

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Relatório Científico (Número do Projeto 4997)

Programa de Pós-doutorado na Unesp-12/2022

Vigência: 01/12/2023 a 01/12/2024

**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**

Pós-Doutorando: Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva

Supervisor: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Jaboticabal

2024

MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA

**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**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e
veterinárias (FCAV), Departamento de
Patologia Reprodução e Saúde Única,
Jaboticabal.

Supervisor(a): Prof. Dr. Angelo Berchieri
Junior

Jaboticabal-SP
2025

APRESENTAÇÃO

Este Relatório Científico refere-se ao Projeto de Pesquisa “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”, que foi realizado junto ao Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP. O relatório contempla as atividades desenvolvidas pelo bolsista Dr. Mauro M. S. Saraiva, sob a supervisão do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior.

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2025.

RESUMO DO PLANO INICIAL

O tifo aviário é uma enfermidade de importância para a avicultura industrial, face aos prejuízos causados por provocar mortalidade do plantel, que podem chegar a 80% ou mais. Dentre as principais medidas de biosseguridade destaca-se o manejo correto no aviário e a adoção de vacinas. O presente estudo visa dar continuidade aos trabalhos anteriores do presente grupo de pesquisa com uma estirpe mutante de *Salmonella Gallinarum* contendo a deleção dos genes *cobS* e *cbiA* que apresentava potencial como candidata vacinal em desafios em aves susceptíveis. Entretanto, nada se sabe como esses mutantes comportam-se no interior de macrófagos de aves. Muitos estudos utilizam de células imortalizadas de aves da linhagem HD-11, entretanto, considerando que a genética das aves comerciais evoluiu nos últimos 50 anos, tornando-se mais produtiva e amadurecendo mais rapidamente, estas células podem não representar, fidedignamente o comportamento real de um macrófago. Assim, objetiva-se a realização da infecção de macrófagos primários de aves, principais células envolvidas na patogênese do tifo aviário, comparando a captura e sobrevivência da estirpe mutante, com a estirpe selvagem. Além disso, serão comparados os resultados obtidos com os de infecção em células semelhantes a macrófagos da linhagem HD-11, fornecendo maiores informações sobre o comportamento dessas bactérias durante a infecção. Ademais, será verificado a expressão gênica diferencial de ambas estirpes, fornecendo maiores informações sobre o comportamento dessas bactérias durante a infecção.

1. Atividades acadêmicas desenvolvidas durante o período

1.1 Artigos científicos publicados em periódicos indexados (a partir de dezembro de 2023)

- [1] PRISCYLLA C. VASCONCELOS, ELMA L. LEITE, **MAURO M. S. SARAIVA**, RAFAELA G. FERRARI, SAMUEL P. CIBULSKI, NUBIA M. V. SILVA, OLIVEIRO C. FREITAS NETO, PATRÍCIA E. N. GIVISIEZ, RAFAEL F. C. VIEIRA, CELSO J. B. OLIVEIRA. Genomic Analysis of a Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 1 Associated with Caprine Mastitis. **Pathogens**, v. 13, p. 23, **2023**. doi.org/10.3390/pathogens13010023.
- [2] MONTE, D.F.M.; **SARAIVA, MM. M. S.**; CABRERA, J.M.A; ALMEIDA, A. M.; FREITAS NETO, O.C.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JUNIOR, A. Unravelling the role of anaerobic metabolism (*pta-ackA*) and virulence (*misL* and *ssa*) genes in *Salmonella* Heidelberg shedding using chicken infection model. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 55, p.1 - 5, **2024**. doi.org/10.1007/s42770-023-01241-6.
- [3] LUCAS B. RODRIGUES ALVES, OLIVEIRO C. FREITAS NETO, **MAURO M. S. SARAIVA**, DANIEL F. M. MONTE, BRUNA N. LIMA, JULIA M. CABRERA, FERNANDA O. BARBOSA, VALDINETE P. BENEVIDES, TÚLIO S. LIMA, ISABELLA C. CAMPOS, MARCELA S. RUBIO, CAMILA F. NASCIMENTO, LETÍCIA C. R. V. ARANTES, VICTÓRIA V. ALVES, ADRIANA M. ALMEIDA, JOHN E. OLSEN, ANGELO BERCHIERI JUNIOR. *mgtC* is non-essential for fowl typhoid pathogenicity in chicken, but its absence slightly delays disease progression. **Genes**, v. 829, p. 147827, **2024**. doi.org/10.1016/j.gene.2023.147827.
- [4] VALDINETE P. BENEVIDES, **MAURO M. S. SARAIVA**, CAMILA F. NASCIMENTO, ENRIQUE J. DELGADO-SUÁREZ, CELSO J. B. OLIVEIRA, SAURA R. SILVA, VITOR F. O. MIRANDA, HENRIK CHRISTENSEN, JOHN E. OLSEN AND ANGELO BERCHIERI JUNIOR. Genomic features and phylogenetic analysis of antimicrobial-resistant *Salmonella* Mbandaka ST413 strains. **Microorganisms**, v. 12, p. 312, **2024**. doi.org/10.3390/microorganisms12020312.
- [5] KARA-LEE AVES, PRISCILA R. GUERRA, ANA H. FRESNO, **MAURO M. S. SARAIVA**, ERIC COX, POUL J. BÆKBO, MORTEN A. NIELSEN, ADAM F. SANDER, JOHN E. OLSEN. A Virus-like Particle-Based F4 Enterotoxigenic *Escherichia coli* Vaccine Is Inhibited by Maternally Derived Antibodies in Piglets but Generates Robust Responses in Sows. **Pathogens**, v. 12, p. 1388, **2024**. doi.org/10.3390/pathogens12121388.

- [6] CAMPOS, I.C.; **SARAIVA, M.M.S.**; BENEVIDES, V.P.; FERREIRA, TAÍSA S.; FERREIRA, V.; ALMEIDA, A.M.; BERCHIERI JUNIOR, A. Low temperatures do not impair the bacterial plasmid conjugation on poultry meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, p.1 - 7, **2024**. doi.org/10.1007/s42770-023-01230-9.
- [7] ELMA LIMA LEITE, **MAURO M. S. SARAIVA**, PRISCYLLA C. VASCONCELOS, DANIEL F. M MONTE, MARC W. ALLARD, PATRÍCIA E. N. GIVISIEZ, WONDWOSSEN A. GEBREYES, OLIVEIRO C. FREITAS NETO, CELSO JOSÉ BRUNO DE OLIVEIRA. Whole genome sequence datasets of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul ST50 and serovar Worthington ST592 strains isolated from raw milk in Brazil. **Data in Brief**, v. 53, p. 109965, **2024**. doi.org/10.1016/j.dib.2023.109965.
- [8] DANIEL F. M. MONTE, NARJOL GONZALEZ-ESCALONA, GUOJIE CAO, GEANY TARGINO DE SOUZA PEDROSA, **MAURO M. S. SARAIVA**, MARIA BALKEY, QING JIN, ERIC BROWN, MARC ALLARD, TEREZA C. R. M. OLIVEIRA, DUMITRU MACARISIN, MARCIANE MAGNANI. Genomic analysis of a cAmpC (CMY-41)-producing *Citrobacter freundii* ST64 isolated from patient. **Letters Applied Microbiology**, v. 77, p. ovae010, **2024**. doi.org/10.1093/lambio/ovae010.
- [9] **MAURO M. S. SARAIVA**, VALDINETE P. BENEVIDES, PRISCILA R. GUERRA, ISABELLA C. CAMPOS, LUCAS B. RODRIGUES ALVES, JACQUELINE B. PAIVA, LAUANDA M. MUNIZ, ADRIANA M. ALMEIDA, OLIVEIRO C. FREITAS NETO, JOHN E. OLSEN, ANGELO BERCHIERI JUNIOR. Deletions of *ttrA* and *pduA* genes in *Salmonella enterica* affect survival within chicken-derived HD-11 macrophages. **Current Genetics**, v. 70, p. 14, **2024**. doi.org/10.1007/s00294-024-01299-1.
- [10] ISIS M. M. KOLOSOSKI, **MAURO M. S. SARAIVA**, CAMILA F. NASCIMENTO, ISABELLA C. CAMPOS, TÚLIO S. LIMA, VIVIANE A. FERREIRA, ANDRÉ L. C. RABELO, ADRIANA M. ALMEIDA, ANGELO BERCHIERI JUNIOR. Competitive exclusion products as an antimicrobial alternative to control *Salmonella* Heidelberg in broilers. **Letters in Applied Microbiology**, v. 77, p. ovae071, **2024**. doi.org/10.1093/lambio/ovae071.
- [11] VIVIANE A. FERREIRA, **MAURO M. S. SARAIVA**, ISABELLA C. CAMPOS, MARIANA P. S. SILVA, VALDINETE P. BENEVIDES, ADRIANA M. ALMEIDA, THAIS A. CODOGNOTO, CAMILA F. NASCIMENTO, TÚLIO S. LIMA, LUCAS B. RODRIGUES ALVES, ANGELO BERCHIERI JUNIOR. In vitro conjugation of IncB/O-plasmid: Minimum inhibitory concentration of β -lactams increases 16-fold in *Salmonella*

- enterica* compared with *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 193, p. 106788, **2024**. doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106788.
- [12] CAMPOS, I.C., VILELA, F. P., **SARAIVA, M.M.S.**, BERCHIERI JUNIOR, A, FALCÃO, J. P. Insights into the global genomic features of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. **Journal of Applied Microbiology**, v. 135, p. lxae217, **2024**. doi.org/10.1093/jambio/lxae217.
- [13] VIVIANE A. FERREIRA, **MAURO M. S. SARAIVA**, TÚLIO S. LIMA, CAMILA F. NASCIMENTO, GIOVANNA B. C. PASCHONE, ANDRÉ L. C. RABELO, OLIVEIRO C. FREITAS NETO, PAUL A. BARROW, ANGELO BERCHIERI JUNIOR. A double *ttrA* and *pduA* knock-out mutant of *Salmonella* Typhimurium is not attenuated for mice (*Mus musculus*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 4177-4182, **2024**. doi.org/10.1007/s42770-024-01533-5.

1.2 Artigos científicos submetidos para publicação em periódicos indexados no período

- [1] MOURA, G. S., **SARAIVA, M. M. S.**, STIPP, D. T., GEBREYES, W. A., OLIVEIRA, C. J. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 causing severe mastitis in a meat sheep herd in the United States. - just-accepted - (Manuscrito submetido à *American Journal of Veterinary Research* - AJVR-24-05-0137.R1).
- [2] CESAR A. ROQUE-BORDA, LAURA M. D. G. PRIMO, KAILA P. MEDINA-ALARCÓN, ISABELLA C. CAMPOS, CAMILA F. NASCIMENTO, **MAURO M. S. SARAIVA**, ANGELO BERCHIERI JUNIOR, ANA M. FUSCO-ALMEIDA, MARIA JOSÉ S. MENDES-GIANNINI, JOÃO PERDIGÃO, FERNANDO R. PAVAN, FERNANDO ALBERICIO. Antimicrobial Peptides: A Promising Alternative to Conventional Antimicrobials for Combating Polymicrobial Biofilms. - just-accepted - (Manuscrito submetido à *Advanced Science* - S-24-13093).
- [3] KARA L. AVES, ANA H. FRESNO, SAJID NISAR, **MAURO M. S. SARAIVA**, NICOLE B. GOECKE, ADAM F. SANDER, MORTEN A. NIELSEN, JOHN E. OLSEN, PRISCILA R. GUERRA. Outer Membrane Proteins as Vaccine Targets Against *Lawsonia intracellularis* in Piglets. - just-accepted - (Manuscrito submetido à *Vaccines* - vaccines-3383678).
- [4] HEITOR L. S. RODRIGUES, ISIS M. M. KOLOSOSKI, VALDINETE P. BENEVIDES, **MAURO M. S. SARAIVA**, ANGELO BERCHIERI JUNIOR. Essential oils used in the poultry industry: would it be an effective green alternative against *Salmonella* spp. dissemination and antimicrobial resistance? - just-accepted - (Manuscrito submetido à *The Microbe* - MICROB-S-24-00541-R1).
- [5] TÚLIO S. LIMA, **MAURO M. S. SARAIVA**, ADRIANA M. ALMEIDA, TAÍSA S. FERREIRA, LUCAS B. RODRIGUES ALVES, VIVIANE A. FERREIRA, OLIVEIRO C. FREITAS NETO, PAUL A. BARROW, ANGELO BERCHIERI JUNIOR. Deletion of *ttrA* and *pduA* genes in *Salmonella enterica* serovars induces a comparable immune response to wild-type infection in different chicken lineages. - just-accepted - (Manuscrito submetido à *Avian Pathology* - CAVP-2024-0128).
- [6] VALDINETE P. BENEVIDES, **MAURO M. S. SARAIVA**, ISABELLA C. CAMPOS, PRISCILA R. GUERRA, SAURA R. SILVA, VITOR F. O. MIRANDA, ADRIANA M.

ALMEIDA, HENRIK CHRISTENSEN, JOHN E. OLSEN, ANGELO BERCHIERI JUNIOR. *Salmonella* Heidelberg isolates from poultry in Brazil and the United States share a large number of resistance and virulence determinants. (Manuscrito submetido à *Microbial Pathogenesis* - YMPAT-D-25-00300).

- [7] VALDINETE P. BENEVIDES, **MAURO M. S. SARAIVA**, VIVIANE A. FERREIRA, MICHELLI INÁCIO G. FUNNICELLI, LUCAS B. RODRIGUES ALVES, ADRIANA M. ALMEIDA, HENRIK CHRISTENSEN, JOHN E. OLSEN, ANGELO BERCHIERI JUNIOR. Unveiling the genomic landscape of understudied *Salmonella enterica* serovars from poultry and human: Implications for food safety. (Manuscrito submetido à *Microbial Pathogenesis* - CMIC-D-24-01892R1).

1.3 Atividades de atualização (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra, Participação em eventos, Programa de rádio ou TV/Entrevista)

Participação em bancas (monografia, dissertação e tese) no período

- a. FREITAS NETO, O. C.; OLIVEIRA, C. J. B.; **SARAIVA, M. M. S.** Participação em banca de Letícia Cury Rocha Veloso Arantes. Relação de genes que codificam proteínas anti-inflamatórias na infecção persistente de *Salmonella Pullorum* em *Gallus gallus domesticus*. **2024**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- b. OLIVEIRA, C. J. B.; **SARAIVA, M. M. S.**; MONTE, D. F. M. Participação em banca de Laiorayne Araújo de Lima. Amostragem de águas superficiais usando suabe de *moore* modificado: efeito do uso de triplicatas na frequência e diversidade de sorovares de *Salmonella enterica*. **2024**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba.
- c. OLIVEIRA, C. J. B.; MONTE, D. F. M.; OLIVEIRA JR., C. A.; FREITAS NETO, O. C.; **SARAIVA, M. M. S.** Participação em banca de Alan Douglas de Lima Rocha. *Salmonella enterica* em corpos d'água no Estado da Paraíba sob impacto agropecuário: métodos de detecção, diversidade de sorotipos e fatores de risco associados à contaminação. **2023**. Qualificação (Doutorando em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba.

Aulas ministradas [auxílio ao supervisor nas disciplinas de graduação e pós-graduação (Carga horária: 2h/aula)]

- a. **SARAIVA, M.M.S.** Métodos moleculares para diagnóstico e estudos epidemiológicos. Disciplina de Salmoneloses em animais de produção, Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e Microbiologia Agropecuária, **2024**.
- b. **SARAIVA, M.M.S.** Antimicrobianos: uso responsável e métodos de detecção. Disciplina de Salmoneloses em animais de produção, Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e Microbiologia Agropecuária, **2024**.

Apresentação de trabalhos em eventos científicos nacionais

- a. **Mauro M. S. Saraiva**, Valdinete P. Benevides, Isabella C. Campos, Lucas B. Rodrigues Alves, Tulio S. Lima, Angelo Berchieri Júnior. Perfil de resistência e genes de virulência em *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum oriundas de aves de postura comercial. In: XXI Congresso APA – Produção e comercialização de ovos | 11-14 Março 2024 | **APA, 2024**, Ribeirão Preto.

- b. Isabella C. Campos, Felipe P. Vilela, **Mauro M. S. Saraiva**, Angelo Berchieri Júnior, Juliana P. Falcão. Análise genômica global de sequências de profagos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum de importância para avicultura de postura. In: XXI Congresso APA – Produção e comercialização de ovos | 11-14 Março 2024 | **APA, 2024**, Ribeirão Preto.
- c. Giovanna B. C. Paschone, Camila F. Nascimento, Mariana P. S. Silva, Romário A. Rodrigues, Marita V. Cradozo, **Mauro M. S. Saraiva**, Angelo Berchieri Júnior. Estirpes multirresistentes de *Klebsiella* spp. causando infecções sistêmicas em de aves da postura comercial: Um grande risco ao consumidor. In: XXI Congresso APA – Produção e comercialização de ovos | 11-14 Março 2024 | **APA, 2024**, Ribeirão Preto.
- d. Thaís A. Codognoto, Lucas B. Rodrigues Alves, Túlio S. Lima, **Mauro M. S. Saraiva**, Oliveira C. Freitas Neto, Angelo Bercheiri Junior. Avaliação da resposta imune celular de aves susceptíveis desafiadas por *Salmonella* Gallinarum com o gene *mgtC* defeituoso. In: XXI Congresso APA – Produção e comercialização de ovos | 11-14 Março 2024 | **APA, 2024**, Ribeirão Preto.
- e. Viviane A. Ferreira, **Mauro M. S. Saraiva**, I.C. Lucas B. Rodrigues Alves, Oliveira C. Freitas Neto, Valdinete P. Benevides, Túlio S. Lima, Isabella C. Campos, Angelo Bercheiri Junior. Deleção do gene *mgtC* em *Salmonella* Gallinarum resulta em progressão retardada do tifo aviário. In: XXI Congresso APA – Produção e comercialização de ovos | 11-14 Março 2024 | **APA, 2024**, Ribeirão Preto. – **Trabalho Premiado na Seção Sanidade.**
- f. Túlio S. Lima, **Mauro M. S. Saraiva**, Taísa S. Ferreira, Adriana M. Almeida, Viviane A. Ferreira, Angelo Bercheiri Junior. Resposta imune da interleucina-22 desencadeada pela infecção da cepa mutante de *Salmonella* Typhimurium ($\Delta trA pduA$) em diferentes linhagens de poedeiras comerciais. In: XXI Congresso APA – Produção e comercialização de ovos | 11-14 Março 2024 | **APA, 2024**, Ribeirão Preto.
- g. Valdinete P. Benevides, Mauro M. S. Saraiva, Camila F. Nascimento, Enrique J. Delgado-Suárez, Celso J. B. Oliveira, Saura R. Silva, Vitor F. O. Miranda, Henrik Christensen, John E. Olsen, Angelo Berchieri Junior. Alta similaridade entre *Salmonella* Mbandaka ST313 isolada de aves de postura no Brasil e de seres humanos no Reino Unido. In: XXI Congresso APA – Produção e comercialização de ovos | 11-14 Março 2024 | **APA, 2024**, Ribeirão Preto.

Participação em eventos nacionais

- a. Participação no XXI Congresso APA – Produção e comercialização de ovos, ocorrido de 11 a 14 de março de **2024** em Ribeirão Preto, São Paulo.

1.4 Assessoria científica a periódicos (Revisor)

2020 - Atual: Poultry Science

2020 - Atual: Archives in Microbiology

2021 - Atual: Microbial Drug Resistance

2021 - Atual: Animal Production Science
2022 - Atual: The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
2022 - Atual: Veterinary and Animal Science
2022 - Atual: Journal of Consumer Protection and Food Safety
2022 - Atual: Current Pharmaceutical Design
2023 - Atual: Frontiers in Cellular and Infection Microbiology
2023 - Atual: Cogent Food and Agriculture
2024 - Atual: Scientific Reports

Revisor de projeto de fomento

2020 – Atual: Agência de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

2. Objetivos

2.1 Objetivos do projeto proposto

2.1.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar o comportamento das estirpes SG Δ *cobS* Δ *cbiA* durante a infecção de macrófagos primários de aves.

2.1.2 Objetivos Específicos

Caracterizar e analisar comparativamente a capacidade das estirpes SG Δ *cobS* Δ *cbiA* e SG “Wild-Type” de captura e sobrevivência no interior de células semelhantes aos macrófagos de galinhas da linhagem HD11 e macrófagos primários de aves;

Determinar a expressão gênica diferencial das estirpes SG Δ *cobS* Δ *cbiA* e SG “Wild-Type” durante a infecção de macrófagos primários de aves.

3. Realizações no período (01/12/2023 a 01/12/2024)

O presente projeto “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”, originou, até o presente momento, 1 artigo em fase de preparação para submissão à periódicos com seletiva política editorial. Além disso, 2 resumos de resultados oriundos deste projeto, serão apresentados em congresso internacional que o correrá no próximo mês de junho. A descrição dos resumos que serão apresentados consta em Apêndice.

4. Descrição e avaliação do apoio institucional recebido no período

A estrutura física do Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da FCAV/Unesp foi utilizada no desenvolvimento do projeto, por meio dos laboratórios de microbiologia, biologia molecular e biotério/infectório do setor de Ornitopatologia. Além do apoio com a laboratórios, o trabalho vem contando com apoio pessoal especializado, na qual a Técnica Adriana Maria de Almeida, parte integrante do grupo de trabalho do Prof. Angelo Berchieri Junior, auxilia em todos os procedimentos técnico laboratoriais de suporte aos experimentos, *in vivo* e *in vitro*.

5. Plano de atividades para o próximo período

A análise de transcriptoma não foi incluída no presente relatório devido a problemas que tivemos com a *facility*, e, portanto, com a obtenção dos dados referente aos transcritos.

Devido a dificuldade decorrente da padronização da técnica, aliada ao caráter melindroso da obtenção das células (macrófagos primários), o tempo necessário para esta etapa durou mais que o esperado. Ressaltamos que as etapas de infecção celular, extração e encaminhamento para o sequenciamento de RNA mensageiro (mRNA) já foram realizadas. Logo que os dados sejam analisados, os resultados serão incluídos em material para publicação de resumos e artigos científicos.

Quadro 1. Cronograma do plano de atividades do projeto proposto.

Atividades / Ano	1º Semestre	2º Semestre
Revisão de literatura	X	X
Obtenção das células	X	
Ensaio de captura e sobrevivência	X	X
Análise dos dados	X	X
Extração RNA		X
Montagem da biblioteca		X
Sequenciamento (RNAseq)		X
Análises genômicas		X
Redação de Artigos Científico		X

Etapas cumpridas 

Etapas a serem cumpridas 

6. Descrição das atividades desenvolvidas no período

6.1 Ensaio macrófagos primários derivados do sangue periférico de aves

Para o ensaio de macrófagos primários derivados do sangue periférico de aves foram realizados dois pilotos com cinco frangos de corte fornecidos pelo aviário da Unesp/FCAV com 40 dias, com um intervalo de colheita de sangue de 15 dias. Foi realizado suabe cloacal e o replaqueamento a 24h como descrito por Saraiva et al. (2021), confirmando que as aves estavam livres de *Salmonella* spp. Ambos os pilotos tiveram como objetivo estabelecer a quantidade de sangue necessária para obter a concentração desejada de células para que, posteriormente, fosse possível realizar a infecção com as estirpes *Salmonella* Gallinarum 287/91 contendo a deleção dos genes *cobS* e *cbiA* (SG Δ *cobS* Δ *cbiA*) e *S. Gallinarum* 287/91 (SG Wild-Type). Com isso, poderemos ajustar a quantidade exata de aves necessárias ao experimento.

Em relação a colheita de sangue, foram coletados 3,36 mL de sangue periférico/ave no piloto 1, enquanto no piloto 2 foram obtidos 4,5 mL de sangue periférico/ave, totalizando *pools* de sangue de 16,8 mL e 22,5 mL, respectivamente. Isso permitiu mantermos as aves vivas, visto que a quantidade coletada por animal foi menor que a proposta anteriormente, com o intervalo de recuperação dos animais (KELLY; ALWORTH, 2013). O sangue foi depositado em tubos contendo EDTA e, imediatamente, transportados em gelo até o laboratório.

No laboratório, o sangue foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL contendo Tampão Salina Fosfato fórmula Dulbecco (DPBS) (Nova Biotecnologia®, Código: BR30013-05, Brasil) na proporção 1:1 (v/v) e homogeneizado por inversão. Em seguida, essa mistura foi cuidadosamente depositada na superfície de outro tubo já contendo Ficoll-Paque 1.084 (Ficoll®-Paque Premium 1.084, Código - 17544602, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) na proporção 1:1 (v/v), evitando a mistura de ambas as fases, logo após, o conteúdo foi centrifugado a 1200 x g por 40 (aceleração = 1; desaceleração = 0; centrífuga horizontal) (Figura 1).

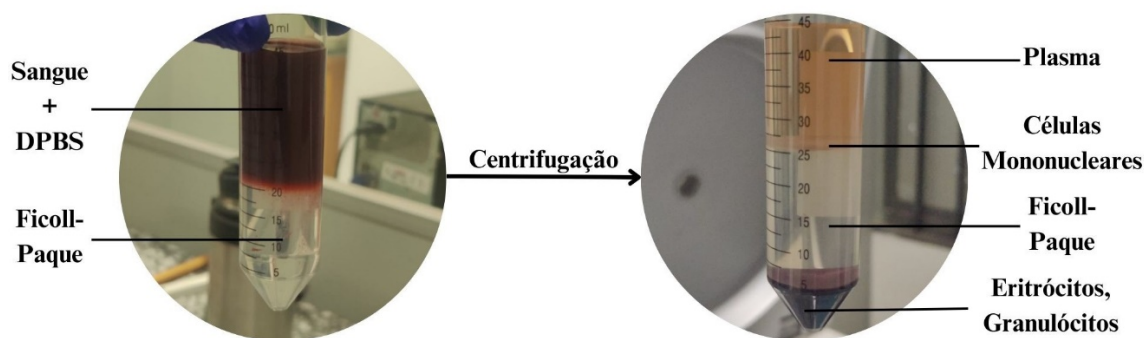


Figura 1. Segregação por meio de centrifugação das células mononucleares do sangue de galinha utilizando-se Ficoll-Paque Premium 1.084 (Arquivo pessoal).

Após a centrifugação, a camada de plasma foi retirada gentilmente e, as células mononucleares foram transferidas para um novo tubo Falcon, sendo obtidos *pools* de 3 e 4 mL, nos pilotos 1 e 2, respectivamente. Em cada *pool* foi adicionado DPBS (1:1), seguido de homogeneização e repetiu-se a etapa com Ficoll-Paque 1.084 com o intuito de reduzir a contaminação por células vermelhas do sangue. Finalmente, as células foram submetidas a três lavagens com DPBS (1:1) a 5000 x g por 8 min e, na última centrifugação, foram ressuspensas em 10 mL de meio Roswell Park Memorial Institute 1640 com GlutaMAX™

(RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™-1, Gibco™, Catálogo nº 61870036, ThermoFisher Scientific, EUA) suplementado com 5 % de soro de galinha inativado (*Chicken Serum – CS – Sterile filtered*, Catálogo nº C5405-500ML, Sigma-Aldrich, EUA), 5% de soro fetal bovino inativado (Nova Biotecnologia®, Código: 10-bio500-i, Brasil) e 25 µg/mL de gentamicina (*Gentamicin* 50 mg/mL, Gibco™, Catálogo nº 15750-037, ThermoFisher Scientific, EUA). Daqui em diante, esse meio suplementado será denominado RPMI-25. Vale ressaltar que todos os meios RPMI foram suplementados com 5 % de soro de galinha inativado e 5 % de soro bovino inativado, variando somente na presença e concentração de gentamicina.

Posteriormente, foi realizado o ajuste da concentração de células, em uma lâmina histológica, foram pipetados 18 µL da suspensão mais 2 µL de azul de tripan 0,4% (Catálogo 15250-061, Gibco™, ThermoFisher Scientific, EUA), o qual permite a visualização de células viáveis ao microscópio, com bordas azuladas e interior sem coloração. Logo após, foram transferidos 10 µL da mistura para uma câmara hemocitométrica coberta por uma laminula e, realizado contagem celular em um microscópio óptico, contabilizando os dois quadrados grandes em diagonal um com o outro, a densidade foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Células por mL (céls/mL)} =$$

$$(\text{nº de células dos dois quadrados grandes em diagonal}) / 2 \times 10000$$

Foi obtida uma concentração de $3,2 \times 10^5$ céls/mL e $1,5 \times 10^6$ céls/mL nos pilotos 1 e 2, respectivamente, sendo que a concentração desejada para a infecção é de 5×10^7 céls/mL, uma vez que o número de células viáveis até o momento da infecção pode reduzir para 5×10^6 céls/mL (RODRIGUES ALVES et al., 2024). Diferentemente das células da linhagem HD11, os macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas não se multiplicam *in vitro* e, portanto, a concentração de células deve ser elevada. Entretanto, por se tratar de testes pilotos e os animais estarem negativos para *Salmonella* spp. prosseguimos para as etapas de preparo para infecção e análise de sobrevivência, com intuito de avaliar, de forma preliminar, o comportamento das células. Assim, foi transferido 1 mL dessa suspensão para cada um dos poços da placa de cultivo celular de 24 poços (TPP® Tissue Culture Plates, Código K12-024, Kasvi, Brasil), incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24h.

No segundo dia, o meio foi cuidadosamente removido com o auxílio de uma pipeta, foi realizada uma lavagem tripla com 1 mL de DPBS e adição de 1 mL de RPMI-25. No terceiro dia foi avaliada a morfologia dos macrófagos, que ainda não estava de acordo (Figura 2A), sendo repostado o meio por 1 mL de RPMI-25 e, novamente, a placa era incubada em estufa nas mesmas condições anteriores por mais 24h. No quarto dia, foi avaliada a morfologia das células e, estavam de acordo (Figura 2B), realizando lavagem tripla dos poços com 1 mL de DPBS, seguido da adição de 1 mL de RPMI sem gentamicina e incubação nas mesmas condições.

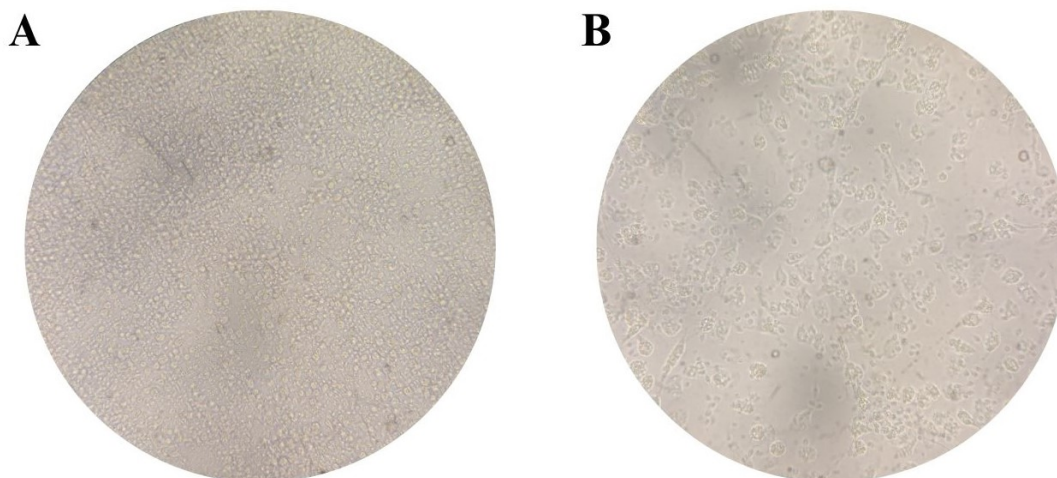


Figura 2. Cultivo de macrófagos derivados do sangue periférico de aves (objetiva 40x). (A) Morfologia arredondada das células no terceiro dia de cultivo, sendo apenas repostado o meio. (B) Morfologia celular alongada no quarto dia de cultivo, iniciando o preparo para infecção.

No que diz respeito ao ajuste da suspensão bacteriana, três dias previamente a infecção, ambas estirpes armazenadas no ultrafreezer -80°C foram inoculadas em 10 mL de caldo Lisogenia (LB) (DifcoTM, Código: 240230, EUA), incubado sob agitação de 180 rpm a 37°C por 18h. No dia seguinte, as culturas foram plaqueadas por esgotamento em ágar LB (Sigma-Aldrich®, Código: L2897, EUA), seguido de incubação a 37°C por 24h. Posteriormente, foi transferido 1 colônia para um novo caldo LB incubado sob agitação de 180 rpm a 37°C por 18h. No dia da infecção, 0,5 mL dessa cultura *overnight* foi transferido para 9,5 mL de caldo LB e incubado nas mesmas condições por 4h. Durante esse período, o meio dos poços da placa de cultivo celular era removido, seguido de adição de 900 μL de RPMI sem gentamicina e incubação nas mesmas condições.

Os inóculos bacterianos, após 4h, foram centrifugados a $5000 \times g$ (aceleração = 9 e desaceleração = 9) por 5 min, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspensionado em 10 mL de DPBS com 20% de soro de galinha inativado e incubado estaticamente a 37°C por 45 min a fim de opsonizar a bactéria, facilitando a posterior captura pelo macrófago. O ajuste da concentração bacteriana foi realizado com RPMI sem gentamicina, respeitando uma multiplicidade de infecção de 10:1 (bactéria:célula) de acordo com a concentração de células obtida em cada um dos testes piloto. A concentração da cultura bacteriana de 4h foi previamente determinada por meio de diluição seriada decimal seguida de contagem bacteriana, obtendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e $3,5 \times 10^8$ UFC/mL para as estirpes SG Wild-Type e SG $\Delta\text{cobS}\Delta\text{cbiA}$, respectivamente.

Foram adicionados 100 μL da suspensão bacteriana ajustada nos poços da placa de cultivo celular e, esta foi centrifugada a $455,59 \times g$ por 5 min (aceleração = 1 e desaceleração = 0), com o objetivo de favorecer o contato bactéria-célula. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 por 30 min e, em seguida, o meio foi removido e foi adicionado 1 mL de RPMI contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina com o intuito de eliminar as bactérias presentes no meio extracelular, ou seja, que não foram fagocitadas pelos macrófagos. Após 30 min, foi realizada a remoção do meio, lavagem tripla dos poços com NaCl 0,9%, adição de 1 mL de RPMI-25 e as placas foram mantidas em estufa por 20h com o objetivo de avaliar a sobrevivência intracelular da bactéria.

Posteriormente, foi realizada lavagem tripla dos poços com NaCl 0,9%, adição de 1 mL de Triton-X 100 (Nova Biotecnologia®, Código: 13-1315-05, Brasil) a 0,1% seguido de raspagem dos poços com ponteira estéril, diluição seriada decimal e contagem bacteriana em ágar LB. Entretanto, ambos pilotos não apresentaram contagem bacteriana, o que possivelmente está associado a baixa concentração de células obtida, e, portanto, baixo número de células viáveis. Neste piloto foi evidenciando a necessidade de trabalharmos com um N amostral otimizado, que permita obtermos uma maior concentração de células sem a necessidade de eutanásia.

6.2 Ensaio macrófagos linhagem HD11

A aquisição das células foi realizada em 28 de maio de 2024 por meio de uma compra com o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), devido a impossibilidade de obtê-las por doação de outros laboratórios. Após o recebimento, as células foram avaliadas quanto a morfologia e adesão, que estavam de acordo, e a cloração do meio, este se apresentou

translúcido, sendo armazenadas em estufa a 37°C com CO₂ a 5% por 1h30. Logo após, foram submetidas a duas lavagens com DPBS e, na segunda lavagem, com o auxílio de um raspador de células foram destacadas do fundo da garrafa de cultivo celular, transferindo a suspensão para um Falcon de 50 mL e centrifugadas a 5000 x g por 8 min (aceleração = 1 e desaceleração = 1). Em seguida, foi descartado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 3 mL de RPMI-25 e o meio completado para 30 mL de RPMI-25, para, posteriormente, ser transferido para uma garrafa de cultivo celular de 75 cm² (BioNaky®, Código: FCC75CF, Brasil), armazenada em estufa a 37°C com CO₂ a 5%.

Diariamente foi analisada a morfologia das células, realizando a troca de meio a cada 48h. Ao atingirem uma confluência de 80% (Figura 3), foram realizadas lavagens duplas com DPBS, sendo que na última lavagem foi destacada a monocamada de células com o auxílio de um raspador estéril. A suspensão foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada a 5000 x g por 8 min, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensão no meio de congelamento. O meio de congelamento é composto de 70% de RPMI, 20% de soro fetal bovino inativado e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®, Código: D2650, EUA) sendo filtrado com seringa. Em seguida, foi distribuído 1 mL de criotubos devidamente identificados que foram armazenados a -80°C em um *freezing container* (Corning® CoolCell® LX, Cell Freezing Container, Código: CLS432001-1EA, EUA) por 24h e, posteriormente, transferidos para o nitrogênio líquido.

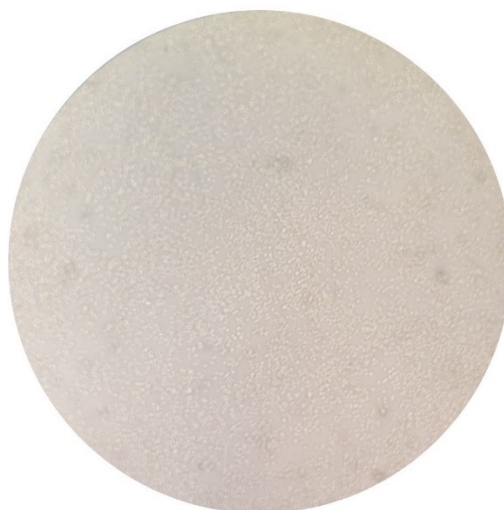


Figura 3. Macrófagos da linhagem HD11 ocupando 80% da área da garrafa de cultivo celular, isto é, apresentando uma confluência de 80%.

6.3 Avaliação da sobrevivência intramacrófagos de estirpes de *Salmonella Gallinarum* contendo deleções dos genes *cobS* and *cbiA*

As atividades envolvidas com esta etapa, bem como seus resultados, encontram-se no subtópico 6.6 deste relatório (Artigo em preparação para submissão).

Manuscrito a ser submetido à *Microbial Pathogenesis* (IF 3.3)

Short Communication

***Salmonella Gallinarum* with *cobS* and *cbiA* defective genes increases survival within the infection of primary chicken macrophage**

Isabella C. Campos^{a†}, Mauro M. S. Saraiva^{a†*}, Túlio Spina de Lima^a, Valdinete P. Benevides^a, Adriana M. Almeida^a, Angelo Berchieri Junior^a

^aSao Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil.

[†]Isabella C. Campos and Mauro M. S. Saraiva contributed equally to this manuscript.

Author's Orcid

Isabella C. Campos - 0000-0002-9384-6085

Mauro M. S. Saraiva - 0000-0003-1875-4495

Túlio Spina de Lima - 0000-0001-8867-6344

Valdinete P. Benevides - 0000-0002-7552-1607

Adriana M. Almeida - 0000-0002-7264-1734

Angelo Berchieri Junior - 0000-0003-2522-6500

***Corresponding author:** Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva, saraiva_ufba@hotmail.com; mauro.saraiva@unesp.br. Laboratory of Avian Pathology from the Department of Pathology, Reproduction, and One Health of the Faculty of Agricultural and Veterinary Science at São Paulo State University. Zip Code: 14884-900.

Abstract

Fowl typhoid is an important systemic disease in poultry of all ages caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum). In anaerobiosis, this bacterium codifies the operons *cob* and *cbi*, promoting cobalamin synthesis, an important cofactor during processes such as ethanolamine and 1,2-propanediol metabolism. During *Salmonella* pathogenesis, the host's innate immune system plays an important role, especially the macrophages. The present work compared the capture and survival after 2-, 4-, and 20-hours post-infection (hpi) of *Salmonella* Gallinarum 287/91 containing the *cobS* and *cbiA* defective genes (SGΔ*cobS*Δ*cbiA*) with the wild-type strain during HD-11 cell line and chicken primary macrophage infection. In the assays, primary macrophage cells present more precision and fidelity of the real infection, with the 2-, 4-, and 20-hpi significant difference, than the HD-11 cell line, which presented no difference at any time. Furthermore, the SGΔ*cobS*Δ*cbiA* had an increased survival rate than the wild-type strain. Chickens' primary macrophages can be an efficient alternative to *in vivo* model experiments.

Key-words: cell culture; cell line HD-11; cobalamin; fowl-typhoid; primary macrophage; salmonellosis; systemic infection

Introduction

Vitamin B₁₂, also known as cobalamin, is a cofactor during important processes such as methionine biosynthesis, ethanolamine, and 1,2-propanediol metabolisms, which are important for bacteria's anaerobic respiration [1–3]. *Salmonella enterica* synthesizes *de novo* cobalamin, under anaerobic growth conditions [4], which is a complex process involving a great variety of genes [5]: the expression of *cbi* operon, related to coring ring synthesis, following of expression of *cob* operon (nucleotide loop assembly) [6].

The *cbiA* gene codifies the first glutamine aminotransferase as well as represses *cob* operon expression [7]; on the other hand, the *cobS* gene participates at the end of the

biosynthesis process [8]. Therefore, the inoperativeness of both genes is suggestive of the impossibility of production of any forms of cobalamin (Adenosyl-, Cyano-, Methyl- or Hydroxy-B12) [7]. However, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum - SG) lost the ability to synthesize cobalamin due to pseudogene formation [4,9].

Salmonella Gallinarum is the causative agent of fowl typhoid, an acute systemic disease with high mortality in chickens of all ages, and it is of utmost importance in poultry production [10]. During the pathogenesis of SG, there is little intestinal colonization and inflammation; the bacterium invades the intestinal epithelium and is phagocytosed by macrophages, the main cells for disease progression [11,12]. After phagocytosis, there is a formation of the *Salmonella*-containing vacuole (SCV), which allows the bacterium to evade immune response, especially through the expression of genes in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) [13]. The SCV immediately translocates to lymphoid organs such as the spleen and liver, establishing a systemic infection [14].

Previous studies with brown laying hens infected with *Salmonella* Gallinarum 287/91 containing the defective genes *cobS* and *cbiA* demonstrated the potential of this strain as a vaccine candidate since there was no mortality and promoted an adaptative immune response [15–17]. However, the reason for the attenuation remains unknown, and most reports about this molecule formation were published at least ten years ago and have not been revisited. Therefore, our study aimed to evaluate the capture and survival of the attenuated mutant strain SGΔ*cobS*Δ*cbiA* during infection of chicken-derived macrophage-like cell line HD-11 and chicken primary macrophage as well.

Materials and Methods

Bacterial strains

The mutant strain of *Salmonella* Gallinarum 287/91 containing the defective genes *cobS* and *cbiA* (SGΔ*cobS*Δ*cbiA*) was obtained from a previous study [15]. The wild-type strain *Salmonella* Gallinarum 287/91 was isolated from a fowl typhoid outbreak in Brazil (Access number AM933173.1) and used as a positive control in the experiments. Both strains were gentamicin susceptible.

Chicken-derived macrophage-like cell line HD-11 cultivation

The chicken macrophage-like cell line HD-11 infection was conducted following the protocol of Saraiva et al. [15] with minor adjustments. First, the cryopreserved cells were thawed in a water bath at 37°C and transferred to 50 mL of RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 + GlutaMAX™, ThermoFisher Scientific®, USA) supplemented with 5% inactivated Chicken Serum (Sigma-Aldrich, USA), 5% inactivated Fetal Bovine Serum (FBS EU Origin, Biowest, France), and 25 µg/mL gentamicin (Gentamicin 50 mg/mL, ThermoFisher Scientific®, USA) (RPMI-25). The cell suspension was split between two 75 cm² tissue culture flasks (Kasvi®, Brazil) and incubated at 37°C with 5% CO₂. Media replacement was performed as needed based on cell morphology and growth. For each replacement, cells were washed with 20 mL of Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS [1x], Gibco, ThermoFisher Scientific®, USA), and 25 mL of fresh RPMI-25 was added. The flasks were then returned to the incubator under the same conditions.

Once the cells reached 80% of confluence, they were washed twice with 20 mL of DPBS; in the second wash, they were gently scraped off the flask bottom, and the suspension was transferred to a 50 mL Falcon tube (Kasvi®, Brazil) for centrifugation at 5000 x g for 8 minutes (acceleration = 1; deceleration = 1). After centrifugation, the supernatant was discarded, the pellet was resuspended in 3 mL of RPMI-25, and additional RPMI-25 was added to reach a final volume of 10 mL. To assess cell viability, 2 µL of 0.4% Trypan Blue (ThermoFisher Scientific®, USA) was mixed with 18 µL of the cell culture, and 10 µL of this mix was loaded onto a hemocytometer with a coverslip. Cells were counted in two diagonal large squares, and density was calculated as: cells/mL = Average number of cells × 10,000. The concentration was adjusted to 5×10^5 cells/mL, and 1 mL of the suspension was added to each well (24-well plates, Kasvi®, Brazil), followed by incubation under the previously described conditions.

Isolation of Chicken primary macrophages

The chicken primary macrophages were obtained according to Rodrigues Alves et al. [16] with slight modifications. Initially, 4 mL of peripheral blood was punctured from a 28-day-old healthy chicken and deposited in EDTA tubes. Then, 20 mL of blood was mixed with DPBS in the same proportion (1:1), transferred to a 50 mL Falcon tube containing 20 mL of Ficoll-Paque Plus solution (Cytiva®, Brazil), centrifugated at 1200 g for 40 minutes, after centrifugation, the blood mononuclear cells were carefully collected. This step was performed once again to eliminate contamination from other blood cells. Finally, mononuclear cells were washed thrice with DPBS (1:1) and resuspended in 10 mL of RPMI-25. The cell concentration was adjusted to 5×10^7 cells/mL, as described previously, and 1 mL of the suspension was added to each well of the tissue culture plate (24-well plates, Kasvi, Brazil). After 24 hours, the wells were washed thrice with 1 mL of DPBS and replaced with 1 mL of fresh RPMI-25. On the subsequent day, the wells were washed thrice with 1 mL of DPBS and replaced with 1 mL of RPMI without gentamicin.

Macrophage infection

SG wild-type and *SGΔcobSchiA* opsonization with chicken serum was performed as described by Huang et al. [20] with a multiplicity of infection (MOI) of 10:1. After 30 min of infection at 37°C under 5% CO₂, the media were replaced with 1 mL of RPMI containing 100 µg/mL of gentamicin to eliminate extracellular bacteria and incubated for 30 min under the same conditions. After this period, the wells for survival analysis were replaced with 1 mL of RPMI-25. At each sampling time, the wells were washed thrice with NaCl 0.9%, and 1 mL of 0.1 % Triton-X was used to disrupt macrophages, followed by decimal serial dilution in lysogeny agar (Difco™, USA) at 0- (uptake), 2-, 4-, and 20-hour post-infection (hpi). Each sample was performed in triplicates, and the experiment was repeated thrice.

Bacterial uptake, fold-net replication, and survival from HD-11 and chicken primary macrophage infection

All bacterial enumeration after infection were logarithmically transformed and calculated as follows: uptake was the proportion between CFU/mL from cells at 30 min and CFU/mL of inoculum. The fold-net replication was obtained by the proportion between

CFU/mL at 2h and CFU/mL of bacterial uptake; these proportions were repeated for fold-net replication 4h/2h and 20/4h. Finally, the survival of the wild-type strain was calculated by percentage concerning the mutant survival, in which the individual survival from both strains was the proportion between CFU/mL from 20h and bacterial uptake.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 10.3.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Unpaired T-test compared macrophage uptake, and bacterial counts were analyzed through two-way ANOVA followed by Šidák correction for multiple comparisons. Statistical significance was considered when P-value was lower than 0.05 ($P < 0.05$).

Results and Discussion

Fowl typhoid is an important systemic disease that burdens the poultry industry [1]. The absence of the cobalamin pathway through the defective *cobS* and *cbiA* genes in SG seems to be associated with reduced mortality in brown-laying hens [14]. During disease progression, the innate immune system plays an important role, especially macrophages, which contribute to bacteria dissemination to lymphoid organs [13]. Therefore, here, we evaluate the capture and survival of this mutant strain within macrophage infection.

In both cell lines, there was neither difference in the inoculums nor uptake (Fig. 1a; 1c), indicating that differences in bacterial survival were possibly related to the characteristics of the wild-type and mutant strains. In the chicken-derived macrophage-like cell line HD-11, there was no difference between the mutant and the wild-type strains at any of the stages or times of the experiment (Fig. 1b; 2c; 2d). Nevertheless, both strains differ in 2-, 4-, and 20-hpi in chicken primary macrophage infection (Fig. 1d).

The HD-11 immortalized cell line is derived from chicken bone marrow and transformed by the avian leukemia virus MC29 [18]. However, considering that poultry genetics has evolved in the last 50 years, which has become more productive and matured faster [19], the HD-11 cells may not be the best way to evaluate some types of infection model experiments. Although previous reports demonstrated that chicken-derived macrophage-like cells could be successfully used to differentiate mutant pathogens from their respective wild-type strains [15,20,21], HD-11 cells may not fully replicate normal cell functionality, expressing unique phenotype not found in vivo [18].

On the other hand, Primary macrophages have reduced longevity compared to immortalized cells, contributing to less accumulation of genetic mutations in long-term cultivation [22], although differences between immortalized and primary mouse macrophages have already been described [23]. Moreover, a study demonstrated that a low dose of LPS triggered faster kinetics of the nuclear factor kappa B (NF- κ B), which is a mediator for inflammatory response, in primary macrophages when compared to RAW 264.7 cells [24]. Even so, studies comparing HD-11 cells with chicken primary macrophages remain meager, which led us to carry out this experiment. Our results suggest that HD-11 cells are not effective in evaluating the interference of the cobalamin genetic system during cell infection by *Salmonella Gallinarum*.

According to Paiva et al. [14], cobalamin possibly regulates a group of genes directly or indirectly, making bacteria more virulent. The ethanolamine metabolism (*eut* operon), which depends on the presence of cobalamin, has already been associated with *Salmonella* virulence, in which *eut*-encoded transcription factor EutR activates genes in pathogenicity island 2 in *Salmonella* (SPI-2), favoring the bacteria intramacrophage adaptation [7,25].

However, our results disagree with these previous reports: the absence of cobalamin synthesis genetic apparatus made the mutant strain survive approximately 15% more than the wild-type strain (Fig. 2a), with a significant difference in the fold-net replication in 2h vs Uptake (Fig. 2b), which could be related to the recognition of bacteria since this period has already been associated to a swift morphological response to *Salmonella* infection in chicken primary macrophage [17].

Macrophages can act as antigen-presenting cells (APCs) with the expression of histocompatibility complexes (MHCs) and surface-expressed Immunoglobulin (Ig), promoting antigen capture and presentation [26]. A memory response has already been reported in these cells, and a secondary stimulation could produce a more intense response against the pathogen [27]. Also, the mutant prevalence in the intramacrophage niche can be associated with promoting an adaptive immune response. According to Penha Filho et al. [28] 25-day-old brown layer-hens infected with *SGΔcobScbiA* presented a greater activation of memory T cells, and when challenged in 45-day-old, there was a quick proliferation of these cells, contributing to the elimination of bacteria.

Furthermore, other metabolic pathways may be activated without cobalamin synthesis, favoring *SGΔcobScbiA* survival. For example, brown-laying hens infected with SG containing the *mgtC* gene deletion presented a delay in the disease progression [16]. A study with *phoP* gene deletion in *S. Typhimurium* identified a change in metabolic and gene transcription profiles *in vitro* [29]. Therefore, further studies with molecular analysis, such as RNA sequencing and metabolomics, are important for fully understanding *SGΔcobScbiA* during macrophage infection.

Conclusion

The chicken primary macrophage model, which is closer to the physiologic, provided more information about the host-pathogen interaction, being a good candidate for *in vitro* studies, replacing *in vivo* challenge, and avoiding bird deaths. Furthermore, the mutant strain survived more than the wild-type, possibly related to the absence of cobalamin synthesis genetic apparatus, which contributed to a less intense response from the host and bacteria virulence reduction.

CRedit authorship contribution statement

Isabella C. Campos: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing. **Mauro M. S. Saraiva:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing. **Túlio S. Spina:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Valdinete P. Benevides:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization. **Adriana M. Almeida:** Formal analysis, Investigation, Methodology. **Angelo Berchieri Junior:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review and editing.

Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant number 2023/04863-5]; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil

Declaration of competing interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

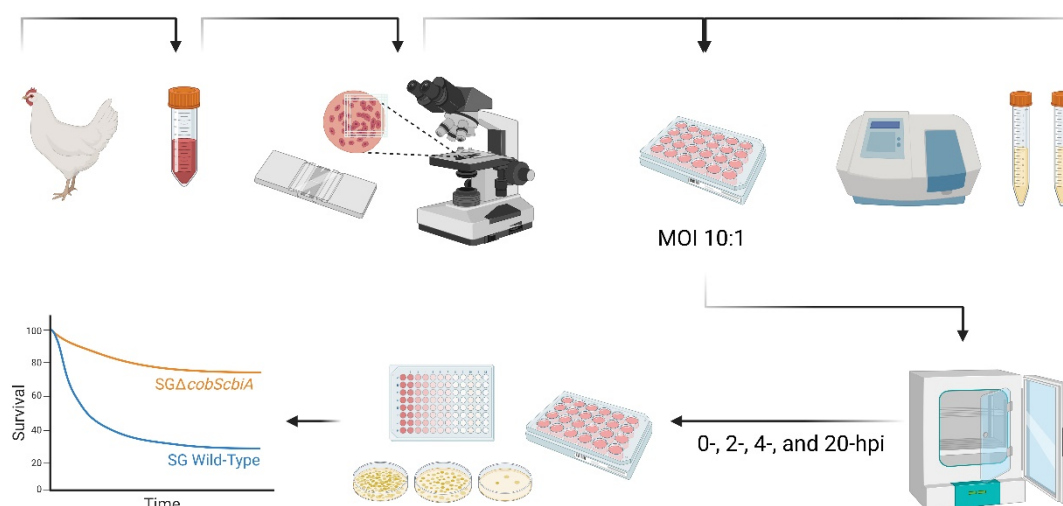
We sincerely thank Vector-borne Bioagents Laboratory (VBBL) and Poultry Science Laboratory (LAVINESP) from Unesp/FCAV for their collaboration and encouragement throughout this project.

References

- [1] D.M. Roof, J.R. Roth, Ethanolamine Utilization in *Salmonella typhimurium*, J Bacteriol 170(9) (1988) 3855–3863. <https://doi.org/10.1128/jb.170.9.3855-3863.1988>
- [2] T.A. Bobik, G.D. Havemann, R.J. Busch, D.S. Williams, H.C. Aldrich, The Propanediol Utilization (*pdu*) Operon of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 Includes Genes Necessary for Formation of Polyhedral Organelles Involved in Coenzyme B₁₂-Dependent 1,2-Propanediol Degradation, J Bacteriol. 181(19) (1999) 5967–5975. <https://doi.org/10.1128/JB.181.19.5967-5975.1999>
- [3] D.A. Rodionov, A.G. Vitreschak, A.A. Mironov, M.S. Gelfand, Comparative Genomics of the Vitamin B₁₂ Metabolism and Regulation in Prokaryotes, Journal of Biological Chemistry 278 (2003) 41148–41159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305837200>.
- [4] J. B. Paiva, R.A. Casarin, P. Filho, A. Berchieri Junior, M. Victor, F. Lemos, Requirement for cobalamin by *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Pullorum, Gallinarum and Enteritidis during infection in chickens, Brazilian Journal of Microbiology 42 (2011) 1409–1419. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400024>
- [5] M.J. Warren, E. Raux, H.L. Schubert, J.C. Escalante-Semerena, The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂), Nat Prod Rep 19 (2002) 390–412. <https://doi.org/10.1039/b108967f>.
- [6] J.C. Escalante-Semerena, M.J. Warren, Biosynthesis and Use of Cobalamin (B₁₂), EcoSal Plus 3 (2008). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.3.8>.
- [7] A.A. Richter-Dahlfors, S. Ravnum, D.I. Andersson, Vitamin B₁₂ repression of the *cob* operon in *Salmonella typhimurium* : translational control of the *cbiA* gene, Mol Microbiol 13 (1994) 541–553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00449.x>.
- [8] L.A. Maggio-Hall, K.R. Claas, J.C. Escalante-Semerena, The last step in coenzyme B₁₂ synthesis is localized to the cell membrane in bacteria and archaea, Microbiology (N Y) 150 (2004) 1385–1395. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26952-0>.
- [9] N.R. Thomson, D.J. Clayton, D. Windhorst, G. Vernikos, S. Davidson, C. Churcher, M.A. Quail, M. Stevens, M.A. Jones, M. Watson, A. Barron, A. Layton, D. Pickard, R.A. Kingsley, A. Bignell, L. Clark, B. Harris, D. Ormond, Z. Abdellah, K. Brooks, I. Cherevach, T. Chillingworth, J. Woodward, H. Norberczak, A. Lord, C. Arrowsmith, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, M. Sanders, S. Whitehead, J.A. Chabalgoity, D. Maskell, T. Humphrey, M. Roberts, P.A. Barrow, G. Dougan, J. Parkhill, Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and

- host adaptation pathways, *Genome Res* 18 (2008) 1624–1637. <https://doi.org/10.1101/gr.077404.108>.
- [10] P.A. Barrow, O.C. Freitas Neto, Pullorum disease and fowl typhoid-new thoughts on old diseases: A review, *Avian Pathology* 40 (2011) 1–13. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.542575>.
- [11] L. Chappell, P. Kaiser, P. Barrow, M.A. Jones, C. Johnston, P. Wigley, The immunobiology of avian systemic salmonellosis, *Vet Immunol Immunopathol* 128 (2009) 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.295>.
- [12] L. Jiang, P. Wang, X. Song, H. Zhang, S. Ma, J. Wang, W. Li, R. Lv, X. Liu, S. Ma, J. Yan, H. Zhou, D. Huang, Z. Cheng, C. Yang, L. Feng, L. Wang, *Salmonella* Typhimurium reprograms macrophage metabolism via T3SS effector SopE2 to promote intracellular replication and virulence, *Nat Commun* 12 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21186-4>.
- [13] D.W. Holden, Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages, *Traffic* 3 (2002) 161–169. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.030301.x>.
- [14] S. Shaji, R.K. Selvaraj, R. Shanmugasundaram, *Salmonella* Infection in Poultry: A Review on the Pathogen and Control Strategies, *Microorganisms* 11 (2023). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112814>.
- [15] J.B. Paiva, R.A. Casarin, P. Filho, Y. Melisa, S. Arguello, A. Berchieri Junior, M. Victor, F. Lemos, P.A. Barrow, D. Castellane, A defective mutant of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum in cobalamin biosynthesis is avirulent in chickens, *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (2009) 495–504. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000300012>.
- [16] R.A.C. Penha Filho, S.J.A. Diaz, T. da S. Medina, Y.F. Chang, J.S. da Silva, A. Berchieri, Evaluation of protective immune response against fowl typhoid in chickens vaccinated with the attenuated strain *Salmonella* Gallinarum $\Delta cobS\Delta cbiA$, *Res Vet Sci* 107 (2016) 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.06.011>.
- [17] R.A.C. Penha Filho, F.T. Zancan, A.M. de Almeida, A. Berchieri Junior, Protection of chickens against fowl typhoid using field vaccine programs formulated with the live attenuated strain *Salmonella* Gallinarum $\Delta cobS\Delta cbiA$, *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* 84 (2017) e0272015. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000272015>.
- [18] M.M.S. Saraiva, V.P. Benevides, P.R. Guerra, I.C. Campos, L.B. Rodrigues Alves, J.B. Paiva, L.M. Muniz, A.M. Almeida, O.C. Freitas Neto, J.E. Olsen, A. Berchieri Junior, Deletions of *ttrA* and *pduA* genes in *Salmonella enterica* affect survival within chicken-derived HD-11 macrophages, *Curr Genet* 70 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00294-024-01299-1>.
- [19] L.B. Rodrigues Alves, O.C. de Freitas Neto, M. de M.S. Saraiva, D.F.M. do Monte, B.N. de Lima, J.M. Cabrera, F. de O. Barbosa, V.P. Benevides, T.S. de Lima, I.C. Campos, M. da S. Rubio, C. de F. Nascimento, L.C.R.V. Arantes, V.V. Alves, A.M. de Almeida, J.E. Olsen, A. Berchieri Junior, *Salmonella* Gallinarum *mgtC* mutant shows a delayed fowl typhoid progression in chicken, *Gene* 892 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147827>.
- [20] K. Huang, A. Herrero-Fresno, I. Thøfner, S. Skov, J.E. Olsen, Interaction Differences of the Avian Host-Specific *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum, the Host-Generalist *S.* Typhimurium, and the Cattle Host-Adapted *S.* Dublin with Chicken Primary Macrophage, *Infection and immunity* 87(12) (2019) e00552-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00552-19>.
- [21] H. Beug, A. Von Kirchbach, G. Doderlein, J.-F. Conscience, T. Graf, Chicken Hematopoietic Cells Transformed by Seven Strains of Defective Avian Leukemia Viruses Display Three Distinct Phenotypes of Differentiation, *Cell* 18(2) (1979) 375-390. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90057-6).
- [22] P.B. Siegel, Evolution of the modern broiler and feed efficiency, *Annu Rev Anim Biosci* 2 (2014) 375–385. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114132>.

- [23] A. Mikolajczyk-Martinez, M. Ugorski, Unraveling the role of type 1 fimbriae in *Salmonella* pathogenesis: insights from a comparative analysis of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum, *Poult Sci* 102 (2023) 102833. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102833>.
- [24] J. Yin, J. Xia, M. Tao, L. Xu, Q. Li, S. Geng, X. Jiao, Construction and characterization of a *cigR* deletion mutant of *Salmonella enterica* serovar Pullorum, *Avian Pathology* 45 (2016) 569–575. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1187708>.
- [25] Z. He, A. Wilson, F. Rich, D. Kenwright, A. Stevens, Y.S. Low, M. Thunders, Chromosomal instability and its effect on cell lines, *Cancer Rep* 6 (2023). <https://doi.org/10.1002/cnr2.1822>.
- [26] M. Herb, V. Schatz, K. Hadrian, D. Hos, B. Holoborodko, J. Jantsch, N. Brigo, Macrophage variants in laboratory research: most are well done, but some are RAW, *Front Cell Infect Microbiol* 14 (2024). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1457323>.
- [27] A. V. Bagaev, A.Y. Garaeva, E.S. Lebedeva, A. V. Pichugin, R.I. Ataullakhanov, F.I. Ataullakhanov, Elevated pre-activation basal level of nuclear NF- κ B in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF- κ B into the cell nucleus, *Sci Rep* 9 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36052-5>.
- [28] C.J. Anderson, D.E. Clark, M. Adli, M.M. Kendall, Ethanolamine Signaling Promotes *Salmonella* Niche Recognition and Adaptation during Infection, *PLoS Pathog* 11 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005278>.
- [29] L.A. Cummings, B.L. Deatherage, B.T. Cookson, Adaptive Immune Responses during *Salmonella* Infection, *EcoSal Plus* 3 (2009). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.8.11>.
- [30] X.H. Fang, Z.J. Li, C.Y. Liu, G. Mor, A.H. Liao, Macrophage memory: Types, mechanisms, and its role in health and disease, *Immunology* 171 (2024) 18–30. <https://doi.org/10.1111/imm.13697>.
- [31] Y. Li, S. Tian, L. Yang, X. Bao, L. Su, X. Zhang, S. Liu, Y. Zhu, J. Yang, H. Lin, J. Zhang, J. Zeng, C. Wang, T. Tang, Combined transcriptomic and metabolomic analysis of *Salmonella* in the presence or absence of PhoP–PhoQ system under low Mg²⁺ conditions, *Metabolomics* 18 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11306-022-01946-z>.



Graphical abstract

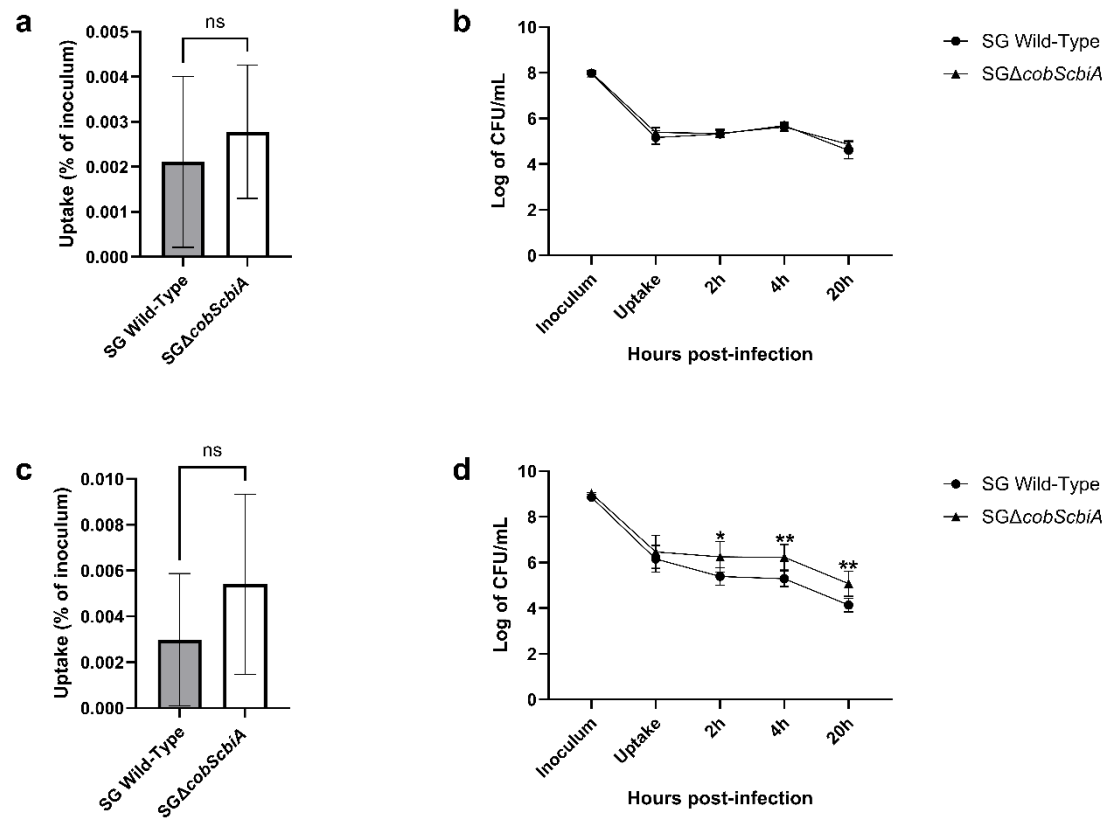


Fig 1. Uptake (a) and survival curve (b) of SG Wild-Type and SG Δ *cobSchiA* strains within HD-11 cell-like macrophage. Uptake (c) and survival curve (d) of Wild-Type and SG Δ *cobSchiA* within the chicken primary macrophage.

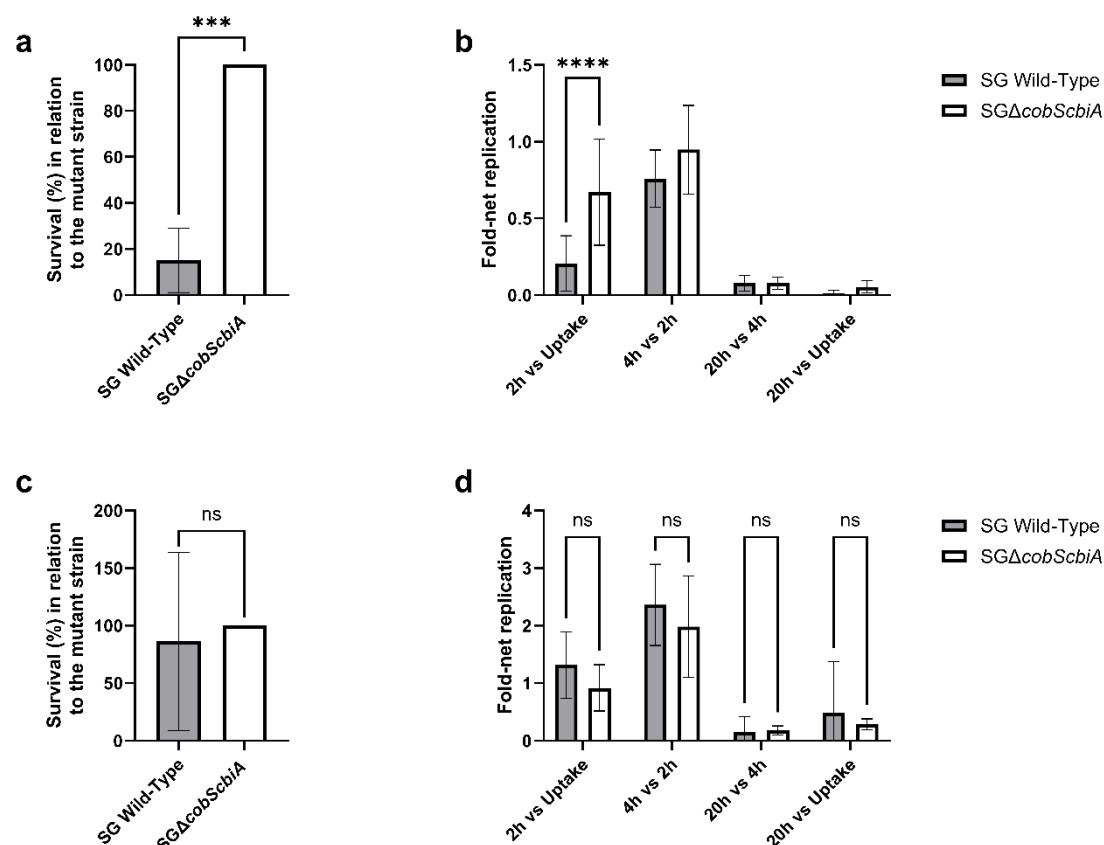


Fig 2. Replication/survival of SG Wild-Type strain expressed as a percentage of SGΔcobScbiA strain in chicken primary macrophage (a) and HD-11 cell-like macrophage (c). Fold-net replication of both strains in chicken primary macrophage (b) and HD-11 cell-like macrophage (d).

7. Referência Bibliográfica

KELLY, L.M.; ALWORTH, L.C. Techniques for collecting blood from the domestic chicken. **Lab Animal**, v. 42, n. 10, p. 359–361, 2013. DOI: 10.1038/labani.394.

RODRIGUES ALVES, L.B.; FREITAS NETO, O.C.; SARAIVA, M.M.S.; MONTE, D.F.M.; LIMA, B.N.; CABRERA, J.M.; BARBOSA, F.O.; BENEVIDES, V.P.; LIMA, T.S.; CAMPOS, I.C.; RUBIO, M.D.S.; NASCIMENTO, C.F.; ARANTES, L.C.R.V.; ALVES, V.V.; ALMEIDA, A.M.; OLSEN, J.E.; BERCHIERI Jr, A. *Salmonella Gallinarum mgtC*

mutant shows a delayed fowl typhoid progression in chicken. **Gene**, v. 892, 2024. DOI: 10.1016/j.gene.2023.147827.

SARAIVA, M.M.S.; RODRIGUES ALVES, L.B.; MONTE, D.F.M.; FERREIRA, T.S.; BENEVIDES, V.P.; BARBOSA, F.O.; FREITAS NETO, O.C.; ALMEIDA, A.M.; BARROW, P.A.; BERCHIERI Jr, A. Deciphering the role of *ttrA* and *pduA* genes for *Salmonella enterica* serovars in a chicken infection model. **Avian Pathology**, v. 50, n. 3, p. 257–268, 2021. DOI: 10.1080/03079457.2021.1909703.

APÊNDICE

Apêndice 1.

Publicações a serem apresentadas em evento internacional

- a. Campos, Isabella Cardeal; **Saraiva, Mauro de Mesquita Souza**; Lima, Túlio Spina; Benevides, Valdinete Pereira; Almeida, Adriana Maria; Berchieri Junior, Angelo. **Cobalamin synthesis influences *Salmonella* Gallinarum survival within macrophage infection.** In: I3S Congress 2025 – International Symposium on Salmonella & Salmonellosis | 23-25 June 2025 | **I3S2025, 2025**, Saint-Malo, France, **2025**.

25/02/2025, 09:30

 Outlook

Fwd: I3S Congress 2025 - Poster Accepted!

De Isabella Cardeal Campos <isabella.campos@unesp.br>
Data Ter, 25/02/2025 09:01
Para Mauro Saraiva <saraiva_ufba@hotmail.com>

----- Forwarded message -----

De: I3S CONGRESS <i3scongress@innozh.fr>
Date: seg., 24 de fev. de 2025 às 08:51
Subject: I3S Congress 2025 - Poster Accepted!
To: isabella.campos@unesp.br <isabella.campos@unesp.br>



I3S2025 – Poster Accepted!

Dear Isabella,

<https://outlook.live.com/mail/0/inbox/fd/AQMkADAwATY0MDAB...y%2FK%2FsAAACaQwAAAA7TvwPRFIDRYa9AR1y%2FK%2FsAAgBICBnAAAA> Página 1 de 3

- b. Lima, Túlio Spina; **Saraiva, Mauro de Mesquita Souza**; Campos, Isabella Cardeal; Benevides, Valdinete Pereira; Almeida, Adriana Maria; Berchieri Junior, Angelo. ***Salmonella Enteritidis* presents a greater survival rate during infection of chicken primary macrophage than *Salmonella Gallinarum* biovars.** In: I3S Congress 2025 – International Symposium on Salmonella & Salmonellosis | 23-25 June 2025 | **I3S2025, 2025**, Saint-Malo, France, **2025**.

E-mail de Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Fwd: I3S Congress 2025 - Poster Accepted!

25/02/2025, 10:08



Mauro De Mesquita Souza Saraiva <mauro.saraiva@unesp.br>

Fwd: I3S Congress 2025 - Poster Accepted!

Tulio Spina de Lima <tulio.spina@unesp.br>

25 de fevereiro de 2025 às 10:04

Para: Mauro De Mesquita Souza Saraiva <mauro.saraiva@unesp.br>

----- Forwarded message -----

De: **I3S CONGRESS** <i3scongress@innozh.fr>

Date: ter., 25 de fev. de 2025 05:29

Subject: I3S Congress 2025 - Poster Accepted!

To: tulio.spina@unesp.br <tulio.spina@unesp.br>



I3S2025 – Poster Accepted!

Dear Tulio,

Thank you for submitting your abstract for the I3S Congress 2025, which will take place in Saint-Malo – FRANCE, from June 23 to 25, 2025.

We are pleased to inform you that your abstract: "***Salmonella Enteritidis* presents a**

<https://mail.google.com/mail/u/1/?ik=b97337ef20&view=pt&search...id=msg-f:1825034688594999841&simpl=msg-f:1825034688594999841>

Página 1 de 3