

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 31/11/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA DELEÇÃO DO GENE *mgtC* SOBRE A
PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM EM AVES
SUSCEPTÍVEIS**

Lucas Bocchini Rodrigues Alves
Médico Veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA DELEÇÃO DO GENE *mgtC* SOBRE A
PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM EM AVES
SUSCEPTÍVEIS**

Discente: Lucas Bocchini Rodrigues Alves

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

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

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

A474e

Alves, Lucas Bocchini Rodrigues

Efeito da deleção do gene mgtC sobre a patogenicidade de Salmonella Gallinarum em aves susceptíveis / Lucas Bocchini Rodrigues Alves. -- Jaboticabal, 2022

110 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Oliveira Caetano de Freitas Neto

1. Aves domésticas Doenças. 2. Fatores de virulência. 3. Microorganismos patogênicos. 4. Mutagenese. 5. Imunologia veterinária. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DA DELEÇÃO DO GENE *mgtC* SOBRE A PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM EM AVES SUSCEPTÍVEIS

AUTOR: LUCAS BOCCHINI RODRIGUES ALVES

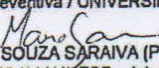
ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

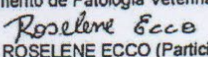
COORDENADOR: OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

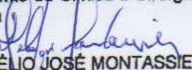
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Universidade Federal de Minas Gerais UFMG Belo HorizonteMG


Professor Doutor ANDREY PEREIRA LAGE (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


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


Prof. Dr. ROSELENE ECCO (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. / Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Escola de Veterinária


Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodutiva e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 31 de maio de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS BOCCHINI RODRIGUES ALVES – Nascido em 14 de Maio de 1990 na cidade de Franca, São Paulo, filho de Flávio Rodrigues Alves Filho e Lana de Paula Bocchini Rodrigues Alves. Em 2009, ingressou em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP/Jaboticabal, obtendo o título de Médico Veterinário em 2013. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação na área de patologia animal, sob orientação do Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara e participou de projeto de extensão cadastrado na PROEX (Pró-reitoria de Extensão Universitária) com enfoque em assistência a propriedades leiteiras familiares, sob coordenação da Profa. Dra. Maria Imaculada Fonseca. Em Agosto de 2015, ingressou no mestrado da FCAV - UNESP/Jaboticabal pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária com estudo sobre a patogenicidade de mutante de *Salmonella* Gallinarum contendo a deleção dos genes *phoP* e *phoQ* sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e co-orientação do Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto. Na mesma Instituição e sob mesma orientação e co-orientação, iniciou o doutorado em Agosto de 2017 pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal. Entre Março e Outubro de 2020, realizou estágio de doutorado na Universidade de Copenhagen, Dinamarca, sob orientação do Prof. Dr. John Elmerdahl Olsen. Durante o período de pós-graduação realizou dois estágios docência na disciplina de Ornitopatologia da FCAV – UNESP/Jaboticabal. Atualmente é Médico Veterinário Especialista do setor de Qualidade Animal – Aves e Suínos (CIEX Agropecuária) da JBS/Seara Alimentos.

DEDICATÓRIA

Dedico

Aos meus pais, Flávio e Lana, aos meus irmãos Matheus e Danilo, à minha namorada Mirella, às minhas cunhadas Flávia e Patrícia e aos meus sobrinhos Vicente e Antônio.

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

AGRADECIMENTOS

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

À Mirella, pelo começo de nossa caminhada juntos que se sustenta há nove anos baseado em apoio constante, amor e companheirismo. Obrigado por todo carinho e paciência em nosso dia a dia. Tenho enorme admiração por você.

Aos meus irmãos, Matheus e Danilo, por todo apoio, amor, companheirismo e compreensão. Vocês exercem perfeitamente o papel de irmãos mais velhos, sempre me ensinando e sendo grandes amigos.

Às minhas queridas cunhadas, Flávia e Patrícia. Obrigado por todo apoio, carinho e amizade. Agradeço por estarem presentes em minha vida e por todo o bem que nos fazem.

Aos meus amados sobrinhos, Vicente e Antônio. Obrigado por se tornarem mais uma alegria em nossas vidas e por serem um incentivo para me tornar cada dia melhor.

Aos meus avós, Flávio, Rosita, Waldemar e Olga por todo o carinho, amor e apoio. Tenho imenso orgulho em ser neto de vocês e por nos darem toda a base para a construção de nossa família. Agradeço também a todos tios e primos que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha sogra, Zélia, por me tratar como filho com todo o amor e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, por todos os ensinamentos, incentivo, paciência e amizade. Um grande exemplo não só para mim, mas para todos da avicultura. Sou eternamente grato por investir em meu desenvolvimento profissional e pessoal ao longo desses anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto, pela amizade, pelos ensinamentos e paciência. Obrigado pela sua co-orientação durante meu mestrado e doutorado. Tenho grande admiração por você.

Ao meu supervisor do doutorado sanduíche, Prof. Dr. John Elmerdahl Olsen, da Universidade de Copenhagen, Dinamarca, pela oportunidade e orientação. Agradeço pelo apoio de toda a equipe durante esse período.

À técnica do Laboratório de Ornitopatologia, Adriana, pela amizade e por todos os ensinamentos e discussões científicas. Muito obrigado pela paciência e apoio.

A todos do Laboratório de Ornitopatologia da FCAV. Sem vocês nada disso seria possível. Muito obrigado pela amizade, ensinamentos, ajuda e apoio constante. Agradeço pela excelente equipe construída e por tornarem meu dia-a-dia mais leve com as conversas compartilhadas entre um café e outro. Sou eternamente grato a cada um de vocês.

Aos membros da banca avaliadora, Prof^a. Roselene Ecco (UFMG), Prof. Andrey Pereira Lage (UFMG), Prof. Helio José Montassier (FCAV/Unesp) e Prof. Mauro Mesquita de Souza Saraiva (FCAV/Unesp), pelas críticas construtivas e contribuições que enriqueceram o trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp) por se tornar minha casa há 13 anos. Sou eternamente grato por toda a estrutura e suporte durante a minha graduação, mestrado e doutorado.

Ao Departamento de Patologia Veterinária pelos mais de 10 anos de convivência. Deixo meu profundo agradecimento aos docentes, em especial ao Prof. Bechara, Prof^a Rosângela, Prof. Alessi, Prof^a Rose e Prof. Marcos. Muito obrigado aos funcionários Mabel, Cristina, Edgar, Theo, Chica e Moema, além de todos os discentes com os quais convivi.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processos nº 2018/12416-7 [Doutorado regular - Rodrigues Alves, LB], nº 2019/25091-5 [BEPE – Rodrigues Alves, LB], nº 2019/16198-0 [de Lima, BN], nº 2018/03189-0 [Berchieri Junior, A]), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Programa de Excelência Acadêmica – PROEX; nº de processo 1754932) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), cujos

esforços e apoios financeiros possibilitaram o desenvolvimento desta tese. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP, CAPES e CNPq.

Aos meus amigos de infância, Breno, Caio, Fúlvio, Gabriel, Leonel, Luís Felipe e Tarcísio, pelo companheirismo construído ao longo de quase 30 anos de amizade.

Aos meus amigos da República In-Dependência pelos anos de grande companheirismo, amizade, apoio constante e pelo crescimento pessoal e profissional.

Ao Jibril, Vanesa, Gang, Ahmed, Prahba, Mosaed, Xiao e Fabio. Obrigado pela amizade construída durante o período na Dinamarca.

À JBS/Seara Alimentos, em especial ao Ricardo, Khauston e Marcela da equipe de Qualidade Animal – Aves e Suínos (CIEX Agropecuária), pela oportunidade, parceria e início dessa nova caminhada profissional.

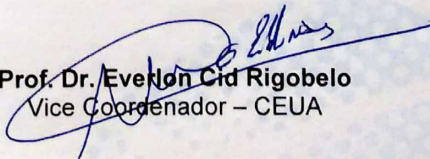
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **“Efeito da deleção do gene *mgtC* sobre a patogenicidade de *Salmonella* Gallinarum em aves susceptíveis”**, protocolo nº 019047/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2017.

Vigência do Projeto	01/07/2018 a 07/05/2021
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Hy-line Brown (postura comercial)
Nº de animais	320 aves
Peso / Idade	35 gramas / 1 dia de vida
Sexo	Fêmea
Origem	Hy-line do Brasil LTDA

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2017.


Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo
Vice Coordenador – CEUA

CERTIFICADO DA COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Seção 1

ISSN 1677-7042

Nº 174, quinta-feira, 10 de setembro de 2020

Sorriso-MT e de Rio Verde-GO, da empresa Nidera Seeds Brasil Ltda, bem como o requerimento da empresa Syngenta Seeds Ltda, para incorporar a Unidade Operativa de Douradinho, em Uberlândia-MG, pertencente ao CQB da Nidera Seeds Brasil Ltda. O requerimento poderia ter sido desmembrado em dois (exclusão e requerimento de CQB), mas entende-se que deve representar aquisição ou fusão de empresas. O requerimento de CQB da Syngenta Seeds está completo, com a descrição da infraestrutura e área que ficarão sob sua responsabilidade e que serão incorporadas ao CQB 001/96. Foi apresentado um relatório de atividades dessa Unidade no último ano. A Nidera Seeds Brasil Ltda, por sua vez, apresenta também os relatórios de atividades das duas Unidades que serão excluídas de seu CQB. Portanto, recomenda-se à CTNBio a aprovação do requerimento para exclusão do CQB 226/06 das Unidades Operativas de Sorriso-MT e Rio Verde-GO da Nidera Seeds Brasil Ltda, com cancelamento do CQB 226/06, bem como a inclusão da Unidade Operativa de Douradinho, em Uberlândia-MG, ao CQB 001/96 da Syngenta Seeds Ltda.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a CTNBio concluiu que o presente pedido atende às normas e legislação pertinentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

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

Este é um extrato do Parecer Técnico da CTNBio. Sua íntegra, assim como todos os documentos referentes à solicitação, constam do processo armazenado na CTNBio. Informações complementares poderão ser solicitadas através do Serviço de Informação ao Cidadão - SIC, pelo site eletrônico <https://esic.cgu.gov.br/>.

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.110/2020

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05; do Artigo 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05 e do Artigo 5º, inciso IV da Resolução Normativa Nº 1, de 20 de Junho de 2006 analisou a alteração da CIBio da instituição abaixo discriminada e concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

Requerente: Embrapa Trigo.

CQB: 056/08

Processo SEI nº: 01245.002919/2020-80

Assunto: Alteração da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

Extrato Prévio: 7210/2020 publicado em 05/08/2020

Decisão: DEFERIDO

Ementa: A requerente solicitou à Presidente da CTNBio parecer técnico referente à nova composição da Comissão Interna de Biossegurança. Para tanto, o responsável legal da instituição emitiu ato formal de alteração da CIBio, a saber: Ordem de Serviço Embrapa Trigo nº 6 de 22 de Julho de 2020, nomeando Ana Lídia Variani Bonato (Presidente), Ricardo Lima de Castro, Jordalan Buffet Muniz, Aloisio Alcantara Vilarinho, Elene Yamazaki Lau e Ricardo Costa Leão, para comporem a CIBio local.

Atendidas às recomendações e as medidas de biossegurança contidas no processo, esta comissão interna de biossegurança é apta a gerir os riscos associados às atividades desenvolvidas na instituição.

A CTNBio esclarece que este extrato de parecer não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis às atividades em questão.

Maiores informações deverão ser solicitadas via SIC (Serviço de Informação ao Cidadão), disponível no site do MCTIC (www.mctic.gov.br).

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.111/2020

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05; do Artigo 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05 e do Artigo 5º, inciso IV da Resolução Normativa Nº 1, de 20 de Junho de 2006 analisou a alteração da CIBio da instituição abaixo discriminada e concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

Requerente: Embrapa Agroenergia.

CQB: 345/12

Processo SEI nº: 01245.002796/2020-87

Assunto: Alteração da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

Extrato Prévio: 7207/2020 publicado em 04/08/2020

Decisão: DEFERIDO

Este é um extrato do Parecer Técnico da CTNBio. Sua íntegra, assim como todos os documentos referentes à solicitação, constam do processo armazenado na CTNBio. Informações complementares poderão ser solicitadas através do Serviço de Informação ao Cidadão - SIC, pelo site eletrônico <https://esic.cgu.gov.br/>.

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.115/2020

A Presidência da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 234ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03 de setembro de 2020, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo: 01245.002473/2020-93

Requerente: DuPont do Brasil - Divisão Pioneer Sementes S.A

CQB: 013/97

Assunto: Extensão de CQB.

A CTNBio, após análise do pedido de extensão de CQB, deliberou pelo DEFERIMENTO conforme esse parecer técnico. A requerente solicita revisão para atualização do Escritório, Sala de Manipulação de Sementes, Sala de Tratamento de Sementes e Área de Secadores e extensão de CQB para inclusão da Câmara fria, Galpão de máquinas, Sala de expurgo, Área de Campo (23,8 ha). As atividades a serem desenvolvidas serão: pesquisa em regime de contenção, liberação planejada no meio ambiente, transporte, avaliação de produto, detecção e identificação de OGM, descarte e armazenamento de plantas geneticamente modificadas pertencentes à Classe de Risco 01.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a CTNBio concluiu que o presente pedido atende às normas e legislação pertinentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

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

Este é um extrato do Parecer Técnico da CTNBio. Sua íntegra, assim como todos os documentos referentes à solicitação, constam do processo armazenado na CTNBio. Informações complementares poderão ser solicitadas através do Serviço de Informação ao Cidadão - SIC, pelo site eletrônico <https://esic.cgu.gov.br/>.

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.117/2020

O Presidente substituto da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 234ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03 de setembro de 2020, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01250.010132/2020-12

Requerente: Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus Jaboticabal

Endereço: Via de Acesso Professor Paulo Donato Casteliane, s/n - Jaboticabal-SP. CEP: 14884-900

CQB: 088/98

Assunto: Solicitação de parecer para projeto de pesquisa - Nível de Biossegurança 2

Extrato Prévio: 6969/2020, publicado no Diário Oficial da União em 13/03/2020

Decisão: DEFERIDO

A requerente, por meio de seu representante legal, solicitou parecer técnico da CTNBio referente ao Projeto: "Avaliação da deleção de genes sobre a patogenicidade de estirpes de *Salmonella* spp. em aves comerciais". Título do Subprojeto 01: "Efeito da deleção do gene *mgtC* sobre a patogenicidade de *Salmonella* gallinarum em aves suscetíveis". Título do Subprojeto 2: "Avaliação da infecção de aves (*Gallus galli domesticus*) por *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella heidelberg* contendo deleção dos genes *ttrA* e *pduA*. No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

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

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO NO SISGEN



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A835C00

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A835C00
Usuário:	UNESP
CPF/CNPJ:	48.031.918/0001-24
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Salmonella enterica

Título da Atividade:	Efeito da deleção do gene mgtC sobre a patogenicidade de Salmonella Gallinarum em aves susceptíveis
----------------------	--

EFEITO DA DELEÇÃO DO GENE *mgtC* SOBRE A PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM EM AVES SUSCEPTÍVEIS

RESUMO - *Salmonella* Gallinarum (SG) causa o tifo aviário, doença infecciosa de curso clínico agudo que acomete galináceos de qualquer idade e que resulta em elevada taxa de mortalidade. Durante a infecção sistêmica do quadro tifoide causado por *Salmonella* Typhimurium (STM) em camundongos, a bactéria expressa o gene *mgtC*, presente na Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* – 3 (SPI-3). Sua função está aparentemente ligada à multiplicação bacteriana no interior de macrófagos e sua inativação atenua o patógeno. Dessa forma, hipotetizou-se que sua deleção do genoma de SG alteraria a patogenicidade do microrganismo em aves comerciais susceptíveis visto que a infecção sistêmica cumpre papel crucial para o patógeno. Assim, o presente estudo objetivou elucidar a importância do gene *mgtC* para a patogenicidade de SG. Para isso, foi construída uma estirpe mutante de *Salmonella* Gallinarum defeitiva para o gene *mgtC* (SG $\Delta mgtC$). Posteriormente, foi avaliada sua capacidade de multiplicação em meio de cultivo que mimetiza o ambiente intracelular dos macrófagos e também nesses tipos de células imunes. Além disso, foi conduzida a infecção com SG $\Delta mgtC$ e pela estirpe selvagem de aves susceptíveis para comparar a patogenicidade, infecção sistêmica e a resposta imune induzidas por meio da mensuração de mRNA das citocinas IFN- γ e LITAF por RT-qPCR e pela quantificação da população de macrófagos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ por imunohistoquímica. Foi observado que *mgtC* foi necessário na multiplicação de *Salmonella* Gallinarum em meio acidificado com baixa concentração de Mg²⁺ e em macrófagos. Porém, só houve menor contagem bacteriana na fase tardia da infecção, sem afetar a citotoxicidade. Experimentos *in vivo* demonstraram que a deleção de *mgtC* não alterou a capacidade de invasão bacteriana e nem a contagem microbiana em fígado e baço e a mortalidade total das aves. Entretanto, ao realizar a curva de sobrevivência e analisar a evolução do quadro clínico-patológico notou-se uma progressão mais lenta da doença em aves infectadas com SG $\Delta mgtC$ em comparação com aquelas desafiadas com a estirpe selvagem. Além disso, foi necessário 1,36 Log₁₀ de UFC/mL a mais de bactérias mutantes para causar 50 % de mortalidade em comparação com a estirpe selvagem. Ademais, a expressão de mRNA de IFN- γ e LITAF foi semelhante entre grupos infectados, mas maior em relação aos não-infectados. O mesmo foi observado nas populações de macrófagos e linfócitos T CD4⁺. Por outro lado, a presença de linfócitos T CD8⁺ foi maior na fase inicial da doença provocado pela estirpe selvagem. O papel de *mgtC* no tifo aviário difere para infecções tifoïdes em mamíferos, visto que sua deleção atenuou outros sorovares. Assim, a deleção do gene *mgtC* do genoma de *Salmonella* Gallinarum não afeta a patogenicidade, mas altera levemente a patogênese.

Palavras-chave: Infecção sistêmica, Macrófagos, Patogênese, Tifo aviário, Salmonelose, SPI-3

EFFECT OF *mgtC* GENE DELETION ON *Salmonella* GALLINARUM PATHOGENICITY IN SUSCEPTIBLE POULTRY

ABSTRACT – *Salmonella* Gallinarum (SG) provokes the so-called Fowl Typhoid, an infectious disease of acute clinical course that affects gallinaceous of any age and leads to high mortality rates. During the typhoid-like systemic infection caused by *Salmonella* Typhimurium (STM) in mice, the bacterium expresses the *mgtC* gene, which is clustered in the *Salmonella* Pathogenecity Island – 3 (SPI-3). Its function is apparently linked to bacterial replication within macrophages and its absence attenuates the pathogen. In this sense, it was hypothesized that knocking-out *mgtC* from SG genome could alter the microorganism pathogenicity in susceptible commercial poultry taking into account the central role of systemic infection to the pathogen. Thus, the present study sought to elucidate the importance of *mgtC* on SG pathogenicity. For this, a *mgtC*-lacking *Salmonella* Gallinarum mutant was constructed (SG $\Delta mgtC$). In addition, its ability to replicate in medium that mimics the intracellular environment of macrophages and also in this immune cell types was evaluated. Moreover, the infection of susceptible chickens by SG $\Delta mgtC$ and the wild-type strain was performed to compare the pathogenicity, systemic infection and the elicited immune responses by measuring mRNA of IFN- γ and LITAF cytokines by RT-qPCR and the population of macrophages and lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺ by means of immunohistochemistry. It was observed herein that *mgtC* was required for *Salmonella* Gallinarum replication in both acidified low-Mg²⁺ media and macrophages. Nevertheless, lower bacterial counts was only noticed at the late stage of infection without affecting the cytotoxicity. *In vivo* experiments showed that knocking-out the *mgtC* gene neither alters bacterial invasiveness ability nor affects bacterial counts in liver and spleen and total chicken mortality. However, plotting a survival curve and analysing the development of clinical-pathologic conditions, it was observed a slower progression of the disease in chickens infected by SG $\Delta mgtC$ compared to those challenged by the wild-type strain. Furthermore, it was required more 1.36 Log₁₀ of CFU/mL of mutant strain to provoke 50 % of mortality in comparison to the wild-type strain. Moreover, the mRNA expression of IFN- γ and LITAF were similar between the infected chickens, but higher than those uninfected. The same was observed in macrophages and lymphocytes T CD4⁺ populations. On the other hand, the presence of lymphocytes T CD8⁺ was higher in the initial phase of the disease provoked by the wild-type. The role of *mgtC* in Fowl Typhoid in susceptible chickens differs from the typhoid-like infections in mammals, since its depletion attenuated other serovars. Thus, the deletion of *mgtC* gene from *Salmonella* Gallinarum genome does not affect the pathogenicity, but slightly alters the pathogenesis.

Keywords: Fowl typhoid, Macrophages, Pathogenesis, Salmonellosis, SPI-3, Systemic infection

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Salmonella*

1.1.1. Taxonomia

Em 1886, Salmon e Smith foram os pioneiros na descrição de *Salmonella* spp., mas que, erroneamente, o identificaram como o agente causador da peste suína (Freitas Neto et al., 2020). Quase meio século depois, Kauffmann e White propuseram um esquema de classificação do gênero *Salmonella* baseando-se na identificação de estruturas de superfície da bactéria, tais como os antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (*Salmonella* Subcommittee, 1932). Posteriormente, a técnica foi aperfeiçoada e aliou-se a identificação dos antígenos capsulares (Vi) e as provas bioquímicas (Grimont et al., 2000; Grimont e Weill, 2007). Esse método prevalece desde então e, à medida que se identificam novos espécimes, os mesmos são catalogados como dados suplementares (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014). Uma vez que Le Minor catalogou a maioria dos microrganismos identificados, a sistemática de classificação tem sido nomeada como *White-Kauffman-Le Minor Scheme* (Grimont e Weill, 2007).

Há duas espécies do gênero *Salmonella*, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, cuja diferenciação entre ambas foi comprovada por meio de análises filogenéticas (Grimont et al., 2000). No início dos anos 2000, foram identificados 2463 sorovares diferentes (Popoff et al., 2001) e, após sete anos, aumentou para 2579 (Grimont e Weill, 2007). Até o presente momento, foram identificados 2659 sorovares do gênero *Salmonella*, dos quais 2637 pertencem à espécie *S. enterica* e 22 à *S. bongori* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

A escrita da nomenclatura desses patógenos deve seguir a forma extensa (“Gênero espécie” “subespécie” “Sorovar” “Biovar”) ou a resumida (“Gênero” “Sorovar” e/ou “Biovar”). Dessa forma, pode-se nomear o agente etiológico do tifo aviário como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum ou, resumidamente, como *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum ou mesmo *Salmonella* Gallinarum (Grimont e Weill, 2007).

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi conduzido, conclui-se que:

- O gene *mgtC* de *Salmonella* Gallinarum é importante sob condições antimicrobianas como a acidificação e a privação de magnésio encontrados no ambiente intramacrófago uma vez que sua deleção afeta a multiplicação do patógeno em meio nutriente;

- A ausência do gene afeta a multiplicação de *Salmonella* Gallinarum em macrófagos de aves, mas só reduz as contagens microbianas na fase tardia da infecção sem alterar os níveis de citotoxicidade;

- *Salmonella* Gallinarum contendo a deleção de *mgtC* (SG $\Delta mgtC$) foi isolada nas mesmas quantidades em fígado e baço de aves susceptíveis ao tifo aviário que a estirpe selvagem. Entretanto, o acúmulo bacteriano na fase inicial da infecção sistêmica é aparentemente menor, o que resultou em maior DL50 e óbitos tardios, sem afetar a mortalidade final. Assim, a ausência de *mgtC* afetou a patogênese do tifo aviário;

- Tanto SG $\Delta mgtC$ como SG provocaram os mesmos níveis de expressão gênica de LITAF e IFN- γ em aves susceptíveis, além de semelhante recrutamento de macrófagos e linfócitos T CD4⁺. Por outro lado, o aumento na população de linfócitos T CD8⁺ resultante da infecção por SG foi mais prematuro em relação àquele causado por SG $\Delta mgtC$. Ainda assim, ambas estirpes provocaram a redução dessas células de defesa, fazendo com que os animais sucumbissem ao tifo aviário;

- O gene *mgtC* não demonstrou ser essencial para a patogenicidade de *Salmonella* Gallinarum em aves susceptíveis como foi descrito em outros sorovares de *Salmonella* infectando mamíferos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alix E, Blanc-Potard AB (2008) Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. **EMBO J** 27: 546-557. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601983>>.

Alix E, Miki T, Felix C, Rang C, Figueroa-Bossi N, Demettre E, Blanc-Potard AB (2008) Interplay between MgtC and PagC in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbial Pathogenesis** 45: 236-40. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2008.06.001>>.

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

Assoku RKG, Penhale WJ (1974) The pathogenesis of fowl typhoid: The influence of anaemia and erythrocyte clearance on the susceptibility of the fowl to bacterial endotoxin. **Journal of Comparative Pathology** 84: 443-453. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/0021-9975\(74\)90037-1](https://dx.doi.org/10.1016/0021-9975(74)90037-1)>.

Baptista DQ, Santos, AFM, Aquino, MHC, Abreu DLC, Rodrigues DP, Nascimento ER, Pereira VG (2018) Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frangos vivos e carcaças no estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research** 37: 1278-1285. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5289>>.

Barbosa FO, Freitas Neto OC, Batista DFA, Almeida AM, Rubio MS, Rodrigues Alves LB, Vasconcelos RO, Barrow PA, Berchieri Junior A (2017) Contribution of flagella and motility to gut colonisation and pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in the chicken. **Brazilian Journal of Microbiology** 48: 754-759. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.012>>.

Barbosa FO, Freitas Neto OC, Rodrigues Alves LB, Benevides VP, de Souza AIS, Rubio MS, Almeida AM, Saraiva MMS, de Oliveira CJB, Olsen JE, Berchieri Junior, A (2021) Immunological and bacteriological shifts associated with a flagellin-hyperproducing *Salmonella* Enteritidis mutant in chickens. **Brazilian Journal of Microbiology** 52: 419–429. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s42770-020-00399-7>>.

Barrow PA, Huggins MB, Lovell MA (1994) Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed *in vivo* primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and immunity**, 62: 4602–4610. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4602-4610.1994>>.

Batista DFA, de Freitas Neto OC, Lopes PD, de Almeida AM, Barrow PA, Berchieri A. (2013) Polymerase Chain Reaction assay based on *ratA* gene allows differentiation between *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum

and Pullorum. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 25: 259-262. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1177/1040638713479361>>.

Batista DFA, Freitas Neto OC, Almeida AM, Maboni G, Carvalho TF, Carvalho TP, Barrow PA, Berchieri Junior A (2018) Evaluation of pathogenicity of *Salmonella* Gallinarum strains harbouring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*. **PLoS ONE** 13: e0200585. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0200585>>.

Belon C, Soscia C, Bernut A, Laubier A, Bleves S, Blanc-Potard AB (2015) A macrophage subversion factor is shared by intracellular and extracellular pathogens. **PLoS Pathogens**, 11: e1004969. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004969>>.

Benevides VP, Rubio MS, Rodrigues Alves LB, Barbosa FO, Souza AIS, Almeida AM, Casas MRT, Guastalli EAL, Soares NM, Berchieri Junior, A (2020) Antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from an egg-producing region in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science** 22: eRBCA-2020-1259. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1259>>.

Berchieri Junior A, Murphy CK, Marston K, Barrow PA (2001) Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology** 30: 221-231. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1080/03079450120054631>>.

Berndt A, Wilhem A, Jugert C, Pieper J, Sachse K, Methner U (2007) Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and immunity**, 75: 5993–6007. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00695-07>>.

Beug H, Kirchbach AV, Döderleina G, Conscience JF, Graf T (1979) Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. **Cell** 18: 375-390. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90057-6](https://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(79)90057-6)>.

Blanc-Potard AB, Groisman EA (1997) The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. **EMBO J** 16: 5376-5385. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.17.5376>>.

Blanc-Potard AB, Lafay B (2003) *MgtC* as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. **Journal of Molecular Evolution** 57: 479–486. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s00239-003-2496-4>>.

Brasil (2011) Diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Ministério da Saúde. In: Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz (Eds.). **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.**

Brasília: Ministério da Saúde p. 60. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-Salmonella-spp-web.pdf>>.

Brenner DJ, Farmer, JJ (2015) Enterobacteriaceae. In: Withman WB (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria** Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, p. 1-24. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222>>.

Brown RAM, Epis MR, Horsham JL, Kabir TD, Richardson KL, Leedman PJ (2018) Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal. **BMC Biotechnology** 18:1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/s12896-018-0421-6>>.

Buchmeier N, Blanc-Potard AB, Ehrt S, Piddington D, Riley L, Groisman EA (2000) A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology** 35: 1375–1382. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01797.x>>.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry** 55: 611-622. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>>.

Buxton A, Allan D (1963) Studies on immunity and pathogenesis of salmonellosis. I. Antigen-antibody reactions on circulating leucocytes of chickens infected with *Salmonella Gallinarum*. **Immunology** 6: 520-529. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1423347>>.

Buxton A, Davies JM (1963) Studies on immunity and pathogenesis of Salmonellosis. II. Antibody production and accumulation of bacterial polysaccharides in the tissues of chickens infected with *Salmonella gallinarum*. **Immunology** 6: 530-538. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1423337>>.

Carter M, Shieh J (2015) Cell Culture Techniques. In: Carter M, Shieh J (Eds.). **Guide to Research Techniques in Neuroscience**. Academic Press, p. 295-310.

Carver T, Thomson, N, Bleasby A, Berriman M, Parkhill J (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. **Bioinformatics** 25:119–120. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn578>>.

Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA (2012) Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics** 28:464-469. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>>.

CDC (2016) **National Salmonella Surveillance Annual Report, 2013**. Atlanta: Centers For Disease Control And Prevention, p. 89.

Celis-Estupiñan, ALP, Batista, DFA, Cardoso, MV, Souza, AIS, Rodrigues Alves, LB, Almeida, AM, Barrow, PA, Berchieri Junior, A (2017) Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil, **Avian Pathology**, 46: 416-425. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1080/03079457.2017.1299922>>.

Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P (2009) The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 128:53-9. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.295>>.

Choi E, Choi S, Nam D, Park S, Han Y, Lee J, Lee E (2017a) Elongation factor *P* restricts *Salmonella*'s growth by controlling translation of Mg²⁺ transporter gene during infection. **Scientific Reports** 7: 1-10. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/srep42098>>.

Choi E, Han Y, Cho YJ, Nam D, Lee EJ (2017b) A trans-acting leader RNA from a *Salmonella* virulence gene. **PNAS**, 114: 10232-10237. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1705437114>>.

Choi S, Choi E, Cho Y, Nam D, Lee J, Lee E (2019) The *Salmonella* virulence protein *MgtC* promotes phosphate uptake inside macrophages. **Nature Communications** 10: 3326. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11318-2>>.

Clements M, Eriksson S, Tezcan-Merdol D, Hinton JC, Rhen M (2001) Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. **Annals of Medicine** 33: 178-185. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3109/07853890109002075>>.

Cunrath O, Bumann D (2019) Host resistance factor SLC11A1 restricts *Salmonella* growth through magnesium deprivation. **Science** 366: 995-999. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1126/science.aax7898>>.

Daniel WW, Cross CL (Eds.) (2013) **Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences**. New York: John Wiley & Sons, 960p.

Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97: 6640-6645. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>>.

De Boever S, Vangestel C, De Backer P, Croubels S, Sys SU (2008) Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 122: 312-317. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.12.002>>.

De Paiva JB, Sterzo EV, Ribeiro SA, Pereira EA, Berchieri Junior A (2006) Isolamento de *Salmonella*: comparação das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento direto de amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas. **Arquivos do Instituto Biológico** 73: 263-269. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v73_3/paiva.pdf>.

Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology** 47: 103-118. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x>>.

Ernest RK, Guina T, Miller SI (1999) How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. **Journal of Infectious Diseases** 179: S326-S330. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1086/513850>>.

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

Foster JW, Hall HK (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology** 172: 771-778. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/jb.172.2.771-778.1990>>.

Freitas Neto OC, Arroyave W, Alessi AC, Fagliari JJ, Berchieri Junior A (2007) Infection of commercial laying hens with *Salmonella Gallinarum*: clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science** 9: 133-141. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2007000200010>>.

Freitas Neto OC, Penha Filho RAC, Barrow P, Berchieri Junior (2010) Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science** 12: 1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2010000100001>>.

Freitas Neto OC, Setta A, Imre A, Bukovinski A, Elazomi A, Kaiser P, Berchieri Junior A, Barrow P, Jones M (2013) A flagellated motile *Salmonella Gallinarum* mutant (SG Fla⁺) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. **Veterinary Microbiology** 164: 425-433. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.015>>.

Freitas Neto OC, Penha Filho RAC, 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.

Galán JE (2001) *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 17:53-86. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.53>>.

Garai P, Berry L, Moussouni M, Bleves S, Blanc-Potard AB (2019) Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by *mgtC* and *oprF* mutants. **PLoS Pathogens** 15: e1007812. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812>>.

Garcia KO, Berchieri Junior A, Santana AM, Freitas Neto OC, Fagliari JJ (2009) Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* serovar Gallinarum strain: Leukogram and serum acute-phase protein concentrations. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 11: 263-267. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2009000400008>>.

Garcia KO, Berchieri Junior A, Santana AM, Alarcon MFF, Freitas Neto OC, Fagliari JJ (2013) Experimental infection of commercial layers with wild or attenuated *Salmonella* Gallinarum mutante strains: anatomic pathology, total blood cell count and serum protein levels. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 15: 91-104. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2013000200004>>.

Gogoi M, Shreenivas MM, Chakravorty D (2019) Hoodwinking the big-eater to prosper: the *Salmonella*-macrophage paradigm. **Journal of Innate Immunity** 11: 289-299. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1159/000490953>>.

Gondwe EN, Molyneux ME, Goodall M, Graham SM, Mastroeni P, Dayson MT, MacLennan CA (2010) Importance of antibody and complement for oxidative burst and killing of invasive nontyphoidal *Salmonella* by blood cells in Africans. **PNAS** 107: 3070-3075. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.0910497107>>.

Grabenstein JP, Fukuto HS, Palmer LE, Bliska JB (2006) Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. **Infection and immunity** 74: 3727-3741. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00255-06>>.

Green AM, DiFazio R, Flynn JL (2013) IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of immunology**, 190: 270-277. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200061>>.

Grimont PAD, Grimont F, Bouvet, P (2000) Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: Wray C, Wray A. (Eds.) **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, p. 1-17.

Grimont PAD, Weill FX (Eds.) (2007) **Antigenic formulae of the Salmonella serovars**. Paris: Institut Pasteur, 166p.

Groisman EA, Hollands K, Kriner MA, Lee EJ, Park SY (2013) Bacterial Mg²⁺ homeostasis, transport, and virulence. **Annual Reviews of Genetics** 47: 625-646. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-051313-051025>>.

Günzel D, Kucharski LM, Kehres DG, Romero MF, Maguire ME (2006) The *MgtC* virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates Na(+),K(+)-ATPase. **Journal of Bacteriology**, 188: 5586-5594. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/JB.00296-06>>.

Harvey PC, Watson M, Hulme S, Jones MA, Lovell M, Berchieri Junior A, Young J, Bumstead N, Barrow PA. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonizing the

lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes. **Infection and Immunity** 79: 4105-4121. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.01390-10>>.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology** 8: R19. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>>.

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

Hu J, Bumstead N, Burke D, Ponce de León FA, Skamene E, Gros P, Malo D (1995). Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) in chicken. **Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society**, 6: 809–815. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00539010>>.

Huang K, Wang D, Frederiksen RF, Rensing C, Olsen JE, Fresno AH (2017) Investigation of the Role of Genes Encoding Zinc Exporters zntA, zitB, and fieF during *Salmonella* Typhimurium Infection. **Frontiers in Microbiology** 8: 1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02656>>.

Huang K, Fresno AH, Thøfner I, Skov S, Olsen JE (2019). Interaction-differences of the avian host-specific *Salmonella* serovar Gallinarum, the host-generalist *S. Typhimurium*, and the cattle host-adapted *S. Dublin* with chicken primary macrophage. **Infection and Immunity** 87: e00552-19. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00552-19>>.

Imre A, Bukovinszki A, Lovell MA, Li Hongying L, Zhou X, Barrow PA (2013) Gene expression analysis of *Salmonella* enterica SPI in macrophages indicates differences between serovars that induce systemic disease from those normally causing enteritis. **Veterinary Microbiology** 167: 675-679. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.034>>.

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

Ito K, Akiyama Y (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. **Annual Review of Microbiology** 59: 211–231. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121316>>.

Jones MA, Wigley P, Page KL, Julme SD, Barrow PA (2001) *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the SPI 2 type III secretion system but not the SPI 1 type III secretion system for virulence in chickens. **Infection and Immunity** 69: 5471-5476. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.9.5471-5476.2001>>.

Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J, Wigley P (2000) Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology** 146: 3217–3226. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1099/00221287-146-12-3217>>.

Kipper D, Carroll LM, Mascitti AK, Streck AF, Fonseca ASK, Ikuta N, Lunge VR (2020) Genomic characterization of *Salmonella* Minnesota clonal lineages associated with poultry production in Brazil. **Animals (Basel)** 10: 2043. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3390/ani10112043>>.

Kuo CH, Ochman H (2010) The extinction dynamics of bacterial pseudogenes. **PLoS Genetics** 6: e1001050. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001050>>.

Lambert WV, Knox CW (1932) Selection for resistance to fowl typhoid in the chicken with reference to its inheritance. **Research Bulletin** 12: 153.

Lapaque N, Walzer T, Meresse S, Vivier E, Trowsdale J (2009) Interactions between human NK cells and macrophages in response to *Salmonella* infection. **Journal of Immunology** 182: 4339–4348. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803329>>.

Lavigne JP, O'Callaghan D, Blanc-Potard AB (2005) Requirement of *MgtC* for *Brucella suis* intramacrophage growth: a potential mechanism shared by *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* for adaptation to a low-Mg²⁺ environment. **Infection and Immunity** 73: 3160–3163. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.5.3160-3163.2005>>.

Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, Monack DM (2006) Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. **PLoS Pathogens** 2: e11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020011>>.

Lee EJ, Groisman EA (2010) An antisense RNA that governs the expression kinetics of a multifunctional virulence gene. **Molecular Microbiology**, 76: 1020–1033. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07161.x>>.

Lee EJ, Groisman EA (2012a) Control of a *Salmonella* virulence locus by an ATP-sensing leader messenger RNA. **Nature** 486: 271–275. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/nature11090>>.

Lee EJ, Groisman EA (2012b) Tandem attenuators control expression of the *Salmonella mgtCBR* virulence operon. **Molecular Microbiology** 86: 212–224. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08188.x>>.

Lee EJ, Choi J, Groisman EA (2014) Control of a *Salmonella* virulence operon by proline-charged tRNA^(Pro). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, 3140–3145. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1316209111>>.

Lee EJ, Pontes MH, Groisman EA (2013) A Bacterial Virulence Protein Promotes Pathogenicity by Inhibiting the Bacterium's Own F1Fo ATP Synthase. **Cell** 154: 146-156. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.004>>.

Lee JW, Lee EJ (2015) Regulation and function of the *Salmonella* MgtC virulence protein. **Journal of Microbiology** 53: 667-672. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s12275-015-5283-1>>.

Li S, Zhang Z, Pace L, Lillehoj H, Zhang S (2009) Functions exerted by the virulence-associated type-three secretion systems during *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion into and survival within chicken oviduct epithelial cells and macrophages. **Avian Pathology**. 38: 97–106. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1080/03079450902737771>>.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods** 25: 402–408. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>>.

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

Lopez-Medina M, Perez-Lopez A, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V (2014) *Salmonella* modulates B cell biology to evade CD8⁺ T cell-mediated immune responses. **Frontiers in Immunology** 5: 1-9. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00586>>.

Lu YJ, Barreira-Silva P, Boyce S, Powers J, Cavallo K, Behar SM (2021) CD4 T cell help prevents CD8 T cell exhaustion and promotes control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Cell reports**, 36: 109696. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109696>>.

Luu RA, Gurnani K, Dudani R, Kammara R, van Faassen H, Sirard JC, Krishnan L, Sad S (2006) Delayed expansion and contraction of CD8⁺ T cell response during infection with virulent *Salmonella* Typhimurium. **The Journal of Immunology** 177: 1516–25. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1516>>.

Machin D, Cheung YB, Parmar M (Eds.) (2006) **Survival Analysis: A Practical Approach**. Wiley, 278p.

Malkwitz I, Berndt A, Dauschies A, Bangoura B (2018) Characterisation of susceptibility of chicken macrophages to infection with *Toxoplasma gondii* of type II and III strains. **Experimental Parasitology**, 187: 22-29. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.003>>.

Maloney KE, Valvano MA (2006) The *mgtC* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in

macrophages. **Infection and Immunity** 74: 5477–5486. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00798-06>>.

Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection** 2: 145-156. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00273-2](https://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2)>.

Mariani P, Barrow PA, Cheng HH, Groenen MA, Negrini R, Nat Bumstead (2001) Localization to chicken Chromosome 5 of a novel locus determining salmonellosis resistance. **Immunogenetics** 53: 786–791. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s00251-001-0387-7>>.

Marmur, J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Microbiology** 3:208-218. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8)>.

Martin-Orozco N, Touret N, Zaharik ML, Park E, Kopelman R, Miller S, Finlay BB, Gros P, Grinstein S (2006) Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, 17: 498–510. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1096>>.

Mastroeni P, Grant AJ (2011) Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. **Expert Reviews in Molecular Medicine** 13: e12. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S1462399411001840>>.

Medvedev AE, Sabroe I, Hasday JD, Vogel SN (2006) Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. **Journal of Endotoxin Research**, 12: 133-150. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1179/096805106X102255>>.

Menck K, Behme D, Pantke M, Reiling N, Binder C, Pukrop T, Klemm F (2014) Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated cell culture bags. **Journal of Visualized Experiments** 91: e51554. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3791/51554>>.

Métris A, Sudhakar P, Fazekas D, Demeter A, Ari E, Olbei M, Branchu P, Kingsley RA, Baranyi J, Korcsmáros T (2017) SalmoNet, an integrated network of ten *Salmonella enterica* strains reveals common and distinct pathways to host adaptation **NPJ Systems Biology and Applications** 3: 31. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/s41540-017-0034-z>>.

Miranda-CasoLuengo AA, Kary SC, Erhardt M, Kröger C. Small RNA, Big Effect: Control of Flagellin Production (2017) **Trends in Microbiology**, 25: 953-954. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.003>>.

Moncrief MB, Maguire ME (1998) Magnesium and the role of *MgtC* in growth of *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity** 66: 3802-3809. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.66.8.3802-3809.1998>>.

Motulsky HJ (2022a) Normality (and lognormality) tests. **GraphPad Statistics Guide**. Disponível em: <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_normality_tests.htm>.

Motulsky HJ (2022b) Bonferroni and Sidak methods. **GraphPad Statistics Guide**. Disponível em: <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_the_method_of_bonferroni.htm>.

Moussouni M, Nogaret P, Garai P, Ize B, Vivès E, Blanc-Potard AB (2019) Activity of a synthetic peptide targeting *MgtC* on *Pseudomonas aeruginosa* intramacrophage survival and biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 9: 1-10. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00084>>.

Ochman H, Wilson AC (1987) Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. **Journal of Molecular Evolution** 26:74-86.

OIE (2021) **World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface: Disease Information**. World Organisation for Animal Health. Disponível em: <https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail>.

Oliveira GH, Berchieri Junior A, Fernandes AC (2005) Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology** 36: 51-56. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000100011>>.

Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Casadesús J, Rosenkrantz JT, Chadfield MS, Thomsen LE (2013) The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar S. Typhimurium. **BMC Microbiology** 13: 1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-13-67>>.

Owen KA, Meyer CB, Bouton AH, Casanova JE (2014) Activation of Focal Adhesion Kinase by *Salmonella* Suppresses Autophagy via an Akt-mTOR Signaling Pathway and Promotes Bacterial Survival in Macrophages. **PLoS Pathogens** 10: e1004159. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004159>>.

Owen KA, Anderson CJ, Casanova JE (2016) *Salmonella* Suppresses the TRIF-Dependent Type I Interferon response in macrophages. **MBio** 7: e02051-15. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/mBio.02051-15>>.

Park M, Kim H, Nam D, Kweon DH, Shin D (2019) The *mgtCBR* mRNA Leader Secures Growth of *Salmonella* in Both Host and Non-host Environments. **Frontiers in Microbiology** 6: 1-12. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02831>>.

Pati NB, Vishwakarma V, Selvaraj SK, Dash S, Saha B, Singh N, Suar M (2013) *Salmonella* Typhimurium TTSS-2 deficient mig-14 mutant shows attenuation in immunocompromised mice and offers protection against wild-type *Salmonella* Typhimurium infection. **BMC Microbiology** 13: 236. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-236>>.

Patruno A, Fornasari E, Di Stefano A, Cerasa LS, Marinelli L, Baldassarre L, Sozio P, Turkez H, Franceschelli S, Ferrone A, Di Giacomo V, Speranza L, Felaco M, Cacciatore I (2015) Synthesis of a novel cyclic prodrug of S-allyl-glutathione able to attenuate LPS-induced ROS production through the inhibition of MAPK pathways in U937 cells. **Molecular Pharmaceutics** 12: 66-74. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1021/mp500431r>>.

Penha Filho RAC, Diaz SJA, Medina TS, Chang YF, Silva JS, Berchieri Junior (2016) Evaluation of protective immune response against fowl typhoid in chickens vaccinated with the attenuated strain *Salmonella* Gallinarum $\Delta cobS \Delta cbiA$. **Research in Veterinary Science** 107: 220-227. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.06.011>>.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. 29: e45. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>>.

Pfaffl MW (2006) Relative quantification. In: Dorak T (Ed.) **Real Time PCR BIOS Advanced Methods**. New York, Taylor & Francis, p. 63–82.

Pontes MH, Lee EJ, Choi J, Groisman EA (2015a) *Salmonella* promotes virulence by repressing cellulose production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 112: 5183–5188. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1500989112>>.

Pontes MH, Sevostyanova A, Groisman EA (2015b) When too much ATP is bad for protein synthesis. **Journal of Molecular Biology** 427: 2586–2594. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.021>>.

Pontes MH, Yeom J, Groisman EA (2016) Reducing ribosome biosynthesis promotes translation during low Mg^{2+} stress. **Molecular Cell** 64: 480-492. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.008>>.

Popoff MY, Bockmühl J, Brenner FW, Gheesling LL (2001) Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology** 152:907-909. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01274-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01274-8)>.

Poppe C (2000) *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: Wray C, Wray A (Eds.) **Salmonella in Domestic Animals**. UK: CAB International, p. 107-132.

Psifidi A, Russell KM, Matika O, Sánchez-Molano E, Wigley P, Fulton JE, Stevens MP, Fife MS (2018) The Genomic Architecture of Fowl Typhoid Resistance in Commercial Layers. **Frontiers in Genetics** 9: 1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fgene.2018.00519>>.

Pullinger GD, Paulin SM, Charleston B, Watson PR, Bowen AJ, Dziva F, Morgan E, Villarreal-Ramos B, Wallis TS, Stevens MP (2007) 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**, 75: 5191-5199. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00784-07>>.

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, 339: 62-66. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)>.

Ramhøj L, Axelstad M, Svingen T (2019) Validation of endogenous reference genes in rat cerebral cortex for RT-RT-qPCR analyses in developmental toxicity studies. **Peer J**, 7: e7181. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.7717/peerj.7181>>.

Rang C, Alix E, Felix C, Heitz A, Tasse L, Blanc-Potard AB (2007) Dual role of the *MgtC* virulence factor in host and non-host environments. **Molecular Microbiology**, 63: 605-622. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05542.x>>.

Reed LJ, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene** 27: 493-497. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>>.

Retamal P, Castillo-Ruiz M, Mora GC (2009) Characterization of *MgtC*, a virulence factor of *Salmonella* enterica Serovar Typhi. **PLoS One** 4: e5551. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005551>>.

Rodrigues Alves LB (2017) **Patogenicidade de *Salmonella* Gallinarum com deleção dos genes *phoP* e *phoQ* (SG Δ *phoPQ*) em aves comerciais**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal.

Rodrigues Alves LB, Neto OCF, Batista DFA, Barbosa FO, Rubio MS, de Souza AIS, Almeida AM, Barrow PA, Junior AB (2018) Inactivation of *phoPQ* genes attenuates *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum to susceptible chickens. **Brazilian Journal of Microbiology** 49: 601-609. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.006>>.

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

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

Sad S, Dudani R, Gurnani K, Russell M, van Faassen H, Finlay B, Krishnan L (2008) Pathogen proliferation governs the magnitude but compromises the function of CD8 T cells. **The Journal of Immunology** 180: 5853–5861. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5853>>.

Salmonella Subcommittee (1932) The Genus *Salmonella* Lignières, 1900. **The Journal of Hygiene** 34: 333-350.

Sambrook J, Russel DW (2001) **Molecular Cloning**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cap. 6, p. 6.1-6.62.

Setta AM, Barrow PA, Kaiser P, Jones MA (2012) Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases** 35: 397-410. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.03.004>>.

Silva CA, Blondel CJ, Quezada CP, Porwollik S, Andrews-Polymenis HL, Toro CS, Zaldivar M, Contreras I, McClelland M, Santiviago CA (2012) Infection of mice by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involves additional genes that are absent in the genome of serovar Typhimurium. **Infection and Immunity** 80: 839–849. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.05497-11>>.

Smith AL, Beal R (2008) The avian enteric immune system in health and disease. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA (Ed.). **Avian Immunology** Londres: Academic Press, p.243-271.

Smith RL, Kaczmarek MT, Kucharski LM, Maguire ME (1998) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: regulation of *mgtA* and *mgtCB* during invasion of epithelial and macrophage cells. *Microbiology (Reading)* 144: 1835-1843. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1099/00221287-144-7-1835>>.

Srikumar S, Kröger C, Hébrard M, Colgan A, Owen SV, Sivasankaran SK, Cameron AD, Hokamp K, Hinton JC (2015) RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella Typhimurium*. **PLoS Pathogens** 11: e1005262. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005262>>.

Sundaram VK, Sampathkumar NK, Massaad C, Grenier J (2019) Optimal use of statistical methods to validate reference gene stability in longitudinal studies. **PLoS One** 14: e0219440. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0219440>>.

Tang Y, Foster N, Jones MA, Barrow PA (2018) Model of persistent *Salmonella* infection: *Salmonella enterica* serovar Pullorum modulates the immune response of the chicken from a TH17-type response towards a TH2-type response. **Infection and Immunity** 86:e00307-18. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00307-18>>.

Tao T, Snively MD, Farr SG, Maguire ME (1995) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: *mgtA* encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg^{2+} in a manner similar to that of the *mgtB* P-type ATPase. **Journal of Bacteriology**, 177: 2654-2662. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/jb.177.10.2654-2662.1995>>.

Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J (2019) The ultimate RT-qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. **Trends in Biotechnology** 37: 761-774. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>>.

Thompson JA, Liu M, Helaine S, Holden DW (2011) Contribution of the PhoPQ regulon to survival and replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in macrophages. **Microbiology** 157: 2084-2093. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1099/mic.0.048926-0>>.

Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, Barron A, Layton A, Pickard D, Kingsley RA, Bignell A, Clark L, Harris B, Ormond D, Abdellah 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 JA, Maskell D, Humphrey T, Roberts M, Barrow PA, Dougan G, Parkhill J. (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome Research** 18: 1624-1637. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1101/gr.077404.108>>.

Turner AK, Barber LZ, Wigley P, Muhammad S, Jones MA, Lovell MA, Hulme S, Barrow PA. (2003) Contribution of proton-translocating proteins to the virulence of *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Gallinarum, and Dublin in chickens and mice. **Infection and Immunity** 71: 3392-3401. Disponível: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.6.3392-3401.2003>>.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, de Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology** 3: research0034.1. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>>.

Véscovi EG, Soncini FC, Groisman EA (1996) Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. **Cell** 84: 165-174. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81003-X](https://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81003-X)>.

Wang H, Zhang X, Liu Q, Liu X, Ding S (2017) Selection and evaluation of new reference genes for RT-RT-qPCR analysis in *Epinephelus akaara* based on transcriptome data. **PLoS One** 12: e0171646. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0171646>>.

Waterman SR, Holden DW (2003) Functions and effectors of *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. **Cellular Microbiology** 5: 501-511. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00294.x>>.

Wemyss MA, Pearson JS (2019) Host cell death responses to non-typhoidal *Salmonella* infection. **Frontiers in Immunology** 26: 1758. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01758>>.

Wigley P, Hulme SD, Bumstead N, Barrow PA (2002) *In vivo* and *in vitro* studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SAL1 locus. **Microbes and Infection** 4: 1111-1120. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01635-0](https://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01635-0)>.

Wigley P (2004) Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animals. **Research in Veterinary Science** 76:165-169. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00117-6](https://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00117-6)>.

Wigley P, Hulme S, Powers C, Beal R, Smith A, Barrow P (2005) Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. **BMC Veterinary Research**, 1, 2. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-1-2>>.

Wigley P, Hulme S, Rothwell L, Bumstead N, Kaiser P, Barrow PA (2006) Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. **Infection and Immunity**. 74:1425-1430. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.74.2.1425-1430.2006>>.

Wing JP (1968) Transduction by phage P22 in a recombination-deficient mutant of *Salmonella* Typhimurium. **Virology** 36: 271-276. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(68\)90144-x](https://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(68)90144-x)>.

Withanage GS, Wigley P, Kaiser P, Mastroeni P, Brooks H, Powers C, Beal R, Barrow PA, Maskell D, McConnell I (2005) Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. **Infection and Immunity** 73: 5173-5182. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.8.5173-5182.2005>>.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific iniciadores for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics** 13: 134. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>>.

Yeom J, Pontes MH, Choi J, Groisman EA (2018) A protein that controls the onset of a *Salmonella* virulence program. **The EMBO Journal**, 37: e96977. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.15252/embj.201796977>.

Yeom J, Shao Y, Groisman EA (2020) Small proteins regulate *Salmonella* survival inside macrophages by controlling degradation of a magnesium transporter. **PNAS**, 117: 20235–20243. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2006116117>>.

Zancan FB, Berchieri Junior A, Fernandes SA, Gama NMSQ (2000) *Salmonella* spp. investigation in transport box of day old birds. **Brazilian Journal of Microbiology** 31: 230-232. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000300016>>.

Zhang-Barber L, Turner AK, Barrow PA (1999) Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine** 17:2538-2545. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00060-2](https://dx.doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00060-2)>.