

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Dissertação será disponibilizado
somente a partir de 07/03/2027.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” (UNESP) – CAMPUS JABOTICABAL FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)**

**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**

Isabella Cardeal Campos

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” (UNESP) – CAMPUS JABOTICABAL FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)**

**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**

Isabella Cardeal Campos

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva

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

C198a Campos, Isabella Cardeal

Avaliação do comportamento da estirpe de *Salmonella Gallinarum* 287/91 contendo deleção dos genes *cobS* e *cblA* durante a infecção de macrófagos primários de aves / Isabella Cardeal Campos. -- Jaboticabal, 2025

48 p. : il.

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

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Mauro de Mesquita Souza Saraiva

1. Avicultura. 2. Salmonelose. 3. *Salmonella Gallinarum*. 4. Patogenicidade. 5. Macrófagos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: 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

AUTORA: ISABELLA CARDEAL CAMPOS

ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

COORIENTADOR: MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias, área: Saúde Única pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA**
Data: 07/03/2025 10:54:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA (Participação Presencial)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA HORN**
Data: 09/03/2025 20:04:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

PROFESSOR ADJUNTO FABIANA HORN (Participação Virtual)
Departamento de Biofísica / UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Documento assinado digitalmente
 **LUISA ZANOLLI MORENO**
Data: 07/03/2025 12:39:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. LUISA ZANOLLI MORENO (Participação Presencial)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 07 de março de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ISABELLA CARDEAL CAMPOS – Nascida em 12 de outubro de 1998 na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, filha de Claudia Almeida Cardeal Campos e Demerval dos Reis Campos. Em 2018, 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 Bacharel em Medicina Veterinária em 2023. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nas áreas de nutrição de aves e sanidade avícola, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Nilva Kazue Sakomura e do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, respectivamente. Em março de 2023, ingressou no mestrado da FCAV – Unesp/Jaboticabal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias com estudo sobre a 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 sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e coorientação do Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva.

“Um trabalho te dá um propósito e um significado. A vida é vazia sem ambos.”

- Stephen Hawking

DEDICATÓRIA

Dedico

Aos meus pais, Claudia e Demerval, aos meus avós, Galdino, Dioni e
Maria Luiza e ao meu namorado Túlio

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que com sua infinita bondade e sabedoria, me guiou, conferiu saúde e perseverança durante minha trajetória acadêmica.

Aos meus pais, Claudia e Demerval, por todo amor, carinho e apoio. Agradeço por sempre estarem presentes e acompanharem toda a minha jornada, vocês são essenciais na minha vida. Obrigada por serem meus maiores exemplos.

Aos meus avós, Galdino, Dioni e Maria Luiza, obrigada por todo amor e incentivo. Agradeço por sempre estarem comigo e torcerem por mim. A vocês todo meu carinho.

Ao meu namorado, Túlio, por todo amor, companheirismo e dedicação em todos os momentos, sem você nada seria possível. Te admiro imensamente.

Ao meu orientador, Angelo Berchieri Junior, obrigada por todos os ensinamentos, incentivo e paciência. Agradeço por todas as oportunidades. Você é um exemplo como profissional e pessoa.

Ao meu coorientador, Mauro de Mesquita Souza Saraiva, por todo aprendizado, paciência e amizade. Obrigada por me mostrar o caminho e contribuir tanto no meu crescimento profissional quanto pessoal.

A todos do Laboratório de Ornitopatologia da FCAV. Obrigada pela amizade, apoio, aprendizado e todas as conversas durante o café. Sou grata a cada um de vocês.

À professora Dr^a. Fabiana Horn, agradeço a disponibilidade e envio das células semelhantes aos macrófagos de galinhas da linhagem HD-11

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp), sou eternamente grata pela estrutura e suporte durante minha graduação e mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processo nº 2023/04863-5 [Mestrado regular – Campos, IC]), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Programa de Excelência Acadêmica – PROEX: nº 88887.832530/2023-00) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq – Processos 175342/2023-7; 175352/2023-2). Cujo o apoio possibilitou a realização desta dissertação.

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

Sumário

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
CERTIFICADO DA COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA.....	iv
COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO NO SISGEN	v
RESUMO	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1. Avicultura comercial.....	2
2. Gênero <i>Salmonella</i>	3
3. Salmoneloses aviárias.....	4
4. Tifo aviário	4
5. Imunopatogenia do tifo aviário.....	5
6. Sobrevivência Intracelular	7
7. Genes <i>cobS</i> e <i>cblA</i>	8
8. Referência Bibliográfica.....	10
CAPÍTULO 2 - <i>Salmonella</i> Gallinarum with <i>cobS</i> and <i>cblA</i> defective genes increases survival within the infection of primary chicken macrophage	17
Abstract	18
1. Introduction.....	18
2. Materials and Methods	19
2.1. Bacterial strains.....	20
2.2. Chicken-derived macrophage-like cell line HD-11 cultivation	20
2.3. Isolation of Chicken primary macrophages.....	21

2.4. Macrophage infection	21
2.5. Bacterial uptake, fold-net replication, and survival from HD-11 and chicken primary macrophage infection.....	22
2.6. Statistical analysis	22
3. Results and Discussion	22
4. Conclusion.....	24
CRedit authorship contribution statement	25
Funding.....	25
Declaration of competing interest.....	25
Acknowledgments	25
References	26
CAPÍTULO 3 – Considerações finais	32

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"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"**, protocolo n.º 003859/23, 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.

Vigência do Projeto	06/06/2023 a 06/06/2025
Espécie / Linhagem	Frango de Corte
Nº de animais	100
Peso / Idade	15 semanas de vida
Sexo	F
Origem	Incubatório Comercial

Jaboticabal, 16 de maio de 2023.

Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-coordenadora em exercício – CEUA FCAV

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br

CERTIFICADO DA COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Seção 1

ISSN 1677-7042

Nº 151, quarta-feira, 9 de agosto de 2023

Endereço: Rua Waldemar Falcão, Nº 121 - Candeal - Salvador/Ba CEP: 40296-710.
CQB: 111/99
Assunto: Solicitação de parecer para execução de atividade de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado - OGM da classe de risco 2 em áreas com nível de biossegurança NB-2.
Extrato Prévio: 8845/2023, publicado no Diário Oficial da União em 10/05/2023

Decisão: DEFERIDO
O Presidente da Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Gonçalo Moniz /Fiocruz Bahia, Dr. Diogo Rodrigues de Magalhães Moreira, solicita parecer técnico da CTNBio para execução de projeto de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado, denominado "Desenvolvimento de um implante de cartilagem geneticamente modificado com um circuito gênico capaz de auto-regular a homeostase local em procedimentos de reparo tecidual utilizados no tratamento da osteoartrite", a ser desenvolvido nas instalações da instituição, sob a responsabilidade da Dra. Milena Botelho Pereira Soares. 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, deverão ser encaminhadas, via Sistema FALABR, através da página eletrônica do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

LEANDRO VIEIRA ASTARITA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 8.610/2023

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 263ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03/08/2023, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01245.009186/2023-57
Requerente: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - ICB-UFMG
Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627. Pampulha. BH. MG. 31270-901.
CQB: 038/97
Assunto: Solicitação de parecer para execução de projeto de pesquisa com OGM da classe de risco 3.
Extrato Prévio: 8844/2023, publicado no Diário Oficial da União em 10/05/2023

Decisão: DEFERIDO
A Presidente da Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - ICB-UFMG, Dra. Juliana Alves da Silva, solicita parecer técnico da CTNBio para execução de projeto de pesquisa com OGM da classe de risco 3. O projeto a ser executado é denominado: "Avaliação da atividade antiviral e efeito imunomodulador de novos compostos utilizando modelos experimentais ou in vitro de infecção por SARS-CoV-2", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Henrique Franco. 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, deverão ser encaminhadas, via Sistema FALABR, através da página eletrônica do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

LEANDRO VIEIRA ASTARITA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 8.611/2023

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 263ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03/08/2023, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01245.009062/2023-71
Requerente: Laudo Laboratório Avícola Uberlândia Ltda.
Endereço: Rodovia BR 365, S/N, Km 615. Uberlândia-Minas Gerais. CEP: 38407-180.
CQB: 579/22
Assunto: Solicitação de parecer para execução de atividades em regime de contenção com OGM da classe de risco 2 em áreas com nível de biossegurança NB-2.
Extrato Prévio: 8849/2023, publicado no Diário Oficial da União em 11/05/2023

Decisão: DEFERIDO
A Presidente da Comissão Interna de Biossegurança empresa da Laudo Laboratório Avícola Uberlândia Ltda., Dra. Isabela Pacheco Borges, solicita parecer técnico da CTNBio para execução de atividades em regime de contenção com OGM da classe de risco 2 em áreas com nível de biossegurança NB-2. As atividades a serem executadas são denominadas "Detecção de Adenovírus aviário, Vírus da Leucose Aviária e de Mycoplasma spp. em amostras da vacina contra o banco de vírus influenza - cepa A/H5N1 - A/Anhui/1/2005 - IDCC- RG6 (Vacina contra influenza A vírus H5N1)" com organismo geneticamente modificados da classe de risco 2. 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, deverão ser encaminhadas, via Sistema FALABR, através da página eletrônica do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

LEANDRO VIEIRA ASTARITA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 8.612/2023

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 263ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03/08/2023, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01245.009063/2023-16
Requerente: Laudo Laboratório Avícola Uberlândia Ltda.
Endereço: Rodovia BR 365, S/N, Km 615. Uberlândia-Minas Gerais. CEP: 38407-180.
CQB: 579/22
Assunto: Solicitação de parecer para execução de atividades em regime de contenção com OGM da classe de risco 2 em áreas com nível de biossegurança NB-2.
Extrato Prévio: 8847/2023, publicado no Diário Oficial da União em 11/05/2023

Decisão: DEFERIDO

A Presidente da Comissão Interna de Biossegurança empresa da Laudo Laboratório Avícola Uberlândia Ltda., Dra. Isabela Pacheco Borges, solicita parecer técnico da CTNBio para execução de atividades em regime de contenção com OGM da classe de risco 2 em áreas com nível de biossegurança NB-2. As atividades a serem executadas são denominadas "Detecção de Adenovírus aviário, Vírus da Leucose Aviária e de Mycoplasma spp. em amostras do banco de vírus influenza - cepa A/H5N8 - A/Astrakha/3212/2020-IDCC-RG71A (vacina contra influenza A vírus H5N8)" com organismo geneticamente modificados da classe de risco 2. 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, deverão ser encaminhadas, via Sistema FALABR, através da página eletrônica do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

LEANDRO VIEIRA ASTARITA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 8.613/2023

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 263ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03/08/2023, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01245.003970/2023-51
Requerente: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos - Fundação Oswaldo Cruz
Endereço: Av. Brasil, 4365 - Pavilhão Rocha Lima - Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ. CEP: 21040-900.
CQB: 110/99
Assunto: Solicitação de parecer para transporte e projeto de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado - OGM da classe de risco 2
Extrato Prévio: 8710/2023, publicado no Diário Oficial da União em 16/02/2023

Decisão: DEFERIDO
A Presidente da Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos/Fiocruz, Dra. Andressa Guimarães de Souza Pinto, solicita parecer técnico da CTNBio para a execução do projeto de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado - OGM da classe de risco 2. O projeto a ser executado é denominado "Ensaios celulares para avaliação funcional de anticorpos anti-PD1 - LATAM" e será executado no Laboratório de Tecnologia de Tecnologia Viroológica - LATEV, sob a responsabilidade das Drs. Anna Erika Vieira de Araújo e Dra. Laralce Medeiros de Souza. 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, deverão ser encaminhadas, via Sistema FALABR, através da página eletrônica do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

LEANDRO VIEIRA ASTARITA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 8.615/2023

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 263ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03/08/2023, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01245.010308/2023-58
Requerente: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Campus de Jaboticabal, SP
CQB: 088/98
Assunto: Solicitação de parecer para execução de atividade de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado - OGM da classe de risco 2 em áreas com nível de biossegurança NB-2.
Extrato Prévio: 8882/2023, publicado no Diário Oficial da União em 26/05/2023

Decisão: DEFERIDO
A Presidente da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Dra. Luciane Helena Gargaglione Batalhão, solicita parecer técnico da CTNBio para execução de projeto de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado, denominado "Avaliação do comportamento da estirpe de Salmonella Gallinarum 287/91 contendo deleção dos genes cob e cblA durante a infecção de macrofagos primários de aves", a ser desenvolvido nas instalações da instituição, sob a responsabilidade do Dr. Angelo Berchieri Júnior. 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, deverão ser encaminhadas, via Sistema FALABR, através da página eletrônica do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

LEANDRO VIEIRA ASTARITA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 8.616/2023

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 263ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03/08/2023, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01245.011739/2023-31
Requerente: Instituto Nacional do Câncer - INCA
Endereço: Rua André Cavalcante 37/ 6º andar Centro, CEP 20231-050. Rio de Janeiro.
CQB: 139/01
Assunto: Solicitação de parecer para execução de atividade de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado - OGM da classe de risco 2 em áreas com nível de biossegurança NB-2.
Extrato Prévio: 8917/2023, publicado no Diário Oficial da União em 27/06/2023

Decisão: DEFERIDO
O Presidente da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio do Instituto Nacional do Câncer - INCA, Dr. Martin H. Bonamino, solicita parecer técnico da CTNBio para execução de projeto de pesquisa com Organismo Geneticamente Modificado, denominado "Identificação de drivers moleculares em melanoma acral", a ser desenvolvido nas instalações da instituição, sob a responsabilidade da Dra. Patrícia A. Possik. No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a



Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico
<http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 05152023080900006

6

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



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 A1600D3

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: **A1600D3**
Usuário: **UNESP**
CPF/CNPJ: **48.031.918/0001-24**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Salmonella enterica

Título da Atividade: **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**

Equipe

Angelo Berchieri Junior	UNESP
Mauro de Mesquita Souza Saraiva	UNESP
Isabella Cardeal Campos	UNESP

Data do Cadastro: **06/01/2025 16:31:28**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:36** de **27/01/2025**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

**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**

RESUMO – O crescimento populacional resultou em uma maior demanda por proteína animal e, conseqüentemente, contribuiu para a expansão do setor avícola com uma maior densidade de aves alojadas, o que favoreceu a ocorrência e disseminação de patógenos como bactérias do gênero *Salmonella*. O tifo aviário, cujo agente etiológico é *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum - SG), é uma enfermidade sistêmica de grande importância para a avicultura industrial, face aos prejuízos por provocar mortalidade do plantel, que pode chegar a 80% ou mais. Durante a patogenia, a imunidade inata desempenha um papel importante, a bactéria invade o epitélio intestinal e é fagocitada por macrófagos atingindo órgão como baço e fígado, tem-se a formação do Vacúolo Contendo *Salmonella* (SVC) e a expressão de diversos fatores de virulência, como os codificados pelos genes da ilha de patogenicidade em *Salmonella* 2 (SPI-2), que favorecem sua sobrevivência intracelular. Estudos anteriores demonstraram que a estirpe *Salmonella* Gallinarum 287/91 contendo os genes *cobS* e *cbiA* defectivos (SG Δ *cobScbiA*), que estão envolvidos na síntese da vitamina B12 (cobalamina), apresentou um potencial como cepa vacinal. Assim, o presente estudou visou dar continuidade a trabalhos anteriores do atual grupo de pesquisa, com avaliação do comportamento da estirpe SG Δ *cobScbiA* durante a infecção de macrófagos primários de aves e células semelhantes aos macrófagos de galinhas da linhagem HD-11, comparando a captura e sobrevivência com a estirpe selvagem em 2-, 4- e 20-horas pós infecção (hpi). Os macrófagos primários de aves apresentaram uma resposta mais próxima do fisiológico, sendo uma boa alternativa para estudos *in vitro*, com diferença significativa em 2-, 4- e 20-hpi, quando comparado às células semelhantes aos macrófagos de galinhas da linhagem HD-11, que não apresentaram diferença em nenhum dos momentos avaliados. Além disso, a estirpe mutante SG Δ *cobScbiA* apresentou uma maior sobrevivência quando comparada a estirpe selvagem, o que possivelmente está associado a uma menor resposta do hospedeiro, redução da virulência da bactéria e ativação de outras vias metabólicas.

Palavras-chave: cobalamina, infecção sistêmica, macrófagos, salmonelose, tifo aviário

**EVALUATION OF THE BEHAVIOR OF THE *Salmonella* Gallinarum 287/91
STRAIN WITH DELETION OF THE *cobS* AND *cbiA* GENES DURING INFECTION
OF CHICKEN PRIMARY MACROPHAGES**

ABSTRACT – Population growth has led to an increased demand for animal protein and, consequently, has contributed to the expansion of the poultry sector with a higher density of housed birds, which has favored the occurrence and spread of pathogens such as bacteria of the genus *Salmonella*. Fowl typhoid, caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum - SG), is a systemic disease of great importance to poultry industry due to its economic impact, as it causes flock mortality rates that can reach 80% or more. During pathogenesis, innate immunity plays an important role. The bacterium invades the intestinal epithelium, is phagocytosed by macrophages, and reaches organs such as the spleen and liver. This process leads to the formation of the *Salmonella*-Containing Vacuole (SCV) and the expression of various virulence factors, including those encoded by Salmonella Pathogenicity Island 2 (SPI-2) genes, which promote intracellular survival. Previous studies have demonstrated that the *Salmonella Gallinarum* 287/91 strain, containing defective *cobS* and *cbiA* genes (*SGΔcobScbiA*), which are involved in the synthesis of vitamin B12 (cobalamin), showed potential as a vaccine strain. Thus, the present study aimed to continue previous research from this group by evaluating the behavior of the *SGΔcobScbiA* strain during the infection of primary avian macrophages and HD-11 chicken macrophage-like cells, comparing bacterial uptake and survival with the wild-type strain at 2-, 4-, and 20-hours post-infection (hpi). Chicken primary macrophages exhibited a response closer to physiological conditions, making them a suitable alternative for *in vitro* studies, with significant differences observed at 2-, 4-, and 20-hpi when compared to HD-11 macrophage-like cells, which showed no differences at any evaluated time points. Furthermore, the *SGΔcobScbiA* mutant strain demonstrated greater survival compared to the wild-type strain, which is possibly associated with a reduced host response, decreased bacterial virulence, and the activation of alternative metabolic pathways.

Key-words: cobalamin, systemic infection, macrophages, salmonellosis, fowl typhoid

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango e, segundo projeções, irá atingir o recorde de produção em 2025 (USDA, 2024). A expansão do setor avícola deve-se, principalmente, ao aumento da procura por proteína de origem animal (Godfray et al., 2018), sendo que a carne de frango se destaca pelo melhor custo-benefício (FAO, 2024). Entretanto, o aumento contínuo da produção, resultou em uma maior densidade de animais alojados, favorecendo a incidência de patógenos (EFSA et al., 2019).

Dentre as principais bactérias de interesse na avicultura, destaca-se as do gênero *Salmonella* (Antunes et al., 2016), que abriga mais de 2600 sorovares desta bactéria em duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta última subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *diarizonae*, *arizonae*, *houtenae* e *indica* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014). Nas aves, *Salmonella enterica* pode causar três enfermidades distintas: a pulorose, causada por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum; o tifo aviário, causado por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (*Salmonella Gallinarum*); o paratifo aviário, cujo agente etiológico é qualquer outro sorovar de *Salmonella enterica* (Freitas Neto et al., 2020).

Durante a patogenia do tifo aviário, a bactéria invade o epitélio intestinal e é fagocitada por macrófagos, principais células envolvidas na progressão da doença (Chappell et al., 2009). No interior dessas células, ocorre a formação do Vacúolo Contendo *Salmonella* (SVC), favorecendo a evasão do sistema imune e multiplicação bacteriana, principalmente por meio da produção de fatores de virulência (Jennings et al., 2017). Posteriormente, o macrófago contendo o SVC é transportado aos órgãos linfóides como baço e fígado, evoluindo para uma infecção sistêmica (Shaji et al., 2023).

Estudos anteriores com *Salmonella Gallinarum* 287/91 contendo os genes *cobS* e *cbiA* defectivos, que estão envolvidos na síntese de vitamina B12, demonstraram o potencial dessa estirpe como vacina, visto que não promoveu mortalidade em aves

vermelhas para a postura de ovos de mesa e conferiu uma imunidade adaptativa (Paiva et al., 2009; Penha Filho et al., 2016, 2017). Portanto, nosso trabalho teve como objetivo dar continuidade aos estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, avaliando a capacidade de captura e sobrevivência dessa estirpe de *Salmonella* Gallinarum atenuada durante a infecção de células da linhagem HD-11 e macrófagos primários de aves.

4. Conclusion

The chicken primary macrophage model, which is closer to physiological, provided more information about the host-pathogen interaction under the study conditions, 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 (CAPES) – Finance Code 001; National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) [grant numbers 175342/2023-7; 175352/2023-2].

Declaration of competing interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are in debt to Professor Fabiana Horn (Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS) for the kind donation of chicken macrophage-like cell line HD-11, which allowed the performance of the present study. Also, 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-κB in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF-κB 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>.