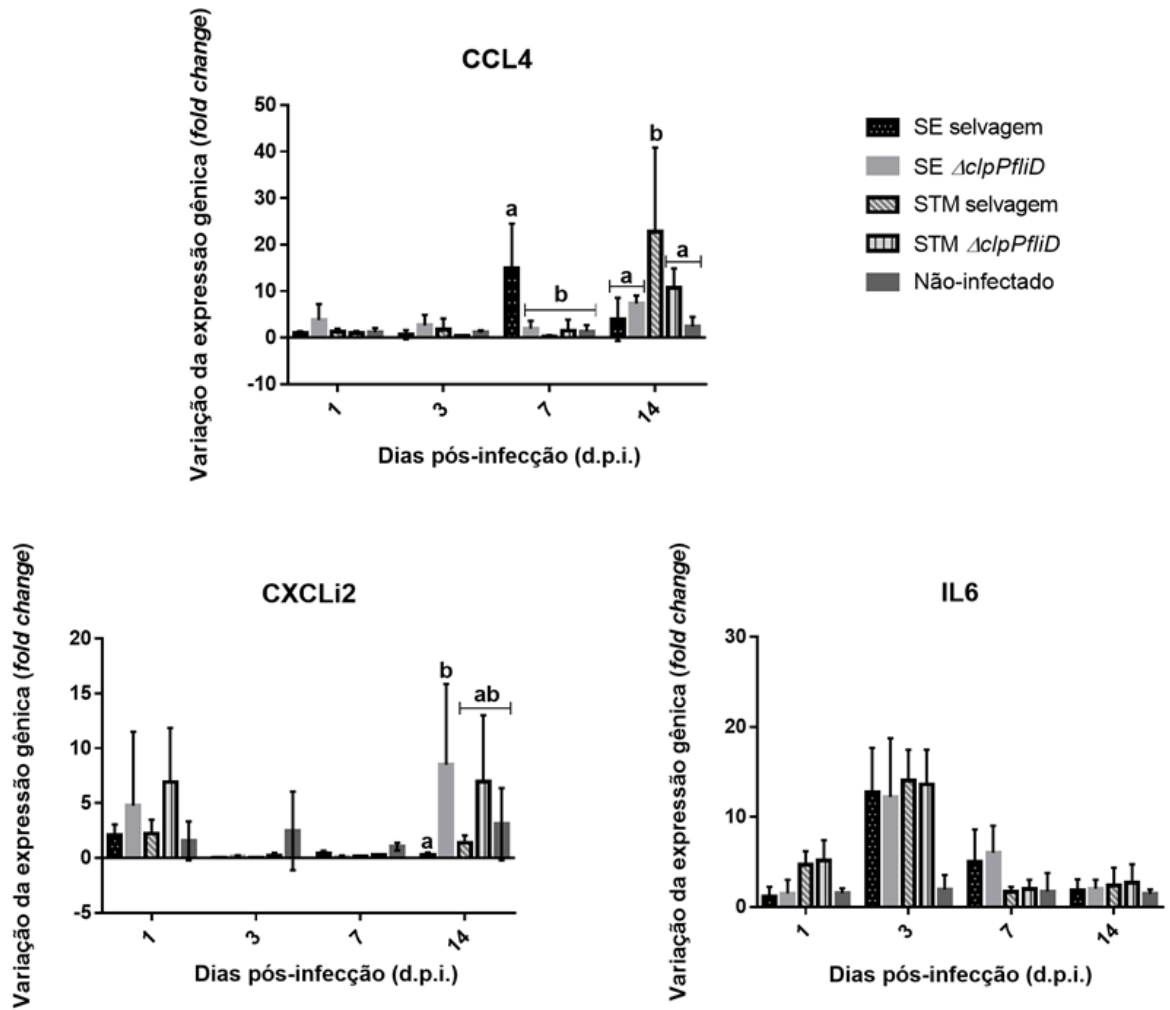


Figura 16. Níveis de expressão gênica de CCL4, CXCLi2 e IL6 em baços de aves infectadas com SE, SE $\Delta clpPfliD$, STM, STM $\Delta clpPfliD$ e aves não-infectadas em 1, 3, 7 e 14 dpi. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que houve diferença estatística ($P < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

A presença da estrutura flagelar em *Salmonella* spp. possui diversas funções, tais como: fator de virulência, formação de biofilme, aceleração da invasão bacteriana em células hospedeiras, essencial para a multiplicação *in vivo*, confere vantagem no estágio inicial da infecção e ativa o sistema imunológico inato do hospedeiro (Yang et al., 2012). Dessa forma, atuam como agonistas de TLR5, que tornam essa estrutura um antígeno protetor contra salmonelose. Portanto, fornece vantagem no estágio inicial da infecção e posteriormente são repressos para minimizar o reconhecimento do hospedeiro assim que a infecção puder ser estabelecida (Sano et al., 2007).

A maioria dos sorovares pertencentes ao gênero *Salmonella* possuem flagelos peritríqueos, com exceção dos biovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Ambos são imóveis e a ausência do flagelo favorece a invasão sistêmica, uma vez que o reconhecimento por meio dos receptores TLR-5 não ocorre durante as fases iniciais da infecção (Freitas Neto et al., 2013). Por outro lado, durante infecções por salmonelas paratíficas, as proteínas flagelares auxiliam o reconhecimento do patógeno pelo sistema imune do hospedeiro (Sporring et al., 2018).

As consequências da elevada produção de flagelina em *Salmonella* spp. têm sido alvo de estudos com diferentes modelos experimentais, variando entre abordagens *in vivo* e *in vitro* (Yang et al., 2012; Eom et al., 2013; Elhadad et al., 2015). Porém, pouco é sabido sobre a colonização e patogenicidade de bactérias superprodutoras de flagelina durante fase inicial do paratifo em aves jovens.

Dentre as possibilidades de obtenção de fenótipo superprodutor de flagelina em *Salmonella* spp., hipotetizou-se que esse objetivo poderia ser alcançado com deleções simultâneas dos genes *clpP* e *fliD*, o que levaria a estirpes mais imunogênicas, como observado previamente em outros modelos experimentais, adotando-se o “knockout” individual desses genes (Tennant et al., 2011; Sim et al., 2017). De modo geral, foram observadas alterações durante o curso da infecção em aves inoculadas com SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ sendo a patogenicidade atenuada sutilmente e com modificações na resposta imune em relação àquelas

produzidas pelas respectivas estirpes selvagens durante os primeiros dias da infecção intestinal.

Ambas estirpes de SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ foram prejudicadas na taxa de multiplicação bacteriana a partir da fase exponencial, fato atribuído a maior expressão de flagelina. Este fenótipo superflagelar foi confirmado pela captura de imagem por meio de microscopia eletrônica de varredura. O prejuízo metabólico é correlacionado com a superexpressão de flagelina, cuja transcrição flagelar aumenta nesta fase, impondo alta carga metabólica devido excessiva síntese proteica nas estirpes mutantes (Yang et al., 2012; Felgner et al., 2019), resultando em menor taxa de multiplicação em comparação as estirpes selvagens. Este dado corrobora com a concentração bacteriana observadas nos pré-inóculos administrados as aves no primeiro dia de cada estudo, em que as estirpes mutantes apresentaram concentrações inferiores em relação às respectivas estirpes selvagens.

Foi demonstrado previamente que a ausência de flagelos em SE é prejudicial para colonização intestinal em aves (Allen-Vercoe e Woodward, 1999, Barbosa et al., 2017). Por outro lado, ao que tudo indica, a produção em abundância dessa organela parece não interferir na colonização intestinal, uma vez que a excreção fecal de SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ foi semelhante à de suas respectivas estirpes selvagens ($P > 0.05$). O mesmo foi observado em estudo prévio com estirpes de STM contendo “knockout” no gene *clpP* ou no *fliD*, as quais foram incapazes de suprimir colonização intestinal tanto em aves quanto em camundongos (Rychlik, 2002; Tennant et al., 2011).

No presente estudo, os sinais clínicos desencadeados pela estirpe STM $\Delta clpP\Delta fliD$ foram mais brandos quando comparados aos provocados pela estirpe selvagem. Por outro lado, SE e SE $\Delta clpP\Delta fliD$ provocaram poucos sinais clínicos nas aves, ambas foram pouco patogênicas para as aves. Ao que tudo indica, a superprodução de flagelina por STM $\Delta clpP\Delta fliD$ alterou a biologia da infecção, provavelmente devido à estimulação mais intensa do sistema imune.

Salmonella spp. coloniza o trato intestinal e transpõe a barreira epitelial para chegar na lâmina própria e, posteriormente, estabelece infecção sistêmica. Durante este processo inicial, a flagelina promove ativação de receptores TLR-5, levando à síntese de citocinas pró-inflamatórias e estimulação do sistema imune inato (Iqbal et

al., 2005; Sanders et al., 2009; Freitas Neto et al., 2013). A ativação por flagelina proveniente dos genes *fliC* ou *fliB*, de ambos sorovares do estudo, são capazes de ativar o sistema imunológico inato por meio de interações específicas com TLR5 e NLR que levam à proteção imunológica contra infecção por *Salmonella* (EOM et al., 2013).

Todas as estirpes colonizaram de forma semelhante o fígado, baco e conteúdo cecal. Porém, houve menor recuperação significativa de SE $\Delta clpP\Delta fliD$ em baço (2 dpi) em comparação a SE selvagem. Este acontecimento pode ser relacionado a deleções individuais no gene *clpP* que atenuam a infecção devido mecanismos regulatórios que culminam no prejuízo na SPI-1 (Knudsen et al., 2013).

De fato, os resultados *in vitro* demonstraram prejuízo na aderência e infecção de macrófagos por esta estirpe mutante, sendo principalmente atribuída a desregulação de SPI-1 durante as primeiras seis horas infecção. Apesar de diversos estudos *in vitro* correlacionarem a menor contagem bacteriana em órgãos como consequência direta da dificuldade de infectar macrófagos, é sabido que *Salmonella* utiliza múltiplas rotas sistêmicas de infecção, podendo sobreviver e replicar em outras células como as dendríticas, epiteliais e outras células brancas do sangue (Boumart, Velge, Wiedemann, 2014, Herrero-Fresno et al., 2014, Lathrop et al., 2015).

Portanto, apesar da dificuldade inicial de SE $\Delta clpP\Delta fliD$ infectar macrófagos, de modo geral, a habilidade de colonização de fígado e baço não é afetada, o que é evidenciado pelas médias bacterianas semelhantes ($P < 0.05$) à colonização de SE selvagem. Apesar de diversos estudos demonstrarem que deleção do gene *clpP* em STM prejudica a taxa de infecção de macrófagos (Yamamoto, 2001, Knudsen et al., 2013), neste estudo a taxa de sobrevivência em macrófagos foram semelhantes durante infecção em aves.

Além disso, enquanto as estirpes selvagens foram recuperadas em fígado e baço durante todo o estudo, as contagens das estirpes mutantes reduziram gradualmente a partir de 14 dpi. Este fato corrobora com achados de Kremer et al. (2011) no qual observaram menor invasividade de uma cepa mutante de SE capaz de produzir mais flagelina durante a infecção de perus, atribuída à atuação da resposta imune humoral. De fato, sabe-se que a síntese de flagelina por *Salmonella*

é abolida após transpor o lúmen intestinal (Lai et al., 2013, Sporing et al., 2018), indicando que a flagelina não teria um papel na fase sistêmica da infecção. Portanto, a atuação da resposta imune que culmina na redução da carga bacteriana a partir de 14 dpi, pode ser resultado da liberação de PAMPs, do intestino para a circulação sistêmica, seguido de filtragem pelo sistema porta hepático e “clearance” pelo sistema reticuloendotelial (Pan et al., 2012).

Ativação de receptores intestinais TLR5 por flagelina é fundamental para modulação e desencadeamento da resposta imune celular do tipo Th-1, a qual auxilia na redução da multiplicação sistêmica de *Salmonella* (Iqbal et al., 2005; Berchieri Junior e Freirtas Neto, 2009; Lee e Kim, 2017). É provável que essa via de estimulação do sistema imune também tenha contribuído para o controle da infecção por SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e por STM $\Delta clpP\Delta fliD$ no presente estudo a partir de 14 dpi, o que explicaria reduções nas contagens de SE $\Delta clpP\Delta fliD$ em baço e fígado e também o abrandamento dos sinais clínicos provocados por STM $\Delta clpP\Delta fliD$.

Ao contrário do esperado, a maioria dos níveis de citocinas e quimiocinas induzidos nas aves por STM $\Delta clpP\Delta fliD$ foram semelhantes aos induzidos por STM. Somente em 7 dpi houve maior expressão de IL22 em tonsilas, e de CCL4 em baço (14 dpi). É provável que diferenças tenham ocorrido em outros mediadores da resposta imune, os quais não foram mensurados no presente estudo. A exemplo disso é sabido que níveis elevados de interferon-gama e IL-12 estariam correlacionados com o “clearance” de *Salmonella* spp. em órgãos na resposta imune adquirida do tipo Th-1 (Chappell et al., 2009), porém os mesmos não foram avaliados no presente estudo.

Por outro lado, os dados de expressão gênica demonstraram que SE $\Delta clpP\Delta fliD$ estimulou níveis mais elevados de alguns mediadores da resposta imune que sua respectiva estirpe selvagem. A exemplo, no 1º dpi, a expressão de CXCLi2 e IL17 foram significativamente repressas, enquanto que as interleucinas (IL22 e IL18) foram expressas em níveis mais altos em tonsilas cecais de aves infectadas com SE $\Delta clpP\Delta fliD$. Este resultado modulação da resposta imune com estimulação mais intensa da imunidade inata pela estirpe mutante nos primeiros dias de infecção. É possível que uma quantidade maior de receptores tenha sido estimulada pela abundância de flagelina. Esses dados corroboram com outros estudos que

demonstraram níveis mais elevados de quimiocinas pró-inflamatórias e interleucinas nos estágios iniciais da infecção por estirpes com flagelos (Iqbal et al., 2005; Lopes et al., 2016).

Para iniciar a resposta imune adaptativa, células dendríticas também exercem papel como células apresentadoras de antígenos e ativam células TCD4⁺ e TCD8⁺ por apresentação de antígenos via MHC de classe I e II, respectivamente. É esperado que infecções por *Salmonella* induzam mudanças significativas nas subpopulações de linfócitos das tonsilas cecais logo após a inoculação (Sasai et al., 2000). Variações nas populações celulares podem ser encontradas, atribuídas a idade das galinhas quando infectadas, sorovar ou dose administrada (Salisbury et al., 2014). De fato, após a infecção das aves por SE $\Delta clpP\Delta fliD$, SE, STM $\Delta cl\Delta fliD$ e STM, houve influxo das populações de células T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos, as quais foram similares nos órgãos. Diferenças foram observadas somente em comparação as aves não infectadas. Esses resultados corroboram com aqueles reportados por Lee e Kim (2017) os quais imunizaram camundongos com flagelina e encontraram discreto aumento de resposta celular por células T, como esperado em infecções por *Salmonella*.

Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que o aumento da síntese de flagelina por SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ alteraram a biologia bacteriana, evidenciado pelo prejuízo metabólico em ambas estirpes. Durante infecção de aves, a construção dos mutantes não compromete a habilidade de colonização intestinal e excreção fecal bacteriana. Apesar da não alteração da concentração das populações de macrófagos e linfócitos nos tecidos, aparentemente a resposta imune promoveu eficiente “clearance” tecidual durante infecção tardia. A estirpe SE $\Delta clpP\Delta fliD$ induziu expressão gênica em baço e tonsila consistente com a maior expressão de flagelina no primeiro dia de infecção. Já STM $\Delta clpP\Delta fliD$ demonstrou redução de patogenicidade, porém com mudanças discretas na ativação e modulação das respostas imunes inatas e adquiridas.

7 CONCLUSÃO

Nas condições em que presente estudo foi realizado foi possível concluir que:

- A superprodução de flagelina devido deleções nos genes *clpP* e *fliD* alteram o “fitness” em SE e STM, prejudicando a multiplicação bacteriana.
- A colonização intestinal e excreção fecal de SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e STM $\Delta clpP\Delta fliD$ são semelhantes às das estirpes SE e STM, respectivamente
- Estirpes de SE e STM com deleções nos genes *clpP* e *fliD* são capazes de colonizar o intestino e invadir baço e fígado de aves de forma semelhante as respectivas estirpes selvagens.
- Infecções por STM $\Delta clpP\Delta fliD$ reduzem mortalidade e atenuam sinais clínicos em comparação à STM, enquanto que em SE $\Delta clpP\Delta fliD$ e SE foram semelhantes entre si
- O influxo celular de macrófagos e linfócitos em fígado, baço e tonsilas cecais são semelhantes nas infecções pelas estirpes mutantes (SE $\Delta clpP\Delta fliD$, STM $\Delta clpP\Delta fliD$) e as respectivas estirpes selvagens.
- O perfil de citocinas e quimicinas pró-inflamatórias em tonsilas cecais de aves infectadas STM $\Delta clpP\Delta fliD$ induzem maior produção de IL22 em 7 dpi, enquanto que aqueles produzidos por aves infectadas com SE $\Delta clpP\Delta fliD$ apresentaram níveis mais elevados de IL22 e IL18 e repressão de CCL4, CXCLi2 e IL17 no intestino no início da infecção.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhikari P, Cosby DE, Cox NA, Kim WK (2017). Colonization of mature laying hens with *Salmonella* Enteritidis by oral or intracloacal inoculation. **The Journal of Applied Poultry Research** 26: 286–294.

<https://dx.doi.org/10.3382/japr/pfw072>.

Ahmad S, Ahmad M, Khan S, Ahmad F, Nawaz S, Khan FU (2017) An overview on phase variation, mechanisms and roles in bacterial adaptation. **Journal of the Pakistan Medical Association** 67: 285-291.

Aldridge C, Poonchareon K, Saini S, Ewen T, Soloyva A, Rao CV, Imada K, Minamino T, Aldridge P (2010) The interaction dynamics of a negative feedback loop regulates flagellar number in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology** 78: 1416 – 1430.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07415.x>

Allen-vercoe E, Woodward, MJ (1999) The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis to chick gut explant. **Journal of Medical Microbiology** 48: 771-780

<https://dx.doi.org/10.1099/00222615-48-8-771>.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research** 64: 5245–5250.

<https://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>

Barbosa FO, Freitas Neto OC, Batista DFA, Almeida AM, Rubio MDS, Alves LBR, Vasconcelos RO, Barrow PA, Berchieri Junior A. Contribution of flagella and motility to gut colonisation and pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in the chicken. **Brazilian Journal of Microbiology** 48: 754-759.

<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.012>

Barrow PA, Freitas Neto OC (2011) Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology** 40: 1–13

<https://doi.org/10.1080/03079457.2010.542575>

Barrow PA, Berchieri A, Freitas Neto OC, Lovell M (2015) The contribution of aerobic and anaerobic respiration to intestinal colonization and virulence for *Salmonella typhimurium* in the chicken. **Avian Pathology** 44: 401-407.
<https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1062841>

Bhandari V, Wong KS, Zhou JL, Mabanglo MF, Batey RA, Houry WA (2018) The Role of ClpP Protease in Bacterial Pathogenesis and Human Diseases. **ACS Chemical Biology** 13: 1413-1425.
<https://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.8b0012>

Basler C, Nguyen T, Anderson TC, Hancock T, Behravesh CB (2016) Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Associated with Live Poultry, United States, 1990–2014. **Emerging Infectious Diseases** 22: 1705- 1711.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid2210.150765>

Batista DFA, Freitas Neto OC, Almeida AM, Barrow PA, Barbosa FO, Berchieri Junior A (2016) Molecular identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by a duplex PCR assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 28: 419–422.
<http://dx.doi.org/10.1177/1040638716651466>

Bäumler A, Fang FC (2013) Host specificity of bacterial pathogens. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. 10: 1 - 20.
<https://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a010041>

Berchieri Junior A, Freitas Neto OC (2009) Salmoneloses Aviárias. In: Berchieri Junior A, Silva EM, Di Fábio J, Sesi L, Zuanaze MAF (2 Ed.) **Doença das Aves**. Campinas: FACTA, p. 1-17.

Berchieri Junior A, Wigley, Page K, Murphy CK, Barrow PA (2001) Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian Pathology** 30: 297-310.
<https://dx.doi.org/10.1080/03079450120066304>

Brenner DJ, Farmer J (2015) Enterobacteriaceae. In: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, Hedlund B, Dedysh S (eds) **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, Nova Jersey: John Wiley & Sons, p: 1–24.
<https://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222>

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry** 55: 611-622.
<https://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Buzzo CL, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, Cunha LD, Russo M, Zamboni DS, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR (2010) A novel pathway for inducible nitric oxide synthase activation through inflammasomes. **The Journal of Biological Chemistry** 42: 32087–32095.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.124297>.

Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG, Parkhill J (2005) ACT: the Artemis comparison tool. **Bioinformatics** 21: 3422–3423.
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti553>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL PREVENTION - CDC (2018). **National Outbreak Reporting System (NORS) Dashboard 1998-2016**. National center for emerging and zoonotic infectious diseases.

Chappell L, Kaiser P, Barrow PA, Jones MA, Johnston C, Wigley P (2009) The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 128: 53-59.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.295>.

Cherepanov PP, Wackernagel W (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: c^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. **Gene** 158: 1995.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00193-a](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00193-a)

Chevance FF, Hughes KT (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature Reviews Microbiology** 6: 455- 465.
<https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1887>.

Coburn B, Sekirov I, Finlay BB (2007) Type III secretion systems and disease. **Clinical Microbiology Review** 20: 535-549.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00013-07>.

Crhanova M, Hradecka H, Faldynova M, Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2011) Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. **Infection and Immunity** 79: 2755-2763.

<https://doi.org/10.1128/IAI.01375-10>.

Das C, Mokashi C, Mande SS, Saini S (2018) Dynamics and Control of Flagella Assembly in *Salmonella* typhimurium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 8: 36.

<http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2018.00036>

Dar MA, Ahmad SM, Bhat SA, Ahmed R, Urwat U, Mumtaz PT, Bhat SA, Dar TA, Shah RA, Ganai NA (2017) *Salmonella* typhimurium in poultry: a review. **World's Poultry Science Journal** 73: 345 – 354

<https://dx.doi.org/10.1017/S0043933917000204>

Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academic Science** 97: 6640–6645.

<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>

De boever S, Vangestel C, De backer P, Croubels S, Sys Su (2008) Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 122: 312-317

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.12.002>.

Eberth CJ (1880) Die Organismen in den Organen von Typhus abdominalis. **Virchows Archiv der pathologischen Anatomie** 81: 58–73.

Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, Usera MA (2002) Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. **Research in Microbiology** 153: 107-113.

[https://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01295-5](https://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01295-5)

Elhadad D, Desai P, Grassi GA, McClelland M, Rahav G, Gal-Mor O (2016) Differences in Host Cell Invasion and *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Expression between *Salmonella* enterica Serovar Paratyphi A and Nontyphoidal S. Typhimurium. **Infection and Immunity** 84: 1150-1165.

<https://dx.doi.org/0.1128/IAI.01461-15>

Elias SO, Decol LT, Tondo EC (2018) Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014. **Food Quality and Safety** 2: 173 – 181. <https://dx.doi.org/10.1093/fqsafe/fyy022>

Eng SK, Pusparajah P, Mutalib NSA, Ser HL, Chan KG, Lee LH (2015) *Salmonella*: a review on pathogenesis epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers of Life and Science** 8: 284–293. <https://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

Eom JS, Kim JS, Jang JI, Kim B, Yoo SY, Choi JH, Bang I, Lee IS, Park YK (2013) Enhancement of Host Immune Responses by Oral Vaccination to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Harboring Both *FliC* and *FljB* Flagella. **PloS One** 8: e74850. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074850>

Fan WQ, Wang HN, Zhang Y, Guan ZB, Wang T, Xu CW, Zhang AY, Yang X (2012) Comparative dynamic distribution of avian infectious bronchitis virus M41, H120, and SAIBK strains by quantitative real-time RT-PCR in SPF chickens. **Bioscience Biotechnolpgy and Biochemistry** 76: 2255-2260. <https://dx.doi.org/10.1271/bbb.120521>

Felgner S, Spöring I, Pawar V, Kocijancic D, Preusse M, Falk C, Rohde M, Häussler S, Weiss S, Erhardt M (2019) The immunogenic potential of bacterial flagella for *Salmonella*-mediated tumor therapy. **International Journal of Cancer** 00: 01 -13 <https://doi.org/10.1002/ijc.32807>

Ferreira EO, Campos LC (5 Ed) (2008) Microbiologia. São Paulo. Athemeu, 338p.

Foley SL, Johnson TJ, Ricke SC, Nayak R, Danzeinen J (2013) *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated sorovars. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 77: 582-607. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00015-13>.

Ford L, Moffatt CRM, Fearnley E, Miller M, Gregory J, Sloan-Gardner TS, Polkinghorne BG, Bell R, Franklin N, Williamson DA, Glass K, Kirk MD (2018) The Epidemiology of *Salmonella enterica* Outbreaks in Australia, 2001–2016. **Frontiers in Sustainable Food Systems**. 2: 1 – 8. <http://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2018.00086>

Frees D, Qazi SN, Hill PJ, Ingmer H (2003) Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. **Molecular Microbiology** 48: 1565-1578.

<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03524.x>

Freitas Neto OC, Penha Filho RAC, Barrow P, Berchieri Junior A (2010) Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science** 12: 1 – 11.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2010000100001>

Freitas Neto OC, Setta A, Imre A, Bukovinski A, Elazomi A, Kaiser P, Berchieri A Junior, Barrow PA, Jones MA (2013) 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** 165: 425–433.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.015>

Galán JE (2001) *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annual review of cell and developmental biology** 17: 53-86.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.53>

Gal-mor O, Boyle EC, Grassi GA (2014) Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* enterica serovars differ. **Frontiers in Microbiology** 5: 391-401.

<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>

Gama NMSQ, Berchieri Junior A, Fernandes SA (2003) Occurrence of *Salmonella* sp in laying hens. **Brazilian Journal of Poultry Science** 5: 15-21.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2003000100002>

Gast RK, Regmi P, Guraya R, Jones DR, Anderson KE, Karcher DM (2019) Colonization of internal organs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens of four commercial genetic lines in conventional cages and enriched colony housing **Poultry Science** 98: 1785–1790.

<https://dx.doi.org/10.3382/ps/pey541>

Gay NJ, Keith FJ (1991) *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. **Nature** 351: 355-356.

<https://dx.doi.org/10.1038/351355b0>

Gottesman S (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. **Annual Review of Cell and Development Biology** 19:565-587.

<https://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153228>

Grimont PAD, Weill FX (9 Ed) (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars. Paris, Instituto Pasteur: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 166 p.

Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Protein folding—molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science** 295:1852–1858.

<https://dx.doi.org/10.1126/science.1068408>

Heyes KM, Hayes RJ, Turk MA, Pope JE (2019) Evolving patterns of reactive arthritis. **Clinical Rheumatology** 38: 2083 -2088.

<https://doi.org/10.1007/s10067-019-04522-4>

He GZ, Tian WY, Qian N, Cheng AC, Deng SX (2010) Quantitative studies of the distribution pattern for *Salmonella* Enteritidis in the internal organs of chicken after oral challenge by a real-time PCR. **Veterinary Research Communications** 34: 669–676.

<https://dx.doi.org/0.1007/s11259-010-9438-6>

Hensel M (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. **Molecular Microbiology** 36: 1015-1023

<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01935.x>

Hensel M (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella* enterica. **International Journal of Medical Microbiology** 294: 95-102.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>

Hoelzer K, Switt AIM, Wiedmann M (2011) Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. **Veterinary Research** 42: 34-61.

<http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-42-34>

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (9 Ed) (1994) Bergey's Manual of determinative Bacteriology. Baltimore, Willians and Wilkins, 787p.

Horstmann JA, Zschieschang E, Truschel T, de Diego J, Lunelli M, Rohde M, May T, Strowig T, Stradai T, Kolbe M, Erhardt M (2017) Flagellin phase-dependent swimming on epithelial cell surfaces contributes to productive *Salmonella* gut colonisation. **Cellular Microbiology** 19: e12739.
<https://doi.org/10.1111/cmi.12739>.

Hugas M, Beloil PA (2014) Controlling *Salmonella* along the food chain in the European Union - progress over the last ten years.

Imre A, Szmolka A, Olasz F, Nagy B (2015) Vaccine potential of a nonflagellated, virulence-plasmid-cured (fliD-, pSEVΔ) mutant of *Salmonella* Enteritidis for chickens. **Acta Veterinaria Hungarica** 63: 285-302.
<https://doi.org/10.1556/004.2015.027>.

Iqbal M, Philbin VJ, Withanage GSK, Wigley P, Beal RK, Goodchild MJ, Barrow P, Mcconell I, Maskell DJ, Young J, Bumstead N, Boyd N, Smith AL (2005) Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella* enterica serovar typhimurium identification and functional characterization of chicken toll-like receptor. **Infection and Immunity** 73: 2344–2350.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2344>

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, De Pinna Em Nair S, Fields PI, Weill FX (2014) Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology** 165: 526–530.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>.

Jajere SM (2019) A review of *Salmonella* enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World** 12: 504 – 521.
<http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology** 20: 197-216.
<https://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>

Kirstein J, Moliere, N, Dougan DA, Turgay K (2009) Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. **Nature Reviews Microbiology** 7: 589-599.
<https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2185>

Knudsen GM, Olsen JE, Aabo S, Barrow P, Rychlik I, Thomsen LE (2013) *ClpP* deletion causes attenuation of *Salmonella* Typhimurium virulence through misregulation of RpoS and indirect control of *CsrA* and the SPI genes. **Microbiology** 159: 1497 – 1509.

<https://dx.doi.org/10.1099/mic.0.065797-0>

Knudsen GM, Nielsen M, Thomsen LE, Aaabo S, Rychlik I, Olsen JE (2014) The role of ClpP, RpoS and CrsA in growth and filament formation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at low temperature. **BMC Microbiology** 14: 208-219.

<https://dx.doi.org/10.1186/s12866-014-0208-4>

Kremer CJ, O'Meara KM, Layton SL, Hargis BM, Cole K (2011) Evaluation of recombinant *Salmonella* expressing the flagellar protein fliC for persistence and enhanced antibody response in commercial turkeys. **Poultry Science** 90: 752- 758

<https://doi.org/10.3382/ps.2010-01076>.

Kurtz JR, Goggins JL, McLachlan (2017) *Salmonella* infection: interplay between the bacteria and host immune system. **Immunology letters** 190: 42 – 50.

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>

Kutsukake K, Ikebe T, Yamamoto S (1999) Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. **Genes & Genetics Systems** 74: 287–292.

<https://dx.doi.org/10.1266/ggs.74.287>

Lai MA, Quarles EK, López-Yglesias A, Zhao X, Hajjar AM, Smith KD (2013) Innate Immune Detection of Flagellin Positively and Negatively Regulates *Salmonella* Infection. **PLoS One** 8: e72047.

<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072047>

Lathrop SK, Binder KA, Starr T, Cooper KG, Chong A, Carmody AB, Steele-Mortimer O (2015) Replication of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Human Monocyte-Derived Macrophages. **Infection and Immunity** 83: 2661 – 2671.

Lee MS, Kim Y (2007) Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. **Annual Review of Biochemistry** 76: 447-480.

<https://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060605.122847>

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods** 25: 402–408.

<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lee SJ, Benoun J, Sheridan BS, Fogassy Z, Pham O, Pham QM, Puddington L, Mcorley SJ (2017) Dual Immunization with SseB/Flagellin Provides Enhanced Protection against *Salmonella* Infection Mediated by Circulating Memory Cells. **Journal of Immunology** 199:1353-1361
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601357>

Le Minor L, Veron M, Popoff M (1982) A proposal for *Salmonella* nomenclature. **Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie** 133:245–254.

Lourenço PL, Barbosa FO, Rubio MS (2016) Situação no país e global. **Avisite**. 4: 7-10.

Lopes PD, Freitas Neto OC, Batista DFA, Denadai J, Alarcon MFF, Almeida AM, Vasconcelos RO, Setta A, Barrow PA, Berchieri Junior A (2016) Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum, **The Veterinary Journal** 214:40–46
<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tvjl.2016.05.006>.

Malorny B, Bunge C, Helmuth R (2007) A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. **Journal of Microbiological Methods** 70:245–251.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.013>

Macnab R. M (1992) Genetics and biogenesis of bacterial flagella. **Annual Review of Genetics** 26: 131–158
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.001023>

Marus JR, Magee MJ, Manikonda K, Nichols MC (2019) Outbreaks of *Salmonella enterica* infections linked to animal contact: Demographic and outbreak characteristics and comparison to foodborne outbreaks—United States, 2009–2014. **Zoonoses and Public Health** 66: 370 – 376.
<https://dx.doi.org/10.1111/zph.12569>

Messens W, Grjspeerdt K, Herman L (2005) Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. **British Poultry Science** 46: 694 -700.
<https://dx.doi.org/10.1080/00071660500395582>

Minamino T, Morimoto YV, Kawamoto A, Terashima H, Imada K (2018) *Salmonella* flagellum. **IntechOpen** 306p.
<https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73277>

Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S (2000) *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid fever. **The Journal of Experimental Medicine** 192: 249-258.
<https://dx.doi.org/10.1084/jem.192.2.249>

Pan Z, Cong Q, Geng S, Fang Q, Kang X, You M, Jiao X (2013) Flagellin from Recombinant Attenuated *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Reveals a Fundamental Role in Chicken Innate Immunity. **Clinical and Vaccine Immunology** 19: 304-312
<https://dx.doi.org/10.1128/CVI.05569-11>

Park SH, Hanning I, Jarquin R, Moore P, Donoghue DJ, Donoghue AM, Ricke SC (2011) Multiplex PCR assay for the detection and quantification of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* serotypes in water samples. **FEMS Microbiology Letters** 316: 7-15.
<https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02188.x>

Paul MS, Brisbin JT, Abdul-Careem MF, Sharif S (2013) Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. **Veterinary, Immunology and Immunopathology** 152: 191-199.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.10.013>

Popoff MY, Bockemühl J, Hickman-Brenner FW (1996) Kauffmann- White Scheme. **Research in Microbiology**. 147: 765-769.

Rahman HS, Mahmoud BM, Othman HH, Amin K (2018) A Review of History, Definition, Classification, Source, Transmission, and Pathogenesis of *Salmonella*: A Model for Human Infection. **Journal of Zankoy Sulaimani** 3: 11 - 21.
<http://dx.doi.org/10.17656/jzs.10730>

Zamora-Sanabria R, Alvarado AM (2017) Preharvest *Salmonella* risk contamination and the control strategies. In: Current Topics in *Salmonella* and Salmonellosis. **IntechOpen**, London. p193-213

Renault TT, Abraham AO, Bergmiller T, Paradis G, Rainville S, Charpentier E, Guet CC, Tu Y, Namba K, Keener JP, Minamino T, Erhardt M (2017) Bacterial flagella grow through an injection-diffusion mechanism. **Elife** 6: e23136.
<https://dx.doi.org/10.7554/eLife.23136>

Rychlik I, Karasova D, Sebkova A, Volf J, Sisak F, Havlickova H, Kummer V, Imre A, Szmolka A, Nagy B (2009) Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology** 9: 268-277.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-268>

Richlyk I, Elsheimer-Matulova M, Kyrova K (2014) Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. **Veterinary Research** 45: 119- 133.
<https://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0119-2>

Ritter AC, Tondo EC (2008) Foodborne illnesses in Brazil: Control measures for 2014 FIFA World Cup travellers. **Journal of Infection in developing countries** 8: 254–257.
<https://dx.doi.org/10.3855/jidc.4431>

Rukambile E, Sintchenko V, Muscatello G, Kock R, Alders R (2019) Infection, colonization and shedding of *Campylobacter* and *Salmonella* in animals and their contribution to human disease: A review. **Zoonoses and Public Health** 66: 562 – 578.
<https://dx.doi.org/10.1111/zph.12611>

Salisbury A, Leeming G, Nikolau G, Kipar A, Wigley P (2014) *Salmonella* Virchow infection of the chicken elicits cellular and humoral systemic and mucosal responses, but limited protection to homologous or heterologous re-challenge. **Frontiers in Veterinary Science** 1: 1 – 13.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2014.00006>

Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 662p.

Sanders CJ, Franchi L, Yarovinsky F, Uematsu S, Núñez G, Gewirtz AT (2009) Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity. **European Journal of Immunology** 39: 359- 371
<https://doi.org/10.1002/eji.200838804>.

Sano G, Takada Y, Goto S, Maruyama K, Shindo Y, Oka K, Matsui H, Matsuo K (2007) Flagella facilitate escape of *Salmonella* from oncotic macrophages. **Journal of Bacteriology** 189: 8224–8232
<https://doi.org/10.1128/JB.00898-07>

Schmitt CK, Darnell SC, O'Brien AD (1996) The Attenuated Phenotype of a *Salmonella typhimurium* flgM Mutant Is Related to Expression of FliC Flagellin. **Journal of Bacteriology** 178: 2911 – 2915.

Secretaria em Vigilância da Saúde SVS (2015)
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/10/Apresenta---o-dados-gerais-DTA-2016.pdf>.

Setta A, Barrow PA, Kaiser P, Jones MA (2012) Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars; bacterial invasion and persistence, nitric oxide and oxygen production, differential host gene expression, NF- κ B signalling and cell cytotoxicity. **Veterinary Immunology Immunopathology** 146: 212–224.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.03.008>

Shivaprasad HL (2000) Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue Scientifique et technique** 19: 405 – 424.
<https://dx.doi.org/0.20506/rst.19.2.1222>

Shivaprasad HL, Timoney JF, Morales S, Lucio B, Baker RC (1990) Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. **Avian Diseases** 34:548–557.

Sim M, Koirala S, Picton D, Strahl H, Hoskisson PA, Rao CV, Gillespie CS, Aldridge PD (2017) Growth rate control of flagellar assembly in *Escherichia coli* strain RP437. **Science Reports** 7: 1-11.
<https://doi.org/10.1038/srep41189>

Song WS, Cho SY, Hong HJ, Park SC, Yoon SI (2017) Self-Oligomerizing Structure of the Flagellar Cap Protein FliD and Its Implication in Filament Assembly. **Journal of Molecular Biology** 429: 847-857
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.001>

Spöring I, Felgner S, Preube M, Eckweiler D, Rohde M, Häussler S, Weiss S, Erhardt M (2018) Regulation of Flagellum Biosynthesis in Response to Cell Envelope Stress in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **MBio** 9: e00736-17.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00736-17>.

Steele-Mortimer O (2008) Infection of epithelial cells with *Salmonella enterica*. **Bacterial Pathogenesis** 431: 201-211.
https://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-032-8_16

Szmolka S, Matulova ME, Rychlik I (2018) Impact of *fliD* and virulence plasmid pSEV on response of chicken embryo fibroblasts to *Salmonella* Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 196: 1-4.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.12.003>

Tennant SM, Wang JY, Galen JE, Simon R, Pasetti MF, Gat O, Levine MM (2011) Engineering and preclinical evaluation of attenuated nontyphoidal *Salmonella* strains serving as live oral vaccines and as reagent strains. **Infection Immunology** 79: 4174-4185.
<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.05278-11>

Thomsen LE, Olsen JE, Foster JW, Inqmer H (2002) *ClpP* is involved in the stress response and degradation of misfolded proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbiology** 148: 2727-2733.
<https://dx.doi.org/10.1099/00221287-148-9-2727>

Tomoyasu T, Takaya A, Isogai E, Yamamoto T (2003) Turnover of *FliH* and *FliC*, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. **Molecular Microbiology** 48: 443-452.
<https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03437.x>

Troxell B (2016) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium utilizes the ClpPX and Lon proteases for optimal fitness in the ceca of chickens. **Poultry Science** 95: 1617–1623.
<https://doi.org/10.3382/ps/pew103>

Truong AD, Park B, Ban J, Hong YH (2016) The novel chicken interleukin 26 protein is overexpressed in T cells and induces proinflammatory cytokines. **Veterinary Research** 47: 65 - 75.
<https://doi.org/10.1186/s13567-016-0342-0>

United States Department of Agriculture - USDA. Cost Estimates of Foodborne Illness.

<https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses/>

Yamamoto T, Sashinami H, Takaya A, Tomoyasu T, Matsui H, Kikuchi Y, Hanawa T, Kamiya S, Nakane A (2001) Disruption of the Genes for ClpXP Protease in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Results in Persistent Infection in Mice and Development of Persistence Requires Endogenous Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infection and Immunity* 69: 3164 – 3174.

<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.5.3164-3174.2001>

Yamamoto M, Takeda K, Akira S (2004) TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. ***Molecular Immunology*** 40: 861-868.

<https://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.006>

Yang X, Thornburg T, Suo Z, Robison A, Li J, Lim T, Cao L, Hoyt T, Avci R, Pascual DW (2012) Flagella overexpression attenuates *Salmonella* pathogenesis. ***Plos one***. 7: 91-99.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046828>

Yonekura K, Maki S, Morgan DG, Derosier DJ, Vonderviszt F, Imada K, Namba K (2000) The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. ***Science*** 290: 2148-2152

<https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2148>

Zancan FB, Berchieri Junior A, Fernandes SA, Gama NMSQ (2000) *Salmonella* spp. investigation in transport box of day-old birds. ***Brazilian Journal of Microbiology*** 31: 230-232.

<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000300016>

Weichart D, Querfurth N, Dreger M, Hengge-Aronis R (2003) Global role for ClpP-containing proteases in stationary phase adaptation of *Escherichia coli*. ***Journal of Bacteriology*** 185: 115–125.

<https://dx.doi.org/10.1128/jb.185.1.115-125.2003>