

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**Assunto de interesse: Interações entre *Salmonella Gallinarum* e
Macrófago com ênfase na adesão, invasão, sobrevivência e multiplicação
dentro do Macrófago.**

Guilherme William Eugênio

Orientador: Prof. Dr. Mateus de Souza Ribeiro Mioni

Trabalho apresentado à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, para
Graduação em Medicina Veterinária

**JABOTICABAL - SP
2º SEMESTRE - 2024**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**Relatório final do Estágio Curricular em Pesquisa e Extensão Veterinária,
realizado junto ao Laboratório de Ornintopatologia – FCAV/UNESP**

**Assunto de interesse: Interações entre *Salmonella* Gallinarum e
Macrófago com ênfase na adesão, invasão, sobrevivência e multiplicação
dentro do Macrófago.**

Guilherme William Eugênio

Orientador: Prof. Dr. Mateus de Souza Ribeiro Mioni

Relatório do Estágio Curricular em
Pesquisa e Extensão Veterinária,
Campus de Jaboticabal, Unesp, para
Graduação em Medicina Veterinária.

JABOLTICABAL – SP

2º SEMESTRE 2024

E87i Eugênio, Guilherme William
Interações entre Salmonella Gallinarum e Macrófago com ênfase na adesão, invasão, sobrevivência e multiplicação dentro do Macrófago. / Guilherme William Eugênio. -- Jaboticabal, 2024
61 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Mateus de Souza Ribeiro Mioni

1. Salmonella. 2. Macrófago. 3. Laboratórios Biológicos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus Jaboticabal



GUILHERME WILLIAM EUGÊNIO

INTERAÇÕES ENTRE *SALMONELLA GALLINARUM* E MACRÓFAGO COM
ÊNFASE NA ADESÃO, INVASÃO, SOBREVIVÊNCIA E MULTIPLICAÇÃO
DENTRO DO MACRÓFAGO.

Relatório de Estágio em Pesquisa e Extensão apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Mateus de Souza Ribeiro Mioni

Área de Concentração: Ornitopatologia

Data da defesa: 02/12/2024

(x) Aprovado
() Reprovado


Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br MATEUS DE SOUZA RIBEIRO MIONI
Data: 15/12/2024 09:36:04-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Mateus de Souza Ribeiro Mioni
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

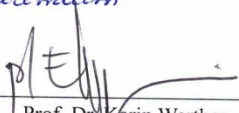
Documento assinado digitalmente
gov.br CAMILA DE FATIMA NASCIMENTO
Data: 13/12/2024 07:50:42-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Me. Camila de Fatima Nascimento
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal


Prof. Me. Viviane Amorim Ferreira
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em:

14 1 01 102025
"ad referendum"


Prof. Dr. Karin Werther
Chefe do Departamento

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço minha família pelo apoio, cobrança e amor incondicional. Agradeço também meu orientador Prof. Dr. Mateus pela oportunidade, apoio e paciência; ao Prof. Dr. Angelo por abrir seu laboratório para a realização do estágio curricular.

A todos os colegas do Departamento de Patologia Animal da FCAV, em especial a técnica responsável pelo laboratório de Ornitopatologia, Adriana, pelos ensinamentos.

Aos alunos do departamento, em especial a doutoranda Camila e o pós-doutorando Mauro, pelas conversas engrandecedoras durante o período do estágio.

Ao meu amigo Luiz por fazer os anos finais da minha graduação serem mais agradáveis e divertidos; agradeço também aos meus amigos e colegas de turma pelo tempo que passamos juntos e por todas as dificuldades que vencemos.

Agradeço a instituição FCAV por prover infraestrutura e condições para aprender o máximo sobre a profissão Medicina Veterinária; aos professores das disciplinas da graduação que foram de extrema relevância para minha formação.

A graduação foi um período muito difícil na minha vida e quero ressaltar que sem a ajuda de minha família eu não teria conseguido, em especial a ajuda da minha irmã que me incentivou a ter resiliência no decorrer da confecção deste trabalho.

Sumário

I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL	10
2.1. LABORATÓRIO DE ORNITOPATOLOGIA	10
3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DO ESTÁGIO	11
3.1. PREPARO DE MEIOS NUTRITIVOS	11
3.2. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA <i>SALMONELLA</i> SPP.	13
3.3. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)	17
3.4. TRANSDUÇÃO DE GENES	18
3.5. CONTAGEM BACTERIANA	20
3.6. NECRÓPSIA EM AVES COMERCIAIS	22
3.7. MANEJO E DESCARTE DE MATERIAIS CONTAMINADOS E CONTAMINANTES	24
4. DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	26
5. CONCLUSÃO	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
II. ASSUNTO DE INTERESSE	31
1. INTRODUÇÃO	31
2. REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1. DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA NA AVE	32
2.2. IMUNOPATOGENIA	33
2.2.1. <i>Mecanismos de imunidade do macrófago</i>	34
2.2.2. <i>Vacúolo Contendo Salmonella (SCV)</i>	34
2.3. ILHAS DE PATOGENICIDADE DE <i>SALMONELLA</i> (SPIs)	35
2.3.1. <i>A ilha de Patogenicidade de Salmonella 1 (SPI-1)</i>	35
2.3.2. <i>A ilha de Patogenicidade de Salmonella 2 (SPI-2)</i>	39
2.3.3. <i>A Ilha de Patogenicidade de Salmonella 3 (SPI-3)</i>	40
2.3.4. <i>Ilhas auxiliares e pseudogenes</i>	41
2.3.5. <i>A ilha de patogenicidade de Salmonella 13 (SPI-13)</i>	42
2.3.6. <i>A ilha de patogenicidade de Salmonella 14 (SPI-14)</i>	43
2.3.7. <i>A ilha de patogenicidade de Salmonella 19 (SPI-19)</i>	43
2.4. IMPORTÂNCIA DA COBALAMINA	44
3. DISCUSSÃO	45
4. CONCLUSÃO	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

Tabela De Siglas

°C - Grau Celsius

µg – Micrograma

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC 25922 – Estirpe de *Escherichia Coli* padronizada

C63PI - Cepa (*Strain Identifier*)

Caspase – Cas = cisteína, Pase = aspartase

CbiA – *Cobalamin biosynthesis A*

Cdc42 - *Cell Division Cycle 42*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

chTLR - *Chicken Toll Like Receptor*

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CobS – *Cobalamin biosynthesis S*

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CpG – Citosina – Fosfodiéster -Guanina

Css4 – *Cysteine Synthase*

DGA - D-Glucurônico

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EPEC - *Escherichia coli* patogênica

F-actina - Forma polimerizada da actina

GALT - Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal

GTPases Rho - Proteínas monoméricas que atuam como interruptores moleculares

H₂S - Sulfeto de hidrogênio

HD11 – *Homeobox Domain 11*

HilA - *Histone-like A*

HsRMA1 - *Homo sapiens Regulated by Maturation 1*

IL-18 - Interleucina-18

INOS - Óxido nítrico sintase induzível

InvB – Proteína de invasão B

InvF – Proteína de Inversão F

IpaB - *Invasion plasmid antigen B*
IQGAP1 - *Ras GTPase-activating-like protein 1*
KefB - *K⁺ efflux system B*
LAMP1 - *Lysosome-associated membrane glycoprotein 1*
LB - Luria Bertani
LPS - Lipopolissacarídeo
LTA – Lipoteichoic acid Tissue
mgsA - *Methylglyoxal Synthase A*
MgtB - *Magnesium transport B*
MgtC - *Magnesium transport C*
MH - Mueller Hinton
MisL - *Mission-specific L*
mL – Mililitro
NF-κB - Fator Nuclear κB
NK - Natural Killer
nm - Nanomêtro
Operon MgtCB – Operon Magnesium transport C-B
PBS – *Phosphate-buffered saline*
Pips - *Proteins Involved in Pathogenicity*
PKB - *Protein Kinase B*
PIIP - *Periplasmic Protease Inhibitor Protein*
PRRs - Receptores reconhecedores de padrões moleculares
qPCR – *quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction*
Rac1 - *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
RNA - Ácido ribonucleico
SCV - Vacúolo Contendo *Salmonella*
SG -*Salmonella Gallinarum*
Sifs - *Salmonella-induced filaments*
SM - *Salmonella Minnesota*
SopB/SigD - *Salmonella outer protein B/ Sigma fator D*
Sops - proteínas externas de *Salmonella*
Spi - *Salmonella Invasion Protein*

SPIs - Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella*
SptP - *Salmonella protein P*
ssAD - *Site-Specific AD*
Sse's - Proteínas efetoras encontradas em *Salmonella*
STM - *Salmonella Typhimurium*
T3SS - Sistema de Secreção do Tipo 3
T5SS - Sistema de secreção do Tipo 5
T6SS - Sistema de Secreção do Tipo 6
TLR - Receptores *Toll-Like*
TRIM - *Tripartite Motif-containing proteins*
tRNAs - RNA de transferência
tRNA SelC – tRNA transportador de selenocisteína
TSI - *Triple Sugar Iron*
Ttr - Tetrionato redutase
TYR - Tiramina
UFC - Unidades formadoras de colônias
ValV tRNA - tRNA transportador de valina (Val)
VB - Verde Brilhante
VgrG - *Valine-glycine repeat protein G*
XLD - Desoxicolato de Xilose e Lisina.

I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

1. Introdução

No período compreendido entre agosto e dezembro de 2023, foi realizado o estágio curricular obrigatório com o total de 600 horas, como parte das exigências para a conclusão do curso de Medicina Veterinária na FCAV/UNESP. Durante essa etapa desenvolveu-se atividades no laboratório de Ornitopatologia, supervisionado pela equipe do laboratório do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior. O estágio prático em pesquisa desempenha um papel crucial na formação do profissional de Medicina Veterinária, proporcionando uma experiência valiosa no enfrentamento de desafios práticos *in vivo* e *in vitro* relacionados à saúde animal e à segurança alimentar, acompanhando a rotina laboratorial, manejo dos animais, e as análises das amostras coletadas nos experimentos.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL

2.1. Laboratório de Ornitopatologia

O laboratório de Ornitopatologia com nível dois de biossegurança (NB2), sob a coordenação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, tem como foco Salmoneloses de importância para a avicultura e saúde pública, além de resistência a antimicrobianos, testagem de protocolos profiláticos em experimentos *in vivo* e análise genômica. O laboratório dispõe salas equipadas para o desenvolvimento de atividades nos campos da microbiologia, análises genômicas e, no manejo das aves utilizadas nos experimentos, como autoclaves, estufas, balanças de precisão, bancadas, bicos de Bunsen, pipetadores, máquina para qPCR, entre outros diversos materiais utilizados na rotina do laboratório. Possibilitando um ambiente fértil de descobertas, que auxilia no desenvolvimento de novos conhecimentos. Está localizado no Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal – UNESP.

Durante o período de estágio, o laboratório era composto por uma responsável técnica, dois estudantes de doutorado, um pós-doutorando, dois mestrandos e seis graduandos.

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DO ESTÁGIO

3.1. Preparo de Meios Nutritivos

3.1.1. Importância na Pesquisa

O preparo de meios nutritivos é uma etapa fundamental em experimentos microbiológicos, visando fornecer condições ideais para a multiplicação de microrganismos. Na realização de cultivo bacteriano, há diversos meios nutritivos com funções diferentes, podendo favorecer ou inibir bactérias de interesse. São utilizados diversos métodos de plaqueamentos de amostras retiradas de experimentos *in vivo*, do ambiente, instalações, ou a campo (Sejas *et al.*, 2002; Freshney, 2010). A tabela a seguir lista alguns dos meios nutritivos que foram utilizados no laboratório durante o estágio, com as suas funções e aplicações na pesquisa (Autoria Própria).

Tabela 1: Meios nutritivos utilizados na rotina laboratorial que acompanhei, contendo composição e suas aplicações

Meio de Cultura	Composição Principal	Funções/Aplicações
Ágar MacConkey	Lactose, sais biliares, cristal violeta, vermelho neutro.	Meio seletivo para bacilos gram-negativos. Diferencia fermentadores e não fermentadores de lactose.
Ágar Hektoen Enteric (HE)	Lactose, sacarose, tiosulfato de sódio, sais biliares, azul de bromotimol.	Meio seletivo e diferencial. Destaca produção de H ₂ S e diferencia fermentação de carboidratos.
Ágar VB (Brilhante Verde)	Verde brilhante, lactose, sacarose.	Meio altamente seletivo para <i>Salmonella</i> . Inibe a maioria dos outros organismos entéricos.
Caldo Selenito	Selenito de sódio.	Meio de enriquecimento seletivo, especialmente útil para isolar <i>Salmonella</i> de amostras fecais.
Meio LB (Luria-Bertani)	Tripton, extrato de levedura, cloreto de sódio.	Meio rico e não seletivo, usado para crescimento geral de bactérias, incluindo <i>Salmonella</i> .
Ágar XLD (Xilose Lisina Desoxicolato)	Xilose, lisina, tiosulfato de sódio, desoxicolato de sódio.	Meio seletivo e diferencial para <i>Salmonella</i> . Diferencia fermentadores de xilose e detecta produção de H ₂ S.
Mueller-Hinton (MH)	Amido, extrato de carne bovina, caseína hidrolisada, ágar.	Meio nutritivo básico, utilizado amplamente em testes de sensibilidade antimicrobiana devido à sua composição padronizada, que minimiza interferências na difusão de antibiótico
Ágar LIA (Lisina Ferro Ágar)	Lisina, glicose, tiosulfato de sódio, citrato de ferro de amônio, púrpura de bromocresol.	Meio diferencial utilizado para a identificação de enterobactérias com base na descarboxilação da lisina e produção de H ₂ S. Útil para diferenciar <i>Salmonella</i> de outras espécies.
Ágar TSI (Triplo Açúcar Ferro)	Peptonas, glicose, lactose, sacarose, sulfeto de sódio, Ferro,	Meio diferencial que avalia fermentação dos açúcares, produção de gás e formação de H ₂ S. Utilizado na identificação sugestiva de <i>Salmonella</i> spp.

Fonte: Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp., 2011.

3.1.2. Materiais e Métodos

A seguir descrevo o preparo de ágar LB em placas de Petri, os materiais necessários incluem placas de Petri estéreis, ágar LB em pó, autoclave para esterilização e bico de Bunsen para manter um microambiente estéril. O procedimento inicia-se com a pesagem de 32,8g de ágar LB em pó e é dissolvido em 800 mL de água deionizada em um balão volumétrico de 1000 mL homogeneizando com movimentos circulares. O balão volumétrico é tampado com uma rolha de papel alumínio e sobre a rolha é colocado um papel pardo com fita para autoclave embalando o gargalo, posteriormente é acomodado em autoclave e quando atingida a temperatura de 121°C é deixado por 15 minutos, realizado para a esterilização do meio, após esse prazo é retirado o balão volumétrico da autoclave e mantido em banho maria à 60°C para não resfriar, pois o meio se solidifica. A transferência do meio do balão volumétrico para as placas de Petri é realizada ao lado do bico de Bunsen, para manter a esterilização do meio. É colocado aproximadamente 15 mL em cada placa formando uma camada de gel ágar em toda a superfície da placa, após a solidificação do meio a placa está pronta para uso e pode ser guardada em geladeira de materiais não contaminados. Os meios são produzidos de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.1.3. Importância da execução correta da técnica

O preparo de meios nutritivos é crucial para o sucesso de experimentos microbiológicos, fornecendo o ambiente propício para a multiplicação e observação de microrganismos. Durante esse processo, a esterilização é elemento-chave que impactam diretamente nos resultados. A esterilização eficaz é vital para evitar a contaminação, assegurando que apenas os organismos desejados estejam presentes nas amostras. O resultado do preparo destes meios pode influenciar a uniformidade do crescimento bacteriano ou fúngico nas placas, afetando a interpretação dos resultados experimentais. A consistência na distribuição do meio nutritivo e a técnica de espalhamento são determinantes para criar condições homogêneas que favoreçam a análise precisa das colônias formadas (Salvatori *et al.*, 2013). Amostras obtidas na produção avícola passam

por etapas de enriquecimento e isolamento, seguidas por uma série de testes bioquímicos para identificação bacteriana. A análise microbiológica inclui o uso de culturas seletivas e não seletivas, em placas de Petri e/ou em tubos com tampa (Brasil, 2011). Em resumo, o preparo de meios nutritivos é fundamental para o sucesso de experimentos microbiológicos, influenciando a qualidade e confiabilidade dos dados obtidos. A atenção aos detalhes e a conformidade com procedimentos padrão são aspectos determinantes para alcançar resultados robustos e significativos em pesquisas científicas.

3.2. Identificação Bioquímica *Salmonella* spp.

3.2.1. Importância na Pesquisa

A identificação bioquímica de *Salmonella* spp. é importante pois é um patógeno de extrema relevância para a produção avícola e saúde pública, causando diversos surtos em humanos pelo mundo, além de prejuízos econômicos aos produtores (Zanatta, *et al.*, 2023). Através da análise bioquímica de triagem presuntiva, é possível identificar propriedades específicas de *Salmonella*, como produção de H₂S e fermentar lactose, porém nem todas as variedades de *Salmonella* produzem H₂S (Lin, *et al.*, 2014). Devido a este e outros fatos, o laboratório envia suas amostras para o Instituto Adolfo Lutz, para confirmação de quais espécies de *Salmonella* spp. estão presentes nas amostras.

A identificação dos patógenos, são importantes para a implementação de medidas de controle e prevenções eficazes, tanto na produção de alimentos quanto na saúde pública e pesquisa, garantindo segurança alimentar, proteção da saúde da população, e acurácia em métodos científicos (Ministério da Saúde, 2024). Além disso, a identificação bioquímica de *Salmonella* spp. contribui para a vigilância epidemiológica, confirmando a detecção, o monitoramento de surtos e auxiliando na adoção de estratégias adequadas na defesa da saúde pública (Brasil, 2011).

3.2.2. Material e Métodos

Foram preparados em tubos com tampa os ágaros TSI (Triple Sugar Iron) e ágar LIA (Lisina-ferro), que são compostos bioquímicos utilizados para facilitar o isolamento seletivo, distinguir e caracterizar bactérias entéricas, como a *Salmonella*, com base em sua habilidade de descarboxilar lisina, fermentar glicose e produzir gás H₂S.

3.2.2.1. Teste Ágar TSI

O meio de cultura de ágar TSI contém três tipos de açúcares (glicose, lactose e sacarose) e sais de ferro, que atuam como marcadores para identificar a ocorrência de fermentação e a produção de gás. As espécies de *Salmonella* geralmente geram ácido e gás H₂S e fermentam glicose, mas não lactose ou sacarose. Isso resulta em um padrão distintivo de reação no gel de ágar TSI (Brasil, 2010).

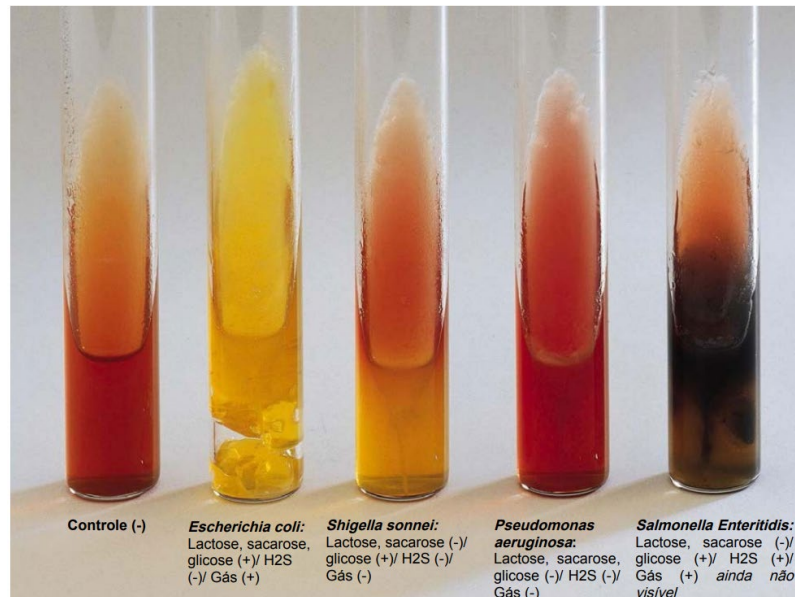
Com a preparação do tubo com tampa anteriormente executado, o teste TSI foi realizado com estilete com colônias da placa de ágar LB com *Salmonella* Minnesota (SM). A contaminação controlada do ágar TSI, executou-se com estilete previamente esterilizado em bico de Bunsen, de forma que foi inserido no centro do gel até próximo ao término do tubo e, ao retirar, realizou-se o estriamento da superfície que se encontra na lateral do tubo e tampado de forma que o gás possa sair, após o término permaneceu em estufa por 24 horas a 37°C.

Figura 1: Imagem Ilustrativa de inoculação de ágar em tubo com estilete.



Retirada de: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2012/09/tecnicas-de-semeadura.html>

Figura 2: Cultivo em ágar TSI de diferentes bactérias.

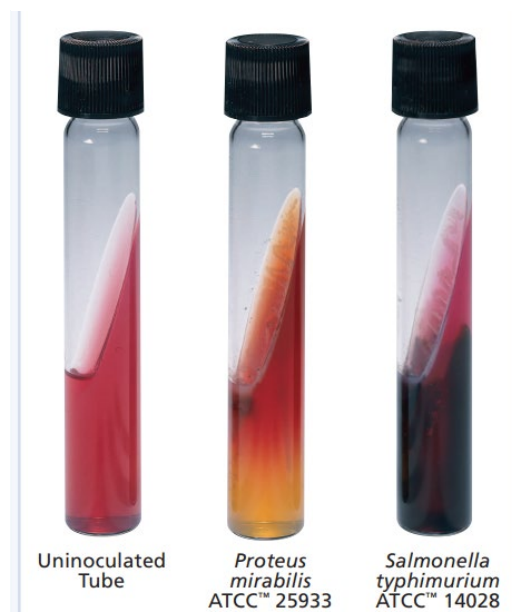


Fonte: Biokar Diagnostics, Identificação de Enterobactéria. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2024/09/172412BK.pdf>

3.2.2.2. Teste LIA

O meio de cultura LIA (Ágar lisina-ferro) é empregado para distinguir presença de *Salmonella* com base em sua capacidade de descarboxilar lisina, fermentar glicose e produzir H₂S. O meio contém lisina, glicose e um indicador de pH para detectar a descarboxilação da lisina. A produção de sulfeto de hidrogênio é indicada por uma precipitação preta no fundo do tubo (Brasil, 2011). A inoculação foi realizada utilizando um estilete de platina previamente esterilizado em um bico de Bunsen, foram retiradas uma colônia de SM de placas com ágar LB e repassadas para o tubo com meio LIA, realizando inserção no fundo do meio e estriamento na superfície. O tubo foi incubado em estufa por 24 horas a 37°C para permitir a multiplicação bacteriana.

Figura 3: Cultivo em ágar LIA com diferentes bactérias



Fonte: Interlab. Disponível em: <https://www.interlabdist.com.br/produto/lysine-iron-agar-lia-agar-lisina-ferro-2/informativo-tecnico/>

3.2.3. Resultado

Após o tempo determinado no teste de ágar TSI, foi observado a mudança de coloração devido à produção de H₂S, devido à redução do tiosulfato, que reage aos íons férricos, formando colônias de coloração preta, o ágar também fica preto (Duarte, *et al.*, 2016). No fundo do tubo foi observada a alteração da cor amarela para dourado pela baixa produção de H₂S na área, devido ao reduzido número de bactérias em virtude do método de plaqueamento. Essas características demonstraram que a *Salmonella* está presente no meio. Posteriormente, no teste de ágar LIA, observou-se o escurecimento do fundo do tubo devido à produção de H₂S e a manutenção da coloração púrpura na inclinação, indicando a descarboxilação da lisina. Esses resultados são típicos de espécies de *Salmonella* e confirmam a presença da bactéria. Os testes de ágar TSI e LIA demonstraram características sugestivas da presença de *Salmonella* no inoculo utilizado (Holanda, Arimateia, Motta Neto, 2017).

3.3. Concentração Mínima Inibitória (CMI)

3.3.1. Importância para Pesquisa

Concentração mínima inibitória determina a concentração mínima em que um agente químico tem capacidade de inibir multiplicação bacteriana, por meio de soluções com concentrações seriadas e decrescentes do agente químico, com intuito de encontrar qual concentração não ocorre multiplicação microbiana (EMBRAPA, 2009; Kadeřábková, Mahmood, Mavridou, 2024). Essa técnica é de grande importância para desenvolvimento de novos produtos bactericidas ou bacteriostáticos, auxiliando a determinar protocolos de utilização, bem como a concentração e diluição do produto para ser o mais eficiente possível (Andrews, 2001).

3.3.2. Materiais e Métodos

Para a realização da CMI, foi preparada uma placa de ágar LB para cada estirpe de *Salmonella* spp. que foi testada. As bactérias foram transferidas das placas contendo *Salmonella* spp. de interesse, para as novas placas e foram incubadas por 24h. O preparo da solução estoque do antibiótico foi realizado próximo do início da técnica, em uma concentração de 5120 µg/mL de ampicilina em balão volumétrico com Água Milli-Q, foi armazenada no freezer a -20°C. Em um falcon foi realizada uma diluição 1:10 da solução estoque, sendo 1ml de solução estoque e 9ml de caldo MH, tornando a solução com concentração de 512µg/ml de ampicilina. Utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018).

O inóculo foi preparado transferindo por volta de duas colônias isoladas em 3ml de solução salina 0,85%, e ajustadas para 0,5 na escala McFarland, que corresponde a 1×10^8 UFC/mL, utilizando um espectrofotômetro com solução salina como branco e, calculando a diferença da absorbância da solução com *Salmonella* spp., com o resultado entre 0,08 e 0,13 nm respeitando a escala McFarland. Em um Falcon para cada estirpe, foi adicionado 9ml de solução salina 0,85% e 1ml da suspensão bacteriana já ajustada, assim ficando em concentração 1:10. Em uma microplaca de 96 poços foi marcada nas fileiras com os códigos das estirpes e nas colunas as concentrações que ficaram após

a diluição seriada; em todos os poços, exceto o poço de número dois, foi adicionado 100 µL de caldo MH, o primeiro poço fica sem antibiótico representando o controle positivo e, no segundo é colocada uma alíquota de 200 µL da solução com 512 µg/ml de ampicilina. Do segundo poço foi retirado 100 µL é repassado para o seguinte poço sucessivamente. Com isso temos uma placa com diluição decrescente do antibiótico, e em cada linha da placa é adicionado 10 µL da suspensão bacteriana, exceto no último poço de cada fileira representando o controle negativo. Foi utilizado uma ATCC 25922 como referência, devido ao fato de ser conhecido as concentrações de antibióticos que afetam a multiplicação dessa bactéria, confirmando a acurácia do procedimento (CLSI, 2020, adaptado).

Após todo esse processo, a placa foi incubada em estufa a 37°C por 16 a 20h, e ao término desse período a placa foi levada para a bancada em ambiente bem iluminado, para identificar visualmente quais poços ocorreu multiplicação bacteriana nas diferentes concentrações de antibiótico.

3.4. Transdução de genes

3.4.1. Importância para Pesquisa

A contagem de bacteriófagos tem como objetivo quantificar de forma indireta a multiplicação de bacteriófagos; possuem capacidade de introduzir seu material genético no genoma bactérias e recrutar a maquinaria celular para gerar novas cópias (Vaz, Rech, Coldebella, 2022). São utilizados na pesquisa para realizar modificações genéticas em bactérias através do mecanismo de transdução de genes (Moreira *et al.*, 2013). Genes podem ser adicionados ou inativados numa bactéria de interesse, possibilitando compreender quais mudanças ocorrem em relação a sua produção de proteínas, fosfolípídeos, receptores, e as demais substâncias envolvidas no funcionamento do metabolismo bacteriano (Arroyo-Olarte, Rodrigues, Moreles-Rio, 2021).

3.4.2. Materiais e Métodos

Previamente foi realizado a preparação de placas de Petri com caldo LB, marcou-se três regiões para a delimitação em cada placa, elas foram secas em estufa por 1h30min. Os inóculos de três estirpes de SM foram pipetados uma alíquota de 1ml de uma diluição de 1:10 em placa separadas, homogeneizando em toda extensão do gel e deixado em estufa por 24h, formando uma película de bactérias na superfície do meio.

Para multiplicar o bacteriófago, foi preparado caldo LB em três falcons com 10 mL, e foi adicionado SM556, SM573 e SM574 em seu respectivo falcon; permaneceu por quatro horas no agitador em estufa a 37°C para a multiplicação bacteriana, após esse tempo foi adicionado o bacteriófago, e o tubo retornou para o agitador de tubos em estufa a 37°C e permaneceu por 24 horas. O bacteriófago é um invasor intracelular que utiliza a maquinaria celular para multiplicar seu material genético e quando esse processo termina provoca lise da parede celular da bactéria, assim seu material genético é liberado para o meio de cultura (Sampaio, 2022). O meio foi purificado por filtragem, para retirar bactérias que não foram lisadas e os restos celulares proveniente da lise, restando somente o bacteriófago.

O meio de caldo LB com o bacteriófago foi diluído em um tubo com concentração 1:10 com PBS, desse tubo retirou-se uma alíquota de 100 µL colocado em outro tubo de ensaio com 900 µL de PBS, desse foi retirado 100 µL e repassado para outro tubo com 900µL de PBS, e assim sucessivamente até totalizar nove tubos. De cada tubo foi retirado uma alíquota de 1 mL e foram colocados nas placas de ágar LB; cada um em sua respectiva região que foi demarcada anteriormente, ao término do método permaneceu em estufa a 37°C por 24 horas (Adaptado de Lederberg; Zinder, 1951).

3.4.3. Resultados

Após as 24 horas em estufa, os bacteriófagos lisaram as bactérias presentes na superfície do meio, gerando áreas sem a presença da bactéria. Realizou-se contagem dessas áreas e sabendo em qual diluição ocorreu lise, estimou-se que a concentração de bacteriófago foi de 7×10^9 unidades.

3.5. Contagem Bacteriana

3.5.1. Importância para Pesquisa

Em diversos experimentos é necessário a informação de qual o potencial de multiplicação de determinada bactéria, utilizando meios com nutrientes seletivos ou não seletivos, com ou sem a presença de antibiótico. A utilização de antibiótico nas placas de meio de cultura, tem como função de isolar uma bactéria de interesse em que já se conheça sua resistência a determinado antibiótico. Isso favorece a multiplicação do patógeno de interesse, e inibe os demais que competem com os nutrientes presentes no meio de cultura.

Na pesquisa voltada para medicina veterinária, a análise minuciosa da microbiota desempenha um papel crucial para a compreensão sobre patógenos e bactérias que auxiliam na manutenção de um organismo sadio. Isso envolve investigações sobre a diversidade de bactérias no trato intestinal de animais, os impactos de tratamentos específicos ou variações dietéticas na composição bacteriana, e a detecção de agentes patogênicos em amostras clínicas. Essa abordagem aprofundada amplia a compreensão da relação entre a microbiota e a saúde dos animais, facilitando a criação de estratégias terapêuticas mais precisas. Adicionalmente, na pesquisa veterinária, a contagem bacteriana é frequentemente utilizada para avaliar a multiplicação do patógeno em inóculos e na observação de sua multiplicação dentro dos órgãos em cada fase do desenvolvimento de uma doença nos animais, contribuindo para avanços notáveis no cuidado e bem-estar dos animais (Salvatori et al., 2013).

3.5.2. Materiais e Métodos

Em experimento com infecção em aves comerciais de postura com SM, foi realizado a contagem do inóculo de três cepas distintas para confirmação da quantidade de bactérias presentes, suas concentrações foram: SM556 = $8,1 \times 10^8$ UFC/mL; SM573 = $7,9 \times 10^8$ UFC/mL, SM574 = 1×10^9 UFC/mL. As amostras de fezes das aves, foram enriquecidas em caldo selenito 2x. Realizou-se diluição seriada em tubos de ensaio totalizando seis tubos, inicia-se com a transferência de uma alíquota de 100µL do inóculo para o primeiro tubo com 900µL de PBS. Após a homogeneização se transferiu uma alíquota de 100µL para o tubo

seguinte, repetindo esse processo até atingir o número desejado de tubos, neste caso, seis. Com duas placas de VB previamente marcadas com três divisões em cada placa, totalizando seis regiões, foi adicionado 100µL de cada tubo em sua respectiva região, dividindo esse volume em diversas gotas na superfície do gel. Esse processo foi repetido para cada cepa, as placas foram levadas para estufa a 37°C por 24 horas.

3.5.3. Resultados

Após o término da incubação das placas, ocorreu multiplicação bacteriana em todas as regiões demarcadas. Nas diluições mais concentradas (1, 2 e 3) houve multiplicação, mas devido à alta concentração de bactérias não é possível realizar a contagem, formando manchas sem forma de coloração roseada, já nas diluições menos concentradas (4, 5 e 6) também ocorreu multiplicação, na sexta diluição as colônias estavam isoladas, permitindo a contagem.

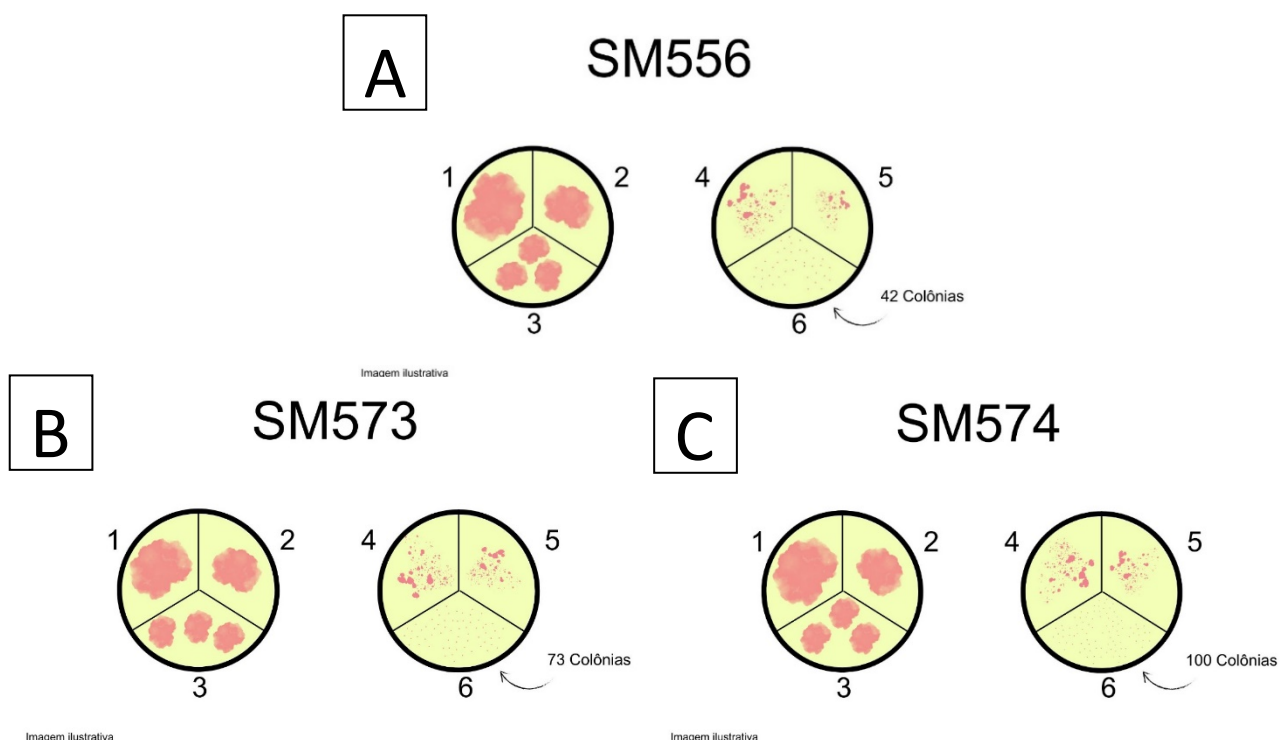


Figura 4: Imagem ilustrativa para entendimento das concentrações e contagem das colônias isoladas na sexta diluição (Autoria própria)

Realizou-se a contagem das colônias isoladas para estimar a quantidade de bactérias em Unidades Formadora de Colônia (UFC/mL) (EMBRAPA, 2021). Na contagem, se considera uma casa decimal para cada concentração, uma para notação científica e outra para a diluição, totalizando oito casas decimais. O resultado das contagens dos inóculos foram: SM573 = 73 colônias, SM556 = 42 colônias e SM574 = 100 colônias. Portanto se estima: SM573 = $7,3 \times 10^8$ UFC/mL, SM556 = $4,2 \times 10^8$ UFC/mL, e SM574 = $1,0 \times 10^9$ UFC/mL.

3.6. Necrópsia em Aves Comerciais

3.6.1. Importância para Pesquisa

A necrópsia é uma ferramenta muito importante na pesquisa, possibilitando o acompanhamento do desenvolvimento de uma patogenia ao longo do tempo, através de mudanças de cor e textura nos tecidos, presença de hemorragia ou líquidos nos órgãos dos animais necropsiados. Na realização da necrópsia é importante um protocolo minucioso para a identificação de patologias e alterações anatômicas nos animais. Comparando animais saudáveis (Grupo Controle), com animais infectados (Grupo Desafiado), pode-se reconhecer mudanças características de uma determinada doença, a fim de coletar amostras para análises posteriores e informações de dados epidemiológicos (Andrade, Pinto, Oliveira, 2002).

3.6.2. Matérias e Métodos

Em experimento de 28 dias com infecção de aves comerciais de postura com SM, foi realizado necropsia nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 pós infecção. No experimento havia quatro grupos de aves, três deles residiam no infectório, desafiados com três diferentes cepas de SM, enquanto o grupo controle residia numa sala separada. Os integrantes do laboratório se dividiram na realização do manejo, para evitar a contaminação entre os grupos infectados, e o grupo controle.

As necropsias ocorriam com a presença da médica veterinária responsável, de acordo com a Resolução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2012 (Brasil, 2012), além de três pessoas do laboratório intercaladas no decorrer dos

dias. Os integrantes se paramentavam utilizando, tocas, máscaras, propés, luvas de látex e aventais, todos descartáveis. Os instrumentos utilizados, como pinças anatômicas, pinças dente de rato e tesouras com pontas são armazenadas em caixa de inox com pastilhas de formol, as amostras coletadas nas necrópsias foram inseridas em tubos eppendorf e criotubos estéreis, anteriormente pesados e identificados.

A sala dispunha de uma mesa retangular de aço inox com suporte e balde coletor, dois recipientes de aço inox colocados sobre a mesa de forma que crie uma angulação diagonal para a queda de líquidos, uma mesa com materiais previamente separados para a realização da necrópsia. Além disso, a sala era composta por uma pia para higienização dos instrumentos cirúrgicos, que eram colocados em recipiente com desinfetante logo após os procedimentos.

Nos dias reservados para necropsia, cinco aves de cada grupo infectado e três do grupo controle, foram retiradas das suas respectivas salas e, levadas para a sala de necropsia. A eutanásia das aves foi realizada com o método de deslocamento cervical como indica a Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA e, da instituição FCAV-UNESP que aprovou as técnicas descritas pelo responsável do experimento. O objetivo das necrópsias eram de avaliar alterações nos órgãos e coletar conteúdo cecal e amostras do intestino, ceco, tonsila, Bursa cloacal, fígado e baço para análises histológicas das lesões nas aves desafiadas com SM.

A antissepsia das aves antes da necrópsia foi realizada utilizando álcool 70% utilizando pipeta plástica para diminuir contaminantes e evitando que as penas não se desprendam, as aves são posicionadas em decúbito dorsal. Em seguida, realizou-se a incisão da pele na região ventral da cavidade celomática, dissecando-a em direção cranial ao peito, foi feita a abertura da cavidade celomática com incisão do músculo oblíquo externo do abdômen deslocando o peito para melhor visualização da cavidade. Ao localizar os órgãos de interesse foram trocadas as luvas e tesouras realizando a coleta estéril para qPCR e análises microbiológicas.

Nos dias 1, 2 e 3 se retirou amostras de baço e tonsilas cecais, colocadas em tubo com tampa com RNAlater, com intuito de paralisar a degradação de

DNA e RNA através da inibição da enzima RNase. Em todos os dias de necropsia foram coletadas amostras de fígado, baço e conteúdo cecal, colocados em tubos Eppendorf mantidos em suporte com bolsa de gelo, evitando o aumento da temperatura da amostra para análises microbiológicas.

3.6.3. Resultados

Após o processo anteriormente descrito, as amostras de baço e tonsilas cecais foram processadas e foram realizadas as análises em qPCR, posteriormente.

3.7. Manejo e Descarte de Materiais Contaminados e Contaminantes

3.7.1. Importância para Pesquisa

O manejo de materiais contaminados é de extrema relevância para a segurança no trabalho em laboratório, tanto para evitar a disseminação de doenças, quanto para proteger a saúde pública e o meio ambiente. Esse processo envolve lidar de maneira segura com resíduos biológicos, como sangue, fezes, urina, carcaça de animais, placas de meio de cultura, ponteiros de micropipeta e suabes contaminado, além do descarte adequados dos resíduos químicos evitando a contaminação do meio ambiente. Há uma grande preocupação com alguns materiais biológicos que necessitam de tratamento antes de serem descartados, evitando a disseminação de microrganismos mutantes que não existem naturalmente no meio ambiente. O cumprimento dos protocolos das regulamentações ambientais e protocolos de biossegurança de acordo com a ANVISA, Resolução RDC Nº 306, de 7 de dezembro de 2004 e Resolução CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005, são fundamentais para garantir práticas seguras e responsáveis nos trabalhos laboratoriais e em medicina veterinária.

3.7.2. Materiais e Métodos

O manejo dos materiais contaminados ocorria com a utilização de jaleco, luvas de látex, calçados fechados e calça longa, para segurança dos indivíduos do laboratório seguindo a Norma Regulamentadora NR-6 da Portaria 3.214/78. Todos os materiais descartáveis e dejetos produzidos pelas aves contaminadas com *Salmonella* spp., passavam por tratamento por temperatura.

Materiais contaminados do laboratório como: ponteiras de pipeta, placas de Petri e tubos Falcon com meio, alças de coleta descartáveis, entre outros, eram armazenados em lixeiras brancas devidamente identificadas em sacos para autoclave, e conforme a necessidade, eram levadas para uma sala onde havia uma autoclave exclusivamente para essa finalidade. Os materiais perfurocortantes eram descartados no coletor próprio (Descarpack) devidamente identificados. Já as carcaças das aves decorrentes da mortalidade nos experimentos e das necropsias, conforme a Resolução CONAMA 358, de 2005, que são submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos devem passar por tratamento adequado para inativação, antes do descarte.

O processo de autoclavagem ocorria utilizando sacos resistentes a temperatura. A autoclave era abastecida de água, ligada para aquecimento prévio e, durante esse processo os materiais eram acomodados no cesto da autoclave. Os materiais e as aves utilizada nos experimentos eram autoclavadas a 121°C por 30 minutos, ao finalizar esse processo, se descartava em local adequado.

Ao término do tratamento, os materiais contaminados eram descartados em lixeiras específicas do Departamento de Patologia da instituição e, eram retiradas por serviço de coleta especializado. Já as carcaças foram mantidas na câmara fria do departamento, e coletadas posteriormente pelo serviço de coleta da instituição sendo descartados em local adequado.

3.7.3. Resultados

O resultado do manejo e descarte adequado de materiais e dejetos contaminados e contaminantes, são: a manutenção da biossegurança no trabalho, redução do impacto ambiental, prevenção em saúde pública, evita a introdução de patógenos modificados no ambiente, minimiza a poluição do solo, água e ar, bem como a prevenção de contaminação de alimentos.

4. DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades realizadas no estágio curricular em pesquisa, destaca diversos conceitos e técnicas fundamentais na pesquisa microbiológica e para a formação de um profissional em medicina veterinária. Os conceitos adquiridos permitem uma compreensão mais ampla da importância dos métodos de identificação e a confirmação da presença de agentes patogênicos em amostras laboratoriais e a campo, como *Salmonella* spp., além de outros possíveis causadores de doenças zoonóticas.

Durante o estágio, adquiri conhecimentos que são fundamentais para o avanço científico e na gestão da saúde pública, englobando diagnóstico de doenças infecciosas e zoonoses, desenvolvimento de vacinas, investigação da resistência antimicrobiana, compreensão da microbiota animal, pesquisas genômicas de bactérias e identificação patológica em aves comerciais. Essas experiências enriqueceram minha formação acadêmico-científica como médico veterinário.

5. CONCLUSÃO

A experiência de estágio proporcionou um complemento valioso à minha formação acadêmica e científica. Este período de aprendizado envolveu a assimilação de novas técnicas e procedimentos laboratoriais, resultando no aprimoramento das minhas competências profissionais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE A.; PINTO S. C.; OLIVEIRA R. S.; **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002.

ANDREWS J.M.; *Determination of minimum inhibitory concentrations*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, UK, v. 48, 2001.

Arroyo-Olarte, R.D.; Bravo Rodríguez, R.; Morales-Ríos, E. *Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond*. **Microorganisms**, v.9, p844 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040844>

Brasil (2010). **Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Manuais de Microbiologia Clínica, Módulo 5 Tecnologias em Serviços de Saúde: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**, p. 67-68 Disponível em:<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/manuais/manuais-de-microbiologia-clinica>> acesso: 18 nov 2023.

Brasil, Ministério da Saúde, Salmonella (Salmonelose). Disponível no site: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella>.

Acessado em: 03/12/2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 49**. Rio de Janeiro, RJ: EMBRAPA, dezembro 2009. Assunto: Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.

BRASIL. Ministério Da Ciência, **Tecnologia E Inovação Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal**. Diretriz Da Prática De Eutanásia Do CONCEA. Brasília, DF: CONCEA, 2015.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal. **RESOLUÇÃO NORMATIVA N 6, DE 10 DE JULHO DE 2012**. Brasília, DF: CONCEA, (DOU de 11/07/2012, Seção I, Pág. 13). Assunto: Eutanásia em Animais.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução CONAMA nº 358**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 29 de abril de 2005. Assunto: CONAMA.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC Nº 306**, Brasília, DF: Ministério da Saúde, 7 de dezembro de 2004. Assunto: ANVISA.

BRASIL. Ministério do trabalho. **PORTARIA Nº 3.214**. Brasília, DF: Ministério do trabalho, 08 junho 1978. Assunto: CEDI.

BRITO M. A.; BRITO J. R.; ARCURI E. F.; LANCE C. C.; SILVA M. R.; SOUZA G. N.; **Contagem de Bactérias**. Brasília: EMBRAPA, 2021. Disponível:https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/testes-de-qualidade/contagem-de-bacterias Acesso em: 26 nov 2023.

Comissão de resíduos e Departamento de gestão ambiental. Instituto Butantan. **Guia Prático de Descarte de Resíduos**. São Paulo, ed.1, p.18, 2014.

Duarte, S. C.; Kuchiishi, S. S.; Almeida, F. S.; Osowshi, G. V. Guia ilustrado para isolamento de *Salmonella* spp. De origem avícola. **Embrapa Suínos e Aves**, p.40, 2016.

ESTADO DE SÃO PAULO. Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo. **LEI Nº 12.300, DE 16 DE MARÇO DE 2006**. São Paulo, 16 de março de 2006. Assunto: Política Estadual De Resíduos Sólidos.

Freshney, R. I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. **John Wiley**, ed.6, p. 335-364. (2010).

Holanda, C. M. C.; Arimateia, D. S.; Motta Neto, R. **Manual de Bacteriologia e de Enteroparasitos**, Natal: EDUFRN, 2017.

Kadeřábková, N., Mahmood, A.J.S. & Mavridou, D.A.I. *Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays*. **npj Antimicrob Resist**, v.2, p37 (2024). <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00051-6>

Leberberg J.; Lederberg, G E. M.; Zinder, N. D.; Lively, E. R.; *Recombination analysis of bacterial heredity*. **Department of Genetics, University of Wisconsin**, Madison, Wisconsin. v 16, p. 413-443, 1951. DOI: 10.1101/sqb.1951.016.01.030

Lin, D.; Yan, M.; Lin, S., Chen, S. *Increasing prevalence of hydrogen sulfide negative Salmonella in retail meats. Food Microbiology*, v. 23, p. 1-4, 2014.

Moreira, N. M.; Sola, M. C.; Feistel, J.C.; Oliveira, J.J.; Freitas, F. A., Os Mecanismos De Resistência Bacteriana Da *Salmonella* Sp. Frente à Utilização De Antibióticos. **Centro Científico Conhece**. Goiânia v.9, n.16, p.4, 2013.

Salvatori, R. U.; Wolf, G. A. K.; Dresch, F.; Strohschoen, A. A. G., **Laboratório De Microbiologia: normas gerais, instruções de trabalho e Procedimentos Operacionais Padrões**, Lajeado RS: UNIVATES, 2013.

Sampaio. **Isolamento de bacteriófagos para o controle de *Salmonella* Spp. em cama de aviário**. UTFPR 2022. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/34993>

Sejas, L. M.; Silbert, S.; Reis, A.O.; Sade, H.S.; Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, (2006) Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/S1676-24442003000100006>> Acesso: 20 nov 2023.

Souza, J. R. T.; Ibelli, A. M. G.; Regitano, L. C. A.; **Análise de Métodos Para A Conservação de RNA**. EMBRAPA, São Carlos, Resumos do 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007.

Vaz, C. S. L.; Rech, D. V.; Coldebella, A. Bacteriófagos: estudo da ação lítica sobre *Salmonella* Minnesota isoladas de cama de frango. **Avicultura**. Edição 1316. (2022)

Weinstein M.P.; Lewis J.S.; Bobenchik A.P.; Campeau S.; Cullen S.K.; Galas M.F.; Gold H.G; Humphries R.M.; Kirn T.J.; Limbago B.; Mathers A.G; Mazzulli T.; Satlin M.; Schuetz A.N.; Simner P.J.; Tamma P.D., M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, ed. 30 (2020).

Weinstein M.P.; Limbago B.; Patel J.B.; Mathers A.J.; Burnham C.; Mazzulli T.; Campeau S.; Munro S.D.; Conville P.S.; Danies M.O.S.; Doern C.; Patel R.; Eliopoulos G.M.; Richter S.S.; Galas M.F.; Satlin M.; Humphries R.M.; Swenson J.M.; Jenkins S.G.; Wong A., Kircher S.M.; Wang W.F.; Lewis li J.S.; Zimmer B.L.; M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, ed.11 . (2018).

Zanatta, G.F.; Cardoso, A. L. S. P.; Tessari, E. N. C.; Luciano, R. L.; Kanashiro, A. M. I. *Salmonella* em produtos avícolas de abatedouros. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.20 n.45; p. 231 2023

II. ASSUNTO DE INTERESSE

Interações entre *Salmonella Gallinarum* e Macrófago com ênfase na adesão, invasão, sobrevivência e multiplicação dentro do Macrófago.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo produtor e o líder em exportação mundial de frango de corte, caracterizado por uma forte avicultura comercial, que inclui a produção de ovos e de outras aves como perus. Composta, no entanto, com aproximadamente 57 milhões de matrizes de corte alojadas, 114 milhões de aves poedeiras e 14,5 milhões de toneladas de frango de corte (ABPA, 2023).

Para a manutenção dessa cadeia produtiva deve-se manter o rigor sobre a biossegurança, evitando a entrada de patógenos no plantel por meio de manejo adequado de ração e água, trânsito de veículo e pessoas, barreiras físicas, desinfecção e utilização de vazão sanitário; seguindo a Instrução Normativa N°56, de 4 de dezembro de 2007 do Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento (Brasil, 2007).

Salmonella spp. podem acometer tanto a saúde humana quanto avícola como no caso de salmonelas paratíficas (Brasil, 2010), ou afetar exclusivamente as aves levando ao desenvolvimento de enfermidades como o tifo aviário, que resulta em grandes perdas econômicas devido à alta taxa de mortalidade (Oliveira, Berchieri Junior, Fernandes, 2005; Freitas Neto *et al.*, 2007; Andreatti Filho, *et al.*, 2017).

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum, ou *Salmonella* Gallinarum (SG), agente etiológico do tifo aviário, afeta aves de diversas espécies e a mortalidade pode chegar a 80% a campo (Barrow & Freitas Neto, 2011). No Brasil a prevalência da doença é de 1,94% (Xiao Zhou *et al.*, 2022).

Salmonella Gallinarum possui a capacidade de escapar do sistema imune da ave, através de mecanismos que envolve a relação patógeno-hospedeiro, modificando o ambiente afim de adequar as condições para sua sobrevivência e multiplicação (Carneiro & Costa, 2020). Isso ocorre quando SG é fagocitada pelo

macrófago que direciona o vacúolo à bactéria e libera uma explosão oxidativa de espécies reativas de oxigênio para eliminá-la (Gordon, 2011). Entretanto, SG altera sua expressão gênica para produzir proteínas e efetores, que auxilia a manutenção do seu metabolismo e posteriormente o ambiente se torna propício para sua multiplicação (Steele-Mortimer, 2008). Dentro do macrófago, protegido do ambiente extracelular, o sistema imune não consegue identificar substâncias ligantes associadas ao patógeno; com a multiplicação bacteriana o macrófago tem o rompimento de sua parede celular e as novas SG geradas são liberadas, se espalhando por todo o corpo do hospedeiro, gerando uma doença sistêmica, e posteriormente levando ao óbito (Berchieri Junior & Freitas Neto, 2009).

Tendo em vista que essa relação patógeno-hospedeiro envolve diversos mecanismos e interações, o presente trabalho tem como intuito abordar os principais fatores envolvidos na imunopatogenia do tifo aviário, especialmente no que diz respeito a sobrevivência de SG no interior do macrófago.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento da doença na ave

Tifo aviário é uma doença sistêmica, que apresenta como principais sinais clínicos: queda repentina de ingestão de alimento e água, apatia, febre, penas eriçadas e diarreia amarelo-esverdeada; pode levar a ave a óbito, geralmente entre quatro e dez dias após a infecção (Pomeroy, 1978; Shivaprasad & Barrow, 2013), hepatomegalia, este com coloração verde amarelado, consistência friável e pontos necróticos multifocais; esplenomegalia e baço congesto; coração com infiltrado inflamatório com predominância de heterofilos, infiltrado inflamatório polimórfico nos rins; diminuição das contagens de hemácias e leucócitos (Freitas Neto *et al.* 2007). Aves pesadas e semipesadas são consideradas susceptíveis, enquanto as aves leves são resistentes a doença (Freitas Neto, Penha Filho, Berchieri Junior, 2020).

Ao invadir o organismo da ave, SG atravessa o trato gastrointestinal e penetra em células epiteliais e macrófagos com auxílio do T3SS, injetando proteínas efetoras para facilitar a internalização (Lopes, 2013). Ao invadir o macrófago modifica esta célula impedindo a degradação de SG, possibilitando

sua multiplicação, disseminando novas SG na carcaça da ave e nas fezes (Freitas Neto, Penha Filho, Berchieri Junior, 2020).

A transmissão de SG ocorre principalmente devido ao contato entre animal doente e sadio por meio de canibalismo, de maneira que a presença de aves mortas é um fator importante na transmissão da enfermidade, ademais, a presença de moscas, roedores, aves silvestres, veículos, fômites, podem favorecer a disseminação da bactéria (Berchieri Junior & Freitas Neto, 2009).

SG não possui flagelos, sua capacidade de colonização é considerada menor comparado com outros sorovares, porém consegue invadir eritrócitos, epitélio intestinal, tecido linfoide; localizadas nas tonsilas cecais e placas de Peyer (Barrow & Freitas Neto, 2011), sendo fagocitada principalmente por macrófago residente, além de leucócitos e eritrócitos (Chappell *et al.*, 2009).

2.2. Imunopatogenia

Ao considerar o momento da infecção até a morte da ave, há diversas barreiras físicas e imunológicas que SG ultrapassa para causar a doença sistemicamente. Ao adentrar na ave, possui a capacidade de sobreviver a acidez gástrica, progredindo no trato gastrointestinal. Posteriormente, invade as células do epitélio intestinal, mas pelo fato de não possuir flagelo, provoca pouca imunidade inata local. Devido ao não reconhecimento das moléculas presentes no flagelo, possibilita a invasão dos Tecidos Linfoides Associados ao Intestino (GALT), como placas de Peyer e tonsilas cecais, que possuem grande quantidade de linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas, Natural Killer (NK) e eritrócitos (Dougan *et al.*, 2011).

O macrófago tem grande relevância na disseminação de SG no organismo do hospedeiro, possibilitando seu desenvolvimento e multiplicação, pelo fato de ser uma célula circulante auxilia a fase sistêmica da doença, acumulando SG na carcaça da ave principalmente em baço e fígado (Shivaprasad, 2000).

2.2.1. Mecanismos de imunidade do macrófago

É uma célula originária da medula óssea, sendo monócitos seu precursor e estão presente em todos os tecidos como residentes e, na infecção, são recrutados monócitos que dão origem a macrófagos inflamatórios que fagocitam as células bacterianas, uma vez que possuem capacidade de identificar moléculas ligantes, que são encontradas na parede celular, como LPS, LTA (ácido lipoióico), além de outros componentes das células bacterianas CpG DNA, proteínas, e ácidos nucléicos (Dougan *et al.*, 2011).

Após o reconhecimento dessas moléculas, através de receptores reconhecedores de padrões moleculares (PRRs), em especial os Receptores Toll Like (TLR), o macrófago tem capacidade de apreender o patógeno por meio de movimentação citoplasmática (Plüddemann, Mukhopadhyay, Gordon, 2011). Ao capturar o patógeno, ativa mecanismos que direcionam o vacúolo e nele ocorre a acidificação do meio e a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), através da fusão do fagossomo e lisossoma, causando estresse oxidativo no patógeno e ocasionado degradação de membrana celular, organelas e ácidos nucleicos, levando a eliminação do patógeno (Silva Dantas, 2021).

Os chTLR (Chicken Toll Like Receptor) têm diversas variações e são atribuídas ao reconhecimento de diferentes PRRs, onde chTLR-4 reconhece LPS de bactérias gram-negativas, chTLR-5 flagelina, chTLR-15 proteases e chTLR-21 CpG DNA (Montassier, 2020). Uma das possibilidades de uma resposta imune local no intestino ser reduzida é o fato de SG não possuir flagelo, onde chTLR-5 não ativa a via de recrutamento pró-inflamatório. (Freitas Neto, Penha Filho, Berchieri Junior, 2020).

2.2.2. Vacúolo Contendo *Salmonella* (SCV)

Quando SG é capturada pelo macrófago e o vacúolo é direcionado para envolvê-la, ela aciona a tradução e transcrição de genes que se encontram nas Ilhas de Patogenicidade (SPIs) e genes complementares; que estão inseridos no seu genoma. Esses genes ao serem transcritos produzem proteínas e efetores bioquímicos que auxiliam no processo de modificação do meio e ocorre a

formando SVC, além da modificação do comportamento do macrófago, evitando a fusão do fagossomo com o lisossoma, assim, impedindo a liberação de espécies reativas de oxigênio no vacúolo, evitando a eliminação de SG (Steele-Mortimer, 2008).

2.3. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPIs)

São regiões do cromossomo caracterizadas por possuir genes que tem ligação direta com a patologia causada no hospedeiro. Já foram descritas mais de 26 SPIs, porém esses genes não estão presentes em todos os sorovares de *Salmonella*, pois na diferenciação dos sorovares ao longo do tempo ocorreu a perda desses genes, através de transposons e ação de bacteriófagos; assim havendo modificações genéticas acumulativas ao longo do tempo, gerando novos sorovares. (Moreira, et al., 2013). Várias SPIs estão relacionadas com diversas funções, como aderência, invasão, sobrevivência e multiplicação na célula hospedeira.

Em um estudo comparativo entre o genoma de SG selvagem e vacinal, a fim de compreender quais suas diferenças genéticas para entender os possíveis fatores que estão envolvidos na atenuação da estirpe vacinal; foi identificado a presença das seguintes ilhas na estirpe selvagem: SPI-1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 14 C_{ss4}, C_{63PI}, PPIP ssAD; e na vacinal foi observado a ausência da SPI-12 e C_{ss4} (Chacón, et al., 2023 A). Serão descritos, a seguir, aqueles que se relacionam com o assunto de interesse deste trabalho.

2.3.1. A ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 1 (SPI-1)

A Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 1 contém 40 Kilo Base (Kb), os genes presentes nessa região são responsáveis pela produção de diversas proteínas e efetores com diversas funções na adesão e sobrevivência de *Salmonella*. Grande parte das proteínas são de formação estrutural e de regulação da transcrição do Sistema de Secreção do Tipo Três (T3SS – Type Three Secretion System) (Gillis, 2019). Nesta ilha há presença dos genes *spiA* e *spiC*, são responsáveis pela secreção e produção da proteína SpiC, respectivamente, através T3SS, associado a efetores do gene *spiA*. Essa

proteína é liberada no citosol do macrófago pelas microseringas produzidas por genes presentes em T3SS da SPI-2. No citosol da célula hospedeira essa proteína interage com ligantes presentes no endossomo-lisossomo, inibindo o tráfego para o fagossomo e sua fusão, evitando o estresse oxidativo que ocorreria normalmente (Uchiya *et al.*, 1999).

Existem quatro proteínas de invasão de *Salmonella* (Sips), denominadas Sips A-D. Essas proteínas são exportadas e translocadas para a membrana plasmática ou citosol da célula hospedeira, desempenhando papéis cruciais e complexos na secreção e translocação de efetores do SPI-1. SipA, é uma proteína que se liga à actina, otimiza a entrada de *Salmonella* nas células hospedeiras ao influenciar diversos estágios na formação de dobras na membrana e no rearranjo do citoesqueleto (Zhou *et al.*, 1999). Além disso, regula a concentração, estabilidade e polimerização das moléculas de actina no local de entrada bacteriana, e intensifica a atividade de aglutinação das fimbrias das células alvo (Galan, Zhou, 2000; McGhie, Hayward, Koronakis, 2001, 2004), embora não seja essencial para a captura, SipA melhora a eficiência do processo de entrada (Zhou *et al.*, 1999).

Depois que a *Salmonella* é internalizada em células não fagocíticas e macrófagos, a proteína SipA se localiza na face citoplasmática do SCV. Nesta posição, SipA desempenha um papel fundamental na regulação da maturação do fagossomo e na replicação intracelular da bactéria. (Brown, Ryan, Creswell, 2007). A região N-terminal de SipA estimula o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (Lee, Chatterjee, Struhl, 2000), e desencadeia a ativação e liberação de Caspase-3, desempenhando várias funções na resposta (McIntosh *et al.*, 2017).

SipB, SipC e SipD são proteínas translocadoras que contribuem para a formação do complexo de agulha SPI-1 T3SS (Collazo, Zierler, Galàn, 1995; Collazo, Galàn, 1997; Myeni, Zhou, 2010; Myeni *et al.*, 2013). SipB é essencial para a apoptose dependente de Caspase-1 induzida por *Salmonella* e a liberação de IL-18 (Hersh *et al.*, 1999; Lou *et al.*, 2019). Além disso, SipC alveja F-actina e é necessário para a internalização do patógeno, promovendo a invasão de *Salmonella*.

No entanto, anticorpos contra SipD inibem a invasão de *Salmonella*, tornando-o um possível alvo para bloquear a virulência mediada por SPI-1. A região N-terminal de SipD estimula a secreção de efetores e atua nos níveis pós-transcricional e pós-traducional (Glasgow *et al.*, 2017).

As proteínas externas de *Salmonella* (Sops) são efetoras e provém de diversas SPIs, que são translocadas por T3SS, consistem em SopA, SopB, SopD, SopD2, SopE e SopE2. As Sops estão envolvidas no controle de diferentes estágios do influxo de leucócitos polimorfonucleares e na reorganização do citoesqueleto, contribuem para a invasão de *Salmonella* e são responsáveis por induzir inflamação e diarreia. SopA, SopB e SopE são reguladas cooperativamente por proteínas HilA e InvF proveniente de SPI-1 (Raffatellu *et al.*, 2005).

SopA pode induzir secreção de fluido e a resposta inflamatória em intestinos infectados por *Salmonella*, após ser translocadas para células hospedeiras. A estabilidade e translocação de SopA requerem a chaperona InvB (Ehrbar, *et al.*, 2003), chaperonas são proteínas que participam do processo de ativação de outras proteínas inativas (Cardeal, 2013; Haerl, Bracherd, Hayer-Hartl, 2011), mediando diversas interações como no transporte de SipA, SopE e SopE2, através do T3SS da SPI-1 (Ehrbar, *et al.*, 2003). O escape eficiente de bactérias do SCV para o citosol de células epiteliais requer a ubiquitinação de SopA mediada por HsRMA1 e contribui para a enteropatogenicidade induzida por *Salmonella*. HsRMA1 é uma ligase de ubiquitina E3 ligada à membrana, embora SopA seja uma ligase de ubiquitina E3 em si (Zhang *et al.*, 2005). SopA regula respostas imunes inatas mediando a ubiquitinação e degradação proteossômica de ligases E3 contendo motivo tripartido (TRIM) (TRIM56 e TRIM65) (Fiskin *et al.*, 2017).

SopB/SigD, uma fosfatase de inositol, é necessária para a secreção de fluido e cloreto e, recrutamento de neutrófilos. Ela media a virulência interceptando vias de sinalização de fosfato de inositol e induzindo ativação de proteína quinase B (PKB), SopB/SigD também possui atividade antiapoptótica e está relacionada à replicação intracelular devido à sustentação da ativação de PKB. SopB/SigD promove fissão de membrana e dano à função de barreira

epitelial durante a invasão (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2011; Knodler *et al.*, 2010).

SopD afeta múltiplas sinalizações e interações de proteínas que contribui para a virulência sistêmica de *Salmonella* está envolvida na fissão de membrana e na formação de macropinosomas durante a invasão de *Salmonella*, com cooperação de SopB, SopD e SopD2 promovem a replicação bacteriana em células hospedeiras e estão relacionadas ao SCV. SopD2 contribui para a formação de filamentos induzida por *Salmonella* e inibe o transporte vesicular e a formação de túbulos que se estendem para fora do SCV (Bakowski *et al.*, 2007; Galyov *et al.*, 1997; Galan & Zhou, 2000).

SopE é uma proteína que atua na invasão, realizando trocas de guanina por GTPase Rho da célula hospedeira (Vonaesch, *et al.*, 2014), induz rearranjos rápidos do citoesqueleto de actina, dobramento de membrana e consequente macropinocitose de patógenos e promove a invasão bacteriana (Hardt *et al.*, 1998).

As proteínas SptP, SopE e SopE2 perturbam a atividade das proteínas celulares pertencentes à família das pequenas GTPases do hospedeiro como Cdc42, Rac-1 e Rho (Ehrbar, *et al.*, 2002), SopE é rapidamente degradada por uma via mediada por proteassoma, enquanto SptP é degradado lentamente, o que inativa Cdc42 e Rac1 e, reverte assim as sinalizações de SopB, SopE e SopE2 (Miold *et al.*, 2001; Engelenburg, Palmer, 2008; Humphreys, *et al.*, 2012; Friebel *et al.*, 2001; Schlumberger & Hardt, 2006). SopE, SopE2 e SptP, desempenham um papel crucial na regulação da formação de filamentos de F-actina e na dinâmica do citoesqueleto (Hardt, *et al.*, 1998). Essas proteínas efetoras estão ligadas a distúrbios nas *tight junctions* (junções estreitas), SopB, SipA, SopE e SopE2 atuam como fatores de troca de GTP, ativando Cdc42 e induzindo a formação de filamentos de actina no local de translocação dessas proteínas efetoras. (Fortes, *et al.*, 2012).

A translocação das proteínas efetoras do SPI-1 dentro dos macrófagos pode acionar rapidamente um processo apoptótico. A proteína SipB, codificada pelo SPI-1, está envolvida no apoptose do macrófago ao ativar a caspase-1, que cliva a pró-IL-1B e pró-IL-18, precursores de citocinas pró-inflamatórias,

exercendo uma função semelhante à IpaB de *Shigella* spp. Isso também leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8 (Hersh *et al.*, 1999; Marcus *et al.*, 2000; Schmidt & Hensel, 2004). O mutante Δ SPI1 tem pouco efeito na virulência e não alteraram a sobrevivência intracelular em macrófagos. No entanto, a sinalização pró-inflamatória e a infiltração heterofila foram dependentes do SPI-1 (Pavlova, *et al.*, 2011).

2.3.2. A ilha de Patogenicidade de Salmonella 2 (SPI-2)

O sítio SPI-2 tem 40 kb de extensão e está inserido adjacente ao gene *vaI* tRNA. Uma porção de 25 kb é exclusiva para *S. enterica* e é indispensável para a patogenicidade sistêmica, com um teor de G+C de 43% (Hensel, *et al.*, 1997). Este segmento contém um segundo T3SS, ativado por micro-organismos intracelulares. Outra parte do SPI-2, com 15 kb de tamanho, foi identificada em *S. bongori* e *S. enterica*. Com um teor de G+C de 54%, essa fração não é crucial para a virulência sistêmica e abriga a tetrionato redutase (Ttr), associada à respiração anaeróbica (Hensel, *et al.*, 1999).

O T3SS do SPI-2 está presente em todas as variantes de *S. enterica* e (Hensel *et al.*, 1997; Groisman & Ochman, 1996). atua em células hospedeiras infectadas, transferindo proteínas efetoras através da membrana do SCV para o citoplasma da célula, isto ocorre em macrófagos e células epiteliais (Figueira & Holden, 2012).

As proteínas associadas ao SPI-2 incluem diversas efetoras de *Salmonella*, como SseB, SseC e SseD são secretadas por T3SS e, em mutantes sem a produção dessas proteínas, reduz a translocação de proteínas efetoras (Nikolaus *et al.*, 2001). SseC e SseD, participam da secreção de outras proteínas efetoras e na formação do complexo de secreção do SPI-2 (Klein & Jones, 2001; Nikolaus *et al.*, 2001). SseF interage juntamente com a SseG, para regular o posicionamento do SCV próximo ao complexo de Golgi e atua na organização da membrana do vacúolo que contém *Salmonella*, contribuindo para a sobrevivência intracelular da bactéria (Deiwick *et al.*, 2006; Kuhle & Hensel, 2002; Yu, Liu, Holden, 2016).

A proteína SifA é essencial para a formação de estruturas intracelulares conhecidas como "sifões", que permitem a replicação de *Salmonella* no interior das células hospedeiras (Ruiz-Albert *et al.*, 2002). Direciona o recrutamento de membranas enriquecidas com Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP1) (Jackson, *et al.*, 2008), necessário para a manutenção e crescimento do SCV e Sifs (*Salmonella-induced filaments*) (Yang *et al.*, 2000;), que são proteínas que formam filamentos ligados em *Salmonella* e atravessa o SCV, ficando em contato com o citoplasma do hospedeiro (Knuff & Finlay, 2017).

SseJ é uma metaloprotease que atua na manipulação da fagossomos para promover a sobrevivência de *Salmonella* no ambiente intracelular, regula a dinâmica da membrana SCV juntamente com sifA (Lossi *et al.* 2008; Ruiz-Albert *et al.*, 2002). SseI desempenha um papel na inibição da morte celular programada (apoptose) das células hospedeiras, contribuindo para a sobrevivência de *Salmonella*, interage com IQGAP1 resultando na inibição da migração de macrófagos e células dendríticas (Figueira, Holden, 2012).

Além disso, SseK1 e SseK2 ambas as proteínas estão envolvidas na modulação da resposta imune do hospedeiro, afetando a sinalização de citocinas e a expressão de genes do hospedeiro, efetores relacionados que inibem a sinalização de NF- κ B (Günster *et al.*, 2017 ; Kujat Choy *et al.*, 2004).

2.3.3. A Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 3 (SPI-3)

SPI-3 é uma região genômica essencial para a virulência da bactéria *Salmonella*, tem uma estrutura genética única, localizada no gene de tRNA *Se/C* e com cerca de 17 Kb de tamanho (Blanc-Potard, Groisman, 1997; Pontes *et al.*, 2016). Esta região apresenta uma heterogeneidade estrutural entre diferentes subespécies de *Salmonella*, ademais, contém fragmentos de elementos de inserção e uma composição de bases variada, o principal fator de virulência está associado ao de transporte de alta afinidade com magnésio (Operon *MgtCB*), fundamental para a adaptação da *Salmonella* em ambiente intracelular, sobrevivência intramacrófago e na virulência sistêmica da bactéria (Alves, 2022). Os genes *MgtB* e *MgtC* estão envolvidos nesse sistema, sendo que o primeiro atua como um transportador de magnésio, enquanto a função do segundo, em

SG, está associado a replicação dentro de macrófagos, além disso a replicação em meios acidificados com baixo teor de Mg^{2+} , como no interior de macrófagos e quando atenuado experimentalmente afeta sua sobrevivência, multiplicação e o nível de virulência (Alves, 2022; Moncrief, Maguire, 1998; Pullinger *et al.*, 2007; Rang *et al.*, 2007; Lee, Groisman, 2012; Choi *et al.*, 2017).

Outro possível componente de virulência dentro da SPI-3 é o gene *misL*, que codifica um sistema de secreção tipo V (T5SS) semelhante as proteínas encontradas em outras bactérias patogênicas, como *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* patogênica enteroinvasiva (EPEC). No entanto, o papel exato do gene *misL* e outros genes dentro da SPI-3 ainda não foi completamente elucidado (Dorsey *et al.*, 2005).

2.3.4. Ilhas auxiliares e pseudogenes.

SPI-4 é uma ilha de patogenicidade ligada a decodificação de um T1SS, e está ligado a adesão em células epiteliais do trato gastrointestinal, não tendo relação direta com interações com macrófagos (Fortes *et al.*, 2012).

A SPI-5 de tamanho de 7,6 kb, contendo informações de transcrição para formação de proteínas efetoras que são translocadas por T3SS. Estão presentes cinco genes: *PipD*, *SopB/SigD*, *SigE*, *PipB* e *PipA*. Onde *SopB/SigD* é uma fosfatase de Inositol, como detalhado na seção SPI-1, assim como os demais genes, que trabalham como cofatores e reguladores. Suas funções ainda não são completamente entendidas (Fortes *et al.*, 2012).

SPI-6 possui tamanho de 59 kb, em *Salmonella* as proteínas desse locus fazem parte estrutural do Sistema de Secreção do Tipo Seis (T6SS). Porém em estudo sobre a evolução de *Salmonella* spp. esse locus é descrito como pseudogene em SG, indicando que evolutivamente foi perdido o T6SS de SPI-6, mas mantido em SPI-19 (Fookes *et al.* 2011).

SPI-9 não possui estudos específicos em SG, alguns artigos sugerem uma relação com a formação do sistema de secreção do tipo um (T1SS) e, em estudo transcriptômico em *Salmonella* Typhi os genes de SPI-9 não foram ativados dentro de macrófago (Faucher *et al.*, 2006; Velasquez *et al.* 2016; Parkhill *et al.*, 2001; Ochoa & Rodríguez, 2005; Latasa *et al.*, 2005).

SPI-10 é uma ilha pouco estudada e mencionada em artigos como pseudogene em SG. Em outros sorovares está atrelado a especificidade ao hospedeiro (Fookes *et al.* 2011; Chacón *et al.*, 2023 B; Saroj *et al.*, 2008).

SPI-12, com tamanho aproximado de 15 kb, não foi estudada em SG especificamente, porém em estudos com *S. Typhimurium* demonstram sua importância na sobrevivência intramacrófago RAW264.7 (Hansen-Wester & Hensel, 2002; Tomljenovic-Berube, *et al.* 2013). SG possui genes homólogos, e um deles é o gene promotor *sspH2* (*Salmonella* secreted protein H2) que ativa genes oriundos evolutivamente de bacteriófago presentes nesta ilha, *SsrB* presente em SPI-2, regula positivamente a transcrição de *sspH2* de forma indireta (Miao *et al.* 1999). Esses genes são ativados dentro de macrófagos e suas proteínas são secretadas através do T3SS do SPI-1 e SPI-2 (Tomljenovic-Berube *et al.* 2013). Entretanto este e diversos genes dessa ilha não são funcionais em *S. Gallinarum*, assim sendo considerados pseudogenes (Fookes *et al.* 2011; Chacón, *et al.*, 2023 B).

SPI-16 e SPI-17, possuem pouca informação sobre sua funcionalidade em SG, diversos genes que foram estudados em outros sorovares de *Salmonella*, são ausentes em SG ou são considerados pseudogenes. Diversos desses genes estão presentes em SPI-2, outros na estrutura cromossômica principal e, já foram mencionados anteriormente neste trabalho, os genes como *SseL*, *SseJ*, *SifA* e *PipB2*, na SPI-17 e *SSeK1*, *SSeK2*, *SSeK3* na SPI-16, por terem relação íntima com SPI-2 (Rytkönen *et al.*, 2007; Chacón *et al.*, 2023 B; Fookes *et al.* 2011; Vernikos & Parkhill, 2006; Ibarra & Steele-Mortimer, 2009).

2.3.5. A ilha de patogenicidade de *Salmonella* 13 (SPI-13)

Esta ilha de patogenicidade possui um locus genômica de aproximadamente 19 kb, possuindo 18 genes funcionais e originalmente foi identificado em SG (Shah *et al.*, 2005; Elder *et al.* 2018). Estudos relacionam esta ilha com a aptidão nutricional, sendo necessária para aquisição de micronutrientes como carbono e nitrogênio, por meio da via de metabolização, respectivamente, do ácido D-Glucurônico (DGA) e Tiramina (TYR) (Elder *et al.*

2018). A inativação completa de genes em Δ SPI-13 mutantes reduziu a colonização intestinal e a virulência promovida por SG (Elder *et al.* 2018, 2016; Fei *et al.* 2023). Em análise de genes de *S. Typhimurium* (STM3117 a STM3134), genes homólogos a SG3011 a SG3028 de *S. Gallinarum*, levantam a possibilidade de desses genes desempenhar papel importante na patogênese em macrófagos, devido à forte ativação deles dentro dos macrófagos, mostrando um padrão semelhante a expressão de genes da SPI-2 (Eriksson *et al.* 2003; Thomson *et al.* 2008).

2.3.6. A ilha de patogenicidade de *Salmonella* 14 (SPI-14)

Esta região genômica tem tamanho de aproximadamente 9 kb, mais estudada em STM (genes STM14_1002 e STM14_1008), tendo genes homólogos em SG (genes SGA-8 e SGC-8) (Shah *et al.* 2005), são de extrema relevância para a virulência do patógeno, pelo fato da atenuação desta ilha diminuir o nível de virulência e da mortalidade em 100% (Hu *et al.*, 2024). Entretanto, a relação desta ilha entre macrófago e SG não é bem determinada, uma possível relação pode vir do fato do gene *loiA* (STM14_1008, homólogo SGC-8), ter ligação com a regulação da SPI-1, sendo reduzido a produção de *hilA* (regulador de cinco genes de SPI-1) na ausência do gene *loiA*, indicando a expressão positiva de *hilA* na presença do gene *loiA*, isto demonstra a importância desta ilha na formação do sistema de secreção do tipo três (T3SS) (Jiang *et al.* 2017; Fei *et al.* 2023; Hu *et al.* 2024).

2.3.7. A ilha de patogenicidade de *Salmonella* 19 (SPI-19)

A ilha de patogenicidade 19 foi identificada com tamanho de aproximadamente 43 kb, é responsável por decodificar o T6SS, os genes dessa ilha são responsáveis pela produção estrutural de T6SS e de alguns efetores secretados pelo sistema de secreção (Xian *et al.*, 2020). Uma dessas proteínas, que realiza as duas funções, é a proteína VgrG (Valine-glycine repeat protein G), ela está posicionada na ponta de T6SS funcionando como uma agulha para penetrar na célula alvo, permitindo a injeção de proteínas efetoras ou tóxicas. (Blondel *et al.*, 2013). Essa proteína foi encontrada em macrófagos pós-infecção

com SG, indicando que essa proteína é funcional e sua importância na sobrevivência intramacrófago (Blondel *et al.*, 2010). Ademais, em estudo com SG mutantes com deleção de SPI-19 (Δ SPI-19/T6SS), descobriram que esse mutante tem dificuldade de colonizar os órgãos como íleo, fígado, baço e intestino de maneira eficiente, uma das interpretações para a baixa colonização no intestino, pode ser devido SG ter preferência a invadir células linfóides do GALT e a falta do T6SS nesse mutante ocasiona a deficiência na colonização dessas células (Scholl, *et al.* 2019).

Estudos também indicam que T6SS também interfere na citotoxicidade célula hospedeira, e os efetores translocados modificam a resposta imune do macrófago, infectado por SG, no entanto, essas interações não foram completamente elucidadas (Feria & Valvano, 2020; Xian *et al.*, 2020; Blondel *et al.* 2010, 2013; Fookes *et al.* 2011).

2.4. Importância da Cobalamina

A cobalamina, nome genérico para vitamina B12, tem grande importância para bactérias que se encontram em situação de anaerobiose, pelo fato de ter a função de receber elétrons da cadeia respiratória na ausência do oxigênio. No caso de SG, a síntese de cobalamina é de extrema necessidade intramacrófago, para sobrevivência e manutenção de suas funções essenciais (Lin, 1987; Obradors *et al.*, 1988). Em estudo com infecção de SG mutante com deleção dos genes *CobS* e *CbiA*, responsáveis pela síntese de cobalamina, foi constatado que a alta taxa de mortalidade do tifo aviário foi reduzido a zero, além da baixa taxa de colonização de SG nos órgãos, demonstrando que a fase sistêmica da doença não ocorre com a estirpe mutante (Paiva *et al.*, 2009).

Com isso podemos imputar que os genes *CobS* e *CbiA* são essenciais para sobrevivência de SG mutante intramacrófago, devido a oxidação da bactéria pela produção de espécies reativas de oxigênio pelo macrófago, e sem a possibilidade de ter um aceptor de elétrons em anaerobiose a bactéria morre (Paiva *et al.*, 2011).

Em alguns estudos se verifica a possibilidade de SG mutante (Δ *CobS* Δ *CbiA*) ser utilizado como um potencial método de profilaxia contra a

estirpe selvagem, devido à ausência de mortalidade em galinhas infectadas com a mutante (Paiva *et al.*, 2012). São necessários estudos futuros sobre as diferenças de produção de proteínas e efetores intramacrófago da estirpe mutante e selvagem, através de análise de transcriptoma em macrófagos HD11 retirados do sangue da asa de galinhas, infectados com ambas as estirpes, para determinar quais fatores estão envolvidos na queda da virulência na estirpe mutante (Campos *et al.*, 2024). Esses estudos ajudarão a elucidar as lacunas presentes no conhecimento atual.

3. DISCUSSÃO

As principais interações entre SG e macrófagos estão envolvidas com as ilhas de patogenicidade SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-13, SPI-14, SPI-19, e os genes envolvidos com a síntese de cobalamina, possuem relações diretas com as interações com os macrófagos. Alguns desses tem grande potencial para se tornar uma forma de profilaxia, como vacina. Saber quais mecanismos são utilizados na vida intramacrófago de SG, permite elaborar maneiras de impedir sua disseminação na carcaça da ave, através da movimentação livre dos macrófagos pelos tecidos, evitando a fase sistêmica da doença, que auxilia o sistema imune da ave e diminuindo as altas taxas de mortalidade, como no caso das mutantes $\Delta CobS\Delta CbiA$ e $\Delta MgtC$ (Paiva *et al.*, 2012; Alves, 2022).

Apesar do vasto conhecimento disponível, diversos mecanismos não foram estudados especificamente neste sorovar, limitando um entendimento mais preciso. A escassez de informações compiladas em um único trabalho sobre as interações de macrófagos com SG, demonstra a necessidade deste trabalho.

4. CONCLUSÃO

Em resumo, este trabalho compilou conhecimento relevante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na adesão, invasão, sobrevivência e multiplicação de *Salmonella Gallinarum* em macrófago de aves, a fim de auxiliar o entendimento de futuros estudantes sobre as bases genéticas relacionadas

com o tifo aviário e futuras pesquisas específicas em SG, que são necessárias para uma elucidação mais completa dos mecanismos envolvidos na patogenia do tifo aviário. Futuramente será possível conhecer melhor essas relações, a partir de mais análises transcriptômicas de *S. Gallinarum* dentro do macrófago, permitindo a identificação precisa dos genes ativados e quais proteínas estruturais e efetoras são produzidas durante a infecção. Isso permitirá a construção de novas maneiras de profilaxia, redução das taxas de mortalidade das aves e perdas econômicas causadas pelo tifo aviário.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA – **Associação Brasileira de Proteína Animal** (2023). Relatório anual de 2023. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2023.

Alves, L. B. R. **Efeito da deleção do gene *mgtc* sobre a patogenicidade de *Salmonella Gallinarum* em aves susceptíveis**. Tese Doutorado em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2022.

Andreatti Filho, Berchieri Júnior, Nepomuceno da Silva, Alberto Back, José Di Fábio, Fagnani Zuanaze. **Doenças das aves**. 3º edição. FACTA, 2017.

Bakowski M. A.; Cirulis J. T.; Brown N. F.; Finlay B. B.; Brumell J. H.; SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. **Cellular Microbiology**, 2007.

Berchieri Junior, A.; Freitas Neto, O. C., (2009). Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.435-454, 2009.

Blanc-Potard, A. B., & Groisman, E. A., *The Salmonella selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival*. **The EMBO journal**, v.16(17), p5376-5385, 1997.

Blondel, C. J.; Jiménez, J. C.; Leiva, L. E.; Alvarez, S. A.; Pinto, B. I.; Contreras, F.; Pezoa, D.; Santiviago, C. A., *The type VI secretion system encoded in Salmonella pathogenicity island 19 is required for Salmonella enterica serotype Gallinarum survival within infected macrophages. Infection and Immunity*, v.81, p.1207-1220, 2013.

Blondel, C. J.; Yang, H-J.; Castro, B.; Chiang, S.; Toro, C. S.; Zaldívar, M.; Contreras, I.; Andrews-Polymenis, H. L.; Santiviago, C. A., *Contribution of the Type VI Secretion System Encoded in SPI-19 to Chicken Colonization by Salmonella enterica Serotypes Gallinarum and Enteritidis. PLoS ONE*, v.5(7), e11724, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0011724.

Brasil (2010), Ministério da Saúde. **Manual Integrado de Vigilância e Controle da Febre Tifoide**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-tifoide/publicacoes/manual-integrado-de-vigilancia-e-controle-da-febre-tifoide/view>>. Acesso em: 18 set. 2023.

Brasil (2023), Ministério da Agricultura e Pecuária. PNSA – **Salmonelas**. Disponível em:<<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/salmonelas>>. Acesso em: 15 set. 2023.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 56, DE 4 DE DEZEMBRO DE 2007**. Brasília, DF: Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento, 06 dez 2007. Assunto: Manejo Sanitário.

Brown K. W.; Ryan R. M.; Creswell J. D.; *Mindfulness: Theoretical Foundations and Evidence for Its Salutary Effects. Psychological Inquiry*, 2007

Campos, Isabella Cardeal. Avaliação do comportamento da estirpe de *Salmonella* Gallinarum 287/91 contendo deleção dos genes cobS e cbiA durante a infecção de macrófagos primários de aves. **Biblioteca Virtual da FAPESP**, 2024. Disponível em: <https://bv.fapesp.br/pt/bolsas/210092/avaliacao-do->

[comportamento-da-estirpe-de-salmonella-gallinarum-28791-contendo-delecao-dos-genes-cobs/](#) . Acessado em: 03/01/2024.

Cardeal, I. C. M. A., Uso terapêutico de chaperones em doenças conformacionais. **Universidade Fernando Pessoa**, 2013.

Catneiro, D. O.; Costa, M. S. F., Características e patogenicidade da *Salmonella enterica*: uma revisão de literatura. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.21, p. 72-79, 2020.

CELIS-ESTUPIÑAN A.L.D.P.; BATISTA D.F.A.; CARDOZO M.V.; SOUZA A.I.S.; ALVES L.B.R.; ALMEIDA A.M.; BARROW P.A.; BERCHIERI JR A.; FREITAS NETO O.C., *Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil*, **AvianPathology**, v.46, p416-425, 2017. DOI: 10.1080/03079457.2017.1299922.

Chacón, R. D., Chacón, J. L., Ramírez, M., Cueva, C. L. R., Quispe-Rojas, W. U., Reyes-Moreno, C. B., ... & Ferreira, A. J. P., *Complete genome sequence data of two Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum: A 9R vaccine strain and a virulent Brazilian field strain*. **Data in Brief**, v.47, e108959, 2023.

Chacón, R. D., Ramírez, M., Rodríguez-Cueva, C. L., Sánchez, C., Quispe-Rojas, W. U., Astolfi-Ferreira, C. S., & Piantino Ferreira, A. J., *Genomic characterization and genetic profiles of Salmonella gallinarum strains isolated from layers with fowl typhoid in Colombia*. **Genes**, v.14(4), p823, 2023.

Chappell, L.; Kaiser, P.; Barrow, P.; Jones, M. A.; Johnston, C.; Wigley P., *The immunobiology of avian systemic salmonellosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 53-59, 2009.

Choi E, Choi S, Nam D, Park S, Han Y, Lee J, Lee E, *Elongation factor P restricts Salmonella's growth by controlling translation of Mg²⁺ transporter gene during infection*. **Scientific Reports**, v.7, p1-10, 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/srep42098>, 2017a.

Collazo C. M.; Galàn J. E.; *The invasion-associated type-III protein secretion system in Salmonella*. **Gene**, 1997.

Collazo C. M.; Zierler M. K.; Galàn J. E.; *Functional analysis of the Salmonella typhimurium invasion genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus*. **Molecular Microbiology**, 1995.

Deiwick, J., Salcedo, S. P., Boucrot, E., Gilliland, S. M., Henry, T., Petermann, N., Waterman, R. S., Gorvel, J-P., Holden, D. W. & Méresse, S., *The translocated Salmonella effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche*. **Infection and immunity**, v.74(12), p6965-6972, 2006.

Dorsey, C. W., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Weening, E. H., & Bäumlér, A. J., *Salmonella enterica serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin*. **Molecular microbiology**, v.57(1), p196-211, 2005.

Dougan, G., John, V., Palmer, S., & Mastroeni, P., *Immunity to salmonellosis*. **Immunological reviews**, v.240(1), p196-210, 2011.

Ehrbar, K.; Haofelmeier, S.; Stevher, B.; Hardt, W-D., *InvB Is Required for Type III-Dependent Secretion of SopA in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p.1215-1219, 2003.

Ehrbar, K.; Miold, S.; Friebe, A.; Stender, S.; Hardt, W-D., *Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of Salmonella typhimurium*. **Int. J. Med. Microbiol**, v.291, p.479-485, 2002.

Elder, J. R.; Chiok, K L.; Paul, N C.; Haldorson, G.; Guard, J.; Shah, D. H., *The Salmonella pathogenicity island 13 contributes to pathogenesis in streptomycin pre-treated mice but not in day-old chickens*. **Gut Pathogens**, v.8, p16, 2016. DOI 10.1186/s13099-016-0098-0.

Elder, J. R.; Paul, N. C.; Burin, R.; Guard, J.; Shaha, D. H., *Genomic organization and role of SPI-13 in nutritional fitness of Salmonella*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.308, p1043–1052, 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.10.004>>.

Eriksson, S.; Lucchini, S.; Thompson, A.; Rhen, M.; Hinton, J. C. D., *Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, v.47 (1), p103–118, 2003.

Faucher, S.P.; Porwollik, S.; Dozois, C. M.; McClelland, M.; Daigle, F., *Transcriptome of Salmonella enterica serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences*. **PNAS**, v.103 (6), p1906-1911, 2006. <<https://doi.org/10.1073/pnas.0509183103>>.

Fei, X.; Schroll, C.; Huang, K.; Jens P. Christensen, J. P.; Christensen, H.; Lemire, S.; Kilstrup, M.; Line E. Thomsen, L. E.; Jelsbak, L.; Olsen, J. E., *The global transcriptomes of Salmonella enterica serovars Gallinarum, Dublin and Enteritidis in the avian host*. **Microbial Pathogenesis**, v.182, e106236, 2023.

Feria, J. M.; Valvano, M. A., *An Overview of Anti-Eukaryotic T6SS Effectors*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.584751

Figueira, R., & Holden, D. W., *Functions of the Salmonella pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors*. **Microbiology**, v.158(5), p1147-1161, 2012.

Fiskin E.; Bhogaraju S.; Herhaus L.; Kalayil S.; Hahn M.; Dikic I.; *Structural basis for the recognition and degradation of host TRIM proteins by Salmonella effector SopA*. **Nature Communications**, 2017.

Fookes, M.; Schroeder, G. N.; Langridge, G.C.; Blondel, C. J.; Mammina, C.; Connor, T. R.; Seth-Smith, H.; Vernikos, G. S.; Robinson, K.S.; Sanders, M.; Petty, N.K.; Kingsley, R. A.; Bäumler, A. J.; Nuccio, Sean-Paul; Contreras, I.; Santiviago, C. A.; Maskell, D.; Barrow, P.; Humphrey, T.; Nastasi, A.; Roberts,

M.; Gad Frankel, G.; Parkhill, J.; Dougan, G.; Thomson, N. R., *Salmonella bongori Provides Insights into the Evolution of the Salmonellae*. **PLoS Pathog** v.7(8), e1002191. 2011. doi: 10.1371/journal.ppat.

Fortes, T. P., Fagundes, M. Q., Vasconcellos, F. A., Tim, C. D., Silva, É. F., Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71(2), p219-227, 2012.

FREITAS N., OC.; ARROYAVE W.; ALESSI A.; FAGLIARI JJ; BERCHIERI A., *Infection of Commercial Laying Hens with Salmonella Gallinarum: Clinical, Anatomopathological and Haematological Studies*. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, p133 – 141, 2007.

Freitas Neto, O.C; Penha Filho, R.A.C.; Berchieri Junior, A. (2020). Salmoneloses aviárias. In: Andreatti Filho RL, Berchieri Junior A, Silva EN, Back A, Di Fabio J, Zuanaze MAF (Eds.) **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p. 495-518.

Friebel A.; Ilchmann H.; Aepfelbacher M.; Ehrbar K.; Machleidt W.; MHardt W. D.; SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, 2001.

Galan J. E.; Zhou D.; *Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella*. **PNAS**, 2000.

Galyov E. E.; Wood M. W.; Rosqvist R.; Mullan P. B.; Watson P. R.; Hedges S.; Wallis T. S.; *A secreted effector protein of Salmonella dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa*. **Molecular Microbiology**, 1997.

Gillis C. C.; Winte M. G.; Chanin R. B.; Zhu W.; Spiga L.; Winter S. E.; *Host-Derived Metabolites Modulate Transcription of Salmonella genes Involved in l-lactate utilization during gut colonization*. **Infect Immun**. University of California San Diego School of Medicine, 2019.

Glasgow S. M.; Carlson J.; Zhu W.; Chaboub L. S.; Kang P.; Lee H. K.; Clovis Y.; Lozzi B.; McEvilly R. J.; Rosenfeld M. G.; Creighton C.; Lee S.; Mohila C.; Deneen B.; *Glia-specific enhancers and chromatin structure regulate NFIA expression and glioma tumorigenesis. Nat Neurosci*, 2017.

Groisman, E. A., & Ochman, H. *Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell*, v.87(5), p791-794, 1996.

Günster, R. A., Matthews, S. A., Holden, D. W., & Thurston, T. L., SseK1 and SseK3 type III secretion system effectors inhibit NF- κ B signaling and necroptotic cell death in *Salmonella*-infected macrophages. *Infection and immunity*, v.85(3), e00010-00017, 2017.

Hansen-Wester, I., & Hensel, M., *Genome-based identification of chromosomal regions specific for Salmonella spp., Infection and immunity*, v.70(5), p2351-2360, 2002.

Hardt W. D.; Chen L. M.; Schuebel K. E.; Bustelo X. R.; Galán J. E.; *S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. Cell*, 1998.

Hartl, F. U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M., *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature*, v. 475, p.324-332, 2011.

HÉLIO J. M. (2020). Salmoneloses aviárias. In: ANDREATTI R., BERCHIERI A., Silva EN., Back A., Di Fabio J, ZUANAZE MAF (Eds.) **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p. 469-490.

Hensel, M., Hinsley, A. P., Nikolaus, T., Sawers, G., & Berks, B. C., *The genetic basis of tetrathionate respiration in Salmonella typhimurium. Molecular microbiology*, v.32(2), p275-287, 1999.

Hensel, M., Shea, J. E., Raupach, B., Monack, D., Falkow, S., Gleeson, C., ... & Holden, D. W., *Functional analysis of ssaJ and the ssaK/U operon, 13 genes*

encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* pathogenicity island 2. **Molecular microbiology**, v.24(1), p155-167, 1997.

Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S., & Zychlinsky, A. *The Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96(5), p2396-2401, 1999.

Hu, Z., Ojima, S.; Zhu, Z.; Yu, X.; Sugiyama, M.; Haneda, T.; Okamura, M.; Ono, H.K.; Hu, D-L., *Salmonella* pathogenicity island-14 is a critical virulence factor responsible for systemic infection in chickens caused by *Salmonella* gallinarum. **Front. Vet. Sci.** v.11, e1401392, 2024. doi: 10.3389/fvets.2024.1401392.

Humphreys H.; Coia J. E.; Stacey S.; Thomas M.; Belli A. M.; Hoffman P.; Jenks P.; Mackintosh C. A.; *Guidelines on the facilities required for minor surgical procedures and minimal access interventions.* **Journal of Hospital Infection**, 2012.

Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O., *Salmonella the ultimate insider. Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. **Cellular microbiology**, v.11(11), p1579-1586, 2009.

Jackson, L. K., Nawabi, P., Hentea, C., Roark, E. A., & Haldar, K., *The Salmonella* virulence protein SifA is a G protein antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105(37), p14141-14146, 2008.

Jiang, L.; Feng, L.; Yang, B.; Zhang, W.; Wang, P.; Jiang, X.; Wang, L., *Signal transduction pathway mediated by the novel regulator LoiA for low oxygen tension induced Salmonella Typhimurium invasion.* **PLoS Pathog**, v.13(6), e1006429, 2017. <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006429>>.

Klein, J. R., & Jones, B. D., *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. **Infection and immunity**, v.69(2), p737-743, 2001.

Knodler L. A.; Vallance B. A.; Celli J.; Winfree S.; Hansen B.; Montero M.; Steele-Mortimer O.; *Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. PNAS*, 2010.

Knuff, K.; Finlay, B. B., *What the SIF Is Happening—The Role of Intracellular Salmonella-Induced Filaments. Frontiers*, v.7, artigo 335, 2017.

Kuhle, V. & Hensel, M., *SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments. Cellular microbiology*, v.4(12), p813-824, 2002.

Kujat Choy, S. L., Boyle, E. C., Gal-Mor, O., Goode, D. L., Valdez, Y., Vallance, B. A., & Finlay, B. B., *SseK1 and SseK2 are novel translocated proteins of Salmonella enterica serovar typhimurium. Infection and immunity*, v.72(9), p5115-5125, 2004.

Latasa, C.; Roux, A.; Alejandro Toledo-Arana, A.; Ghigo, J-M.; Gamazo, C.; Penadés, J. R.; Lasa, I., *BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of Salmonella enterica serovar Enteritidis. Molecular Microbiology*, v.58, p1322-1339, 2005. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04907.x>>.

Lee M.; Chatterjee S.; Struhl K.; *Genetic analysis of the role of Pol II holoenzyme components in repression by the Cyc8-Tup1 corepressor in yeast. Journal Article*, US, 2000.

Lee, E. J., & Groisman, E. A., *Tandem attenuators control expression of the Salmonella mgtCBR virulence operon. Molecular microbiology*, v.86(1), p212-224, 2012.

Li, L., Tutone, A. F., Drummond, R. S., Gardner, R. C., & Luan, S., *A novel family of magnesium transport genes in Arabidopsis. The Plant Cell*, v.13(12), p2761-2775, 2001.

LIN, E.C.C. Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates. p.244-284. In F.D. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger. *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: cellular and molecular biology*. 1st edn. **ASM**, Press Washington DC, 1987.

Lopes, P. D., **Avaliação da patogenia de estirpes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo gallinarum biovar gallinarum com os genes responsáveis pela expressão de flagelo ativos**. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal. Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2013.

Lossi, N. S., Rolhion, N., Magee, A. I., Boyle, C., & Holden, D. W., *The Salmonella SPI-2 effector SseJ exhibits eukaryotic activator-dependent phospholipase A and glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase activity*. **Microbiology**, v.154(9), p2680-2688, 2008.

Lou L.; Zhang P.; Piao R.; Wang Y.; *Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network*. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, 2019.

Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B., *Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages*. **Microbes and infection**, v.2(2), p145-156, 2000.

McGhie E. J.; Hayward R. D.; Koronakis V.; *Control of Actin Turnover by a Salmonella Invasion Protein*. **Department of Pathology University of Cambridge**, 2004

McGhie E. J.; Hayward R. D.; Koronakis V.; *Cooperation between actin-binding proteins of invasive Salmonella: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin*. **The EMBO Journal**, 2001

McIntosh K.; Mercer S.H.; Nese R. N. T.; Strickland-Cohen M. K.; Kittelman A.; Hoselton R.; Horner R. H.; *Factors Predicting Sustained Implementation of a Universal Behavior Support Framework*. **Educational Researcher**, 2017.

Miao, E. A., Scherer, C. A., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., Bäumlér, A. J., & Miller, S. I., *Salmonella typhimurium leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. Molecular microbiology*, v.34(4), p850-864, 1999.

Mills D.M.; Bajaj V.; Lee C.A.; *A 40 kb chromosomal fragment encoding Salmonella Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the Escherichia coli K-12 chromosome. Mol Microbiol.* 1995; v.15, p749-759, 2006.

Miold, S.; Rabsch, W.; Tschäpe, H.; Hardt, W.; *Transfer of the Salmonella type III effector sopE between unrelated phage families. Journal of Molecular Biology*, 2001.

Moreira, N. M.; Sola, M. C.; Feistel, J. C.; Oliveira, J. J.; Freitas, F.A., Os Mecanismos De Resistência Bacteriana Da *Salmonella* Sp. Frente à Utilização De Antibióticos. **Centro Científico Conhece**. Goiânia v.9, n.16, p.12, 2013.

Myeni, S. K.; Zhou D.; *The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote Salmonella invasion. Journal of biological chemistry*, 2010.

Nikolaus, T.; Deiwick, J.; Rappl, C.; Freeman, J. A.; Schröder, W.; Miller, S. I.; Hensel, M., *SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 and function as a translocon. Journal of bacteriology*, v.183(20), p6036-6045, 2001.

OBRADORS, N.; BADIA, J.; BALDOMA, L; AGUILAR, J. *Anaerobic metabolism of the L-rhamnose fermentation product 1,2-propanediol in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol.*, v.170, p2159–2162, 1988.

Ochoa, I. M. F.; Rodríguez, A. V. Mecanismos moleculares de patogenicidade de *Salmonella* spp., **Microbiología ALAM**, v.47 N° 1-2, p.25-42, 2005.

Paiva J.B.; Penha Filho, R.A.C.; Moura, B.S., Berchieri Junior, A, *Safety and Efficacy of a Salmonella Gallinarum ΔcobSΔcbiA Strain with Potential to Prevent*

Chicken Infections by Salmonella Gallinarum and Salmonella Enteritidis. Brazilian Journal of Poultry Science. v.14 / n.2 / 71-158, 2012.

Paiva, J.B; Penha Filho, C.; Berchieri Junior, A.; Lemos, M. V. F., *Requirement for cobalamin by Salmonella enterica serovars typhimurium, pullorum, gallinarum and enteritidis during infection in chickens. Brazilian Journal of Microbiology* v.42: p1409-1419, 2011.

Paiva, J.B; Rafael Antonio Casarin Penha Filho, R.A.C.; Yuli Melisa Sierra Arguello, Y.M.S.; Ângelo Berchieri Junior, A.; Manuel Victor Franco Lemos, M.V.F.; Paul A. Barrow, P.A., *A defective mutant of Salmonella enterica serovar gallinarum in cobalamin biosynthesis is avirulent in chickens. Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p495-504, 2009.

Parkhill, J.; Dougan, G.; James, K. D.; Thomson, N. R.; Pickard, D.; Wain, J.; Churcher, C.; Mungall, K. L.; Bentley, S. D.; Holden, M. T. G.; Sebaihia, M.; Baker, S.; Basham, D.; Brooks, K.; Chillingworth, T.; Connor, P.; Cronin, A.; Davis, P.; Davies, R. M.; Dowd, L.; White, N.; Farrar, J.; Feltwell, T.; Hamlin, N.; Haque, A.; Hien, T. T.; Holroyd, S.; Jagels, K.; Krogh, A.; Larsen, T. S.; Leather, S.; Moule, S.; Ó'Gaora, P.; Parry, C.; Quail, M.; Rutherford, K.; Simmonds, M.; Skelton, J.; Stevens, K.; Whitehead S.; Barrell B. G., *Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18. Nature*, v.413, p848–852, 2001.

Pavlova, B., Volf, J., Ondrackova, P., Matiasovic, J., Stepanova, H., Crhanova, M., ... & Rychlik, I., *SPI-1-encoded type III secretion system of Salmonella enterica is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. Veterinary Research*, v.42, 1-7, 2011.

PLÜDDEMANN, A., Mukhopadhyay, S., & Gordon, S., *Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry, Immunological reviews*, vol 240(1), p 11-24, 2011.

Pontes, M. H., Yeom, J., & Groisman, E. A., *Reducing ribosome biosynthesis promotes translation during low Mg²⁺ stress*. ***Molecular Cell***, v.64(3), p480-492, 2016.

Pullinger, G. D., Paulin, S. M., Charleston, B., Watson, P. R., Bowen, A. J., Dziva, F., ... & Stevens, M. P., *Systemic translocation of Salmonella enterica serovar Dublin in cattle occurs predominantly via efferent lymphatics in a cell-free niche and requires type III secretion system 1 (T3SS-1) but not T3SS-2*. ***Infection and Immunity***, v.75(11), p5191-5199, 2007.

Raffatellu M.; Wilson R. P.; Chessa D.; Andrews-Polymeris H.; Tran Q. T.; Lawhon S.; Khare S.; Adams L. G.; Bäuml A. J.; SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to Salmonella enterica serotype typhimurium invasion of epithelial cells. ***ASM Journals***, 2005.

Rang, C., Alix, E., Felix, C., Heitz, A., Tasse, L., & Blanc-Potard, A. B., *Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments*. ***Molecular microbiology***, v.63(2), p605-622, 2007.

Rodríguez-Escudero L.; Ferrer N. L.; Rotger R.; Cid V. J.; Molina M.; *Interaction of the Salmonella Typhimurium effector protein SopB with host cell Cdc42 is involved in intracellular replication*. ***Cellular Microbiology***, 2011.

Ruiz-Albert, J., Yu, X. J., Beuzón, C. R., Blakey, A. N., Galyov, E. E., & Holden, D. W., *Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the Salmonella typhimurium vacuolar membrane*. ***Molecular microbiology***, v.44(3), p645-661, 2002.

Rytkönen, A., Poh, J., Garmendia, J., Boyle, C., Thompson, A., Liu, M., ... & Holden, D. W., *SseL, a Salmonella deubiquitinase required for macrophage killing and virulence*. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v.104(9), p3502-3507, 2007.

Saroj, S. D., Shashidhar, R., Karani, M., & Bandekar, J. R., Distribution of *Salmonella pathogenicity island (SPI)-8 and SPI-10 among different serotypes of Salmonella*. **Journal of medical microbiology**, v.57(4), p424-427, 2008.

Schlumberger M. C.; Hardt W.; *Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings*. **Current Opinion in Microbiology**, 2006.

Schmidt, H., & Hensel, M., *Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis*. **Clinical microbiology reviews**, v.17, p14-56, 2004.

Schroll, C.; Huang K.; Ahmed, S.; Kristensen, B. M.; Pors, S. E.; Jelsbak, L.; Lemire, S.; Thomsen, L. E.; Christensen, J. P.; Jensen P. R.; Olsen, J. E., *The SPI-19 encoded type-six secretion-systems (T6SS) of Salmonella enterica serovars Gallinarum and Dublin play different roles during infection*. **Veterinary Microbiology**, v.230, p23–31, 2019.

Shivaprasad, H. L., *Fowl typhoid and pullorum disease*. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v.19, p405-424, 2000.

Shivaprasad, H.L. & Barrow, P.A., *Pullorum disease and fowl typhoid*. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez & V.L. Nair (Eds.). **Diseases of Poultry** 13^o ed. p. 678–693, 2013.

Silva Dantas, A., *Reactive oxygen species at the interface of host-pathogen interactions*. **Cellular Microbiology**, 23^oed, p13310-13310, 2021.

Steele-Mortimer, O., *The Salmonella-containing vacuole—moving with the times*. **Current opinion in microbiology**, v.11, p38-45, 2008.

Thomson, N. R.; Clayton, D. J.; Windhorst, D.; Vernikos, G.; Davidson, S.; Churcher, C.; Quail, M. A.; Stevens, M. Jones, M. A.; Watson, M.; Barron, A.; Layton, A.; Pickard, D.; Robert A. Kingsley, Alex Bignell, Louise Clark, Barbara Harris, Doug Ormond, Abdallah, Z.; Brooks, K.; Cherevach, I.; Chillingworth, T.; Woodward, J.; Norberczak, H.; Lord, A.; Arrowsmith, C.; Jagels, K.; Moule, S.; Mungall, K.; Sanders, M.; Whitehead, S.; Chabalgoity, J. A.; Maskell, D.;

Humphrey, T.; Roberts, M.; Barrow, P. A.; Dougan, G.; Parkhill J., *Comparative genome analysis of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation Pathways. Genome Research.* v.18, p1624–1637, 2008.

Tomljenovic-Berube, A. M., Henriksbo, B., Porwollik, S., Cooper, C. A., Tuinema, B. R., McClelland, M., & Coombes, B. K., *Mapping and regulation of genes within Salmonella pathogenicity island 12 that contribute to in vivo fitness of Salmonella enterica Serovar Typhimurium. Infection and immunity,* v.81, p2394-2404, 2013.

Uchiya K. I.; Tomida S.; Nakagawa T.; Asahi S.; Nikai T.; Ogawa K.; *Comparative genome analyses of Mycobacterium avium reveal genomic features of its subspecies and strains that cause progression of pulmonary disease. Scientific Reports,* 2019

Uchiya, K. I., Barbieri, M. A., Funato, K., Shah, A. H., Stahl, P. D., & Groisman, E. A., *A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking. The EMBO journal,* v.18, p3924-3933, 1999.

Van Engelenburg S. B.; Palmer A. E., *Quantification of real-time Salmonella effector type III secretion kinetics reveals differential secretion rates for SopE2 and SptP. Chemistry & Biology,* 2008.

Velásquez, J. C.; Hidalgo, A. A.; Villagra, N.; Santiviago, C. A.; Mora, G. C.; Fuentes, Juan A., *SPI-9 of Salmonella enterica serovar Typhi is constituted by an operon positively regulated by RpoS and contributes to adherence to epithelial cells in culture. Microbiology Society,* v.162, 2016. <<https://doi.org/10.1099/mic.0.000319>>.

Vernikos, G. S., & Parkhill, J., *Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the Salmonella pathogenicity islands. Bioinformatics,* v.22, p2196-2203, 2006.

Vonaesch, P.; Selin, M. E.; Cardini, S.; Singh, V.; Barthel, M., *The Salmonella Typhimurium effector protein SopE transiently localizes to the early SCV and contributes to intracellular replication. Cellular Microbiology*, v.16, p.1723-1735, 2014.

Xian, H.; Yuan, Y.; Yin, C.; Wang, Z.; Ji,R.; Chu,C.; Jiao, X.; Li, Q., *The SPI-19 encoded T6SS is required for Salmonella Pullorum survival within avian macrophages and initial colonization in chicken dependent on inhibition of host immune response. Veterinary Microbiology* v.250 e1088672, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108867>.

Yang, X., Buzon, L., Hamanaka, E., & Liu, K. K. C., *Enzymatic resolution of benzothiazepine for the preparation of squalene synthetase inhibitors. Tetrahedron: Asymmetry*, v.11, p4447-4450, 2000.

Yu, X. J., Liu, M., & Holden, D. W., *Salmonella effectors SseF and SseG interact with mammalian protein ACBD3 (GCP60) to anchor Salmonella-containing vacuoles at the Golgi network. MBio*, v.7, p1128, 2016.

Zhang T.; Breitbart M.; Lee W. H.; Run J.; Wei C. L.; Soh S. W. L.; Hibberd M. L.; Liu E. T.; Rohwer F.; Ruan Y.; *RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses. Plos Biology*, 2005.

Zhou A.; Webb G.; Zhu X.; Steiner D. F.; *Proteolytic processing in the secretory pathway, J Biol Chem*. V.274 p20745-20748, 1999.

Zhou, X., Kang, X., Zhou, K. *et al.*, *A global dataset for prevalence of Salmonella Gallinarum between 1945 and 2021. Sci Data* v.9, p495, 2022.