

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

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE PINTAINHOS DE CORTE POR
Salmonella Heidelberg CONTENDO DELEÇÃO NO GENE *ttrA*,
ttrApduA e *ttrACBS***

**Vinícius Góes
Médico Veterinário**

2023

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

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE PINTAINHOS DE CORTE POR
Salmonella Heidelberg CONTENDO DELEÇÃO NO GENE *ttrA*,
ttrApduA e *ttrACBS***

Discente: Vinícius Góes

Orientador: Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto

Coorientador: Dr. Daniel Farias Marinho do Monte

**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 Medicina Veterinária, área de
Patologia Animal**

2023

G598a Goes, Vinicius
AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE PINTAINHOS DE CORTE
POR Salmonella Heidelberg CONTENDO DELEÇÃO NO GENE
ttrA, ttrApduA e ttrACBS / Vinicius Goes. -- Jaboticabal, 2023
72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Oliveira Caetano de Freitas Neto
Coorientador: Daniel Farias Marinho do Monte

1. Respiração anaeróbica. 2. Tetracionato. 3. 1, 2-propanodiol. 4.
Paratifo aviário. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

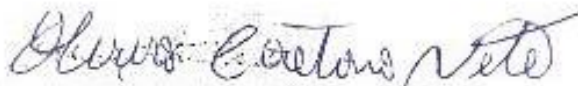
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE PINTAINHOS DE CORTE POR *Salmonella* Heidelberg CONTENDO DELEÇÃO NOS GENES *trA*, *trApduA* e *trACBS*

AUTOR: VINÍCIUS GOES

ORIENTADOR: OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

COORIENTADOR: DANIEL FARIAS MARINHO DO MONTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária,
área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / UFMG Belo Horizonte/MG



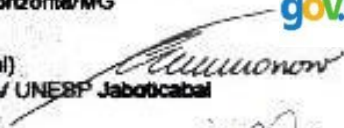
Documento assinado digitalmente

LIZANDRA AMOROSO

Data: 13/02/2023 10:00:44-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal



Prof. Dr. NELSON RODRIGO DA SILVA MARTINS (Participação Virtual)
Deplo. Medicina Veterinária Preventiva / Universidade Federal de Minas Gerais



Jaboticabal, 20 de dezembro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VINÍCIUS GÓES – Nascido em 30 de janeiro de 1996, natural de Mogi Guaçu, São Paulo, graduou-se em Medicina Veterinária em 2018, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica, com o projeto intitulado “Diagnóstico diferencial entre os biovars *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum por PCR em tempo real”. Ainda na graduação, foi monitor da disciplina de Ornitopatologia no ano de 2018 e estagiário do laboratório de ornitopatologia, departamento de patologia, entre 2015 e 2018. Iniciou o mestrado no ano de 2020, no programa de Medicina Veterinária pela mesma faculdade, sob supervisão do Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto e Dr. Daniel Farias Marinho do Monte, com enfoque na investigação da importância de genes de virulência na patologia de *Salmonella* Heidelberg em aves. Durante todo o mestrado, trabalhou nas empresas: Granja Faria – 2021 – e BRF S.A. – 2022 e 2023.

Dedico

A minha família e minha namorada Mariana.

AGRADECIMENTOS

Como não podia ser diferente, agradeço primeiramente minha família: minha mãe Luciana, meu pai João e meu irmão Rodrigo, por todo apoio e amor incondicional nesses meus 27 anos de vida.

Agradeço à minha namorada, Mariana, por todo amor, companheirismo e apoio para que fosse possível a realização deste trabalho. Eu te amo.

Ao meu orientador Oliveira e coorientador Daniel, por todo apoio durante estes dois anos de mestrado, sempre prontos para me auxiliarem nos momentos críticos e ao professor Angelo Bercheri pela disponibilidade do uso das instalações onde foram realizados os experimentos, meu muito obrigado.

Agradeço à toda equipe do laboratório de ornitopatologia: Daniel, Mauro, Júlia, Valdinete, Viviane, Adriana, Túlio, Taísa, Lucas e Marcela pela ajuda teórica e prática nos experimentos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa - 2018/03189-0, 2018/21301-2, e 2020/06076-2.

Agradeço à Aviagen pela doação dos animais para o experimento.

Agradeço à BRF por respeitar os processos do meu mestrado, principalmente quando era necessária minha ida à universidade.

Por fim, agradeço à Unesp e todos os funcionários que direta ou indiretamente foram essenciais para a realização deste trabalho.

Sumário

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
CERTIFICADO DA CTNBio	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Figuras	viii
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	1
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Gênero <i>Salmonella</i>	3
2. Paratifo aviário.....	5
3. Salmoneloses em aves.....	8
4. Patogenicidade de <i>Salmonella</i> spp	9
5. Ilhas de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>	12
5.1. SPI-1	13
5.2. SPI-2.....	15
5.3. Outras SPIs	17
REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO 2 - <i>Salmonella</i> Heidelberg side-step gene loss of respiratory requirements in chicken infection model.....	32
ABSTRACT	34
1. INTRODUCTION.....	35
2. MATERIAL AND METHODS.....	37
2.1. Bacterial strains.....	37
2.2. Construction of <i>S. Heidelberg</i> mutants.....	37
2.3. <i>In vivo</i> experiment	38
2.4. Fecal excretion	38
2.5. Evaluation of cecal colonization.....	39

2.6.	Statistical analysis	39
3.	RESULTS	41
3.1.	Deletion of <i>ttrA</i> , <i>ttrApduA</i> , or <i>ttrACBSR</i> does not impair fecal excretion in chicks	41
3.2.	Gene loss may enhance the gut colonization by <i>Salmonella</i> Heidelberg in chicks	41
4.	DISCUSSION	42
	REFERENCES	46

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

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da infecção de aves (*Gallus gallus domesticus*) por *Salmonella Heidelberg* contendo deleção do Gene *ttrA***", protocolo nº 5322/20, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 10 de dezembro de 2020.

Vigência do Projeto	05/01/2021 a 09/02/2021
Espécie / Linhagem	Frango de corte
Nº de animais	180
Peso / Idade	1 dia de vida
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Incubatório comercial

Jaboticabal, 10 de dezembro de 2020.

Profa. Dra. Fabiana Pilarski
 Coordenadora – CEUA

CERTIFICADO DA CTNBio

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Seção 1

ISSN 1677-7042

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

Sorrito-MT e de Rio Verde-GO, da empresa Nidara Seeds Brasil Ltda, bem como o requerimento da empresa Syngenta Seeds Ltda, para incorporar a Unidade Operativa de Douradinho, em Uberlândia-MG, pertencente ao CQ8 da Nidara Seeds Brasil Ltda. O requerimento poderia ter sido desmembrado em dois (exclusão e requerimento de CQ8), mas entende-se que deve representar aquisição ou fusão de empresas. O requerimento de CQ8 da Syngenta Seeds está completo, com a descrição da infraestrutura e área que ficará sob sua responsabilidade e que serão incorporadas ao CQ8 001/96. Foi apresentado um relatório de atividades dessa Unidade no último ano. A Nidara Seeds Brasil Ltda, por sua vez, apresenta também os relatórios de atividades das duas Unidades que serão excluídas de seu CQ8. Portanto, recomenda-se à CTNBio a aprovação do requerimento para exclusão do CQ8 226/06 das Unidades Operativas de Sorrito-MT e Rio Verde-GO da Nidara Seeds Brasil Ltda, com cancelamento do CQ8 226/06, bem como a inclusão da Unidade Operativa de Douradinho, em Uberlândia-MG, ao CQ8 001/96 da Syngenta Seeds Ltda.

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

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

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.110/2020

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

Requerente: Embraço Trigo.

CQ8: 058/98

Processo SI nº: 01245.002439/2020-80

Assunto: Alteração da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

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

Decisão: DEFERIDO

Ementa: A requerente solicitou à Presidente da CTNBio parecer técnico referente à nova composição da Comissão Interna de Biossegurança. Para tanto, o responsável legal da instituição enviou ato formal de alteração da CIBio, a saber: Ordem de Serviço Embraço Trigo nº 6 de 22 de julho de 2020, nomeando Ana Lídia Vaziani Boratto (Presidente), Ricardo Lima de Castro, Jordalen Buffet Mariz, Aloisio Alcântara Vilarinho, Ilene Yamazaki Lau e Ricardo Costa Leão, para comporem a CIBio local.

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

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

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.111/2020

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

Requerente: Embraço Agrogenética.

CQ8: 345/12

Processo SI nº: 01245.002796/2020-87

Assunto: Alteração da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

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

Decisão: DEFERIDO

Ementa: A requerente solicitou à Presidente da CTNBio parecer técnico

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.115/2020

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

Processo: 01245.002473/2020-63

Requerente: DuPont do Brasil - Divisão Pioneer Semences SA

CQ8: 013/97

Assunto: Extensão de CQ8.

A CTNBio, após análise do pedido de extensão de CQ8, deliberou pelo DEFERIMENTO conforme esse parecer técnico. A requerente solicita revisão para atualização do Escritório, Sala de Manipulação de Sementes, Sala de Tratamento de Sementes e Área de Secadores e extensão de CQ8 para inclusão da Câmara fria, Galpão de máquinas, Sala de estufa, Área de Campo (23,8 ha). As atividades a serem desenvolvidas serão: pesquisa em regime de contenção, liberação planejada no meio ambiente, transporte, avaliação de produto, detecção e identificação de OGM, descarte e armazenamento de plantas geneticamente modificadas pertencentes à Classe de Risco 01.

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

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

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.117/2020

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

Processo SI nº: 01250.010132/2020-12

Requerente: Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus Jaboticabal

Endereço: Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n - Jaboticabal

SP, CEP: 13800-000

CQ8: 044/98

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

Extrato Prévio: 6969/2020, publicado no Diário Oficial da União em 19/03/2020

Decisão: DEFERIDO

A requerente, por meio de seu representante legal, solicitou parecer técnico da CTNBio referente ao Projeto: "Avaliação da deleção de genes sobre a patogenicidade de estirpes de *Salmonella* spp. em aves comerciais". Título do Subprojeto 01: "Efeito da deleção do gene *mgc* sobre a patogenicidade de *Salmonella* gallinarum em aves suscetíveis". Título do Subprojeto 2: "Avaliação da infecção de aves (*Gallus gallus domesticus*) por *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella Heidelberg* contendo deleção dos genes *trxA* e *galA*". 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 exerce o requerimento do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE PINTAINHOS DE CORTE POR *Salmonella* Heidelberg CONTENDO DELEÇÃO NO GENE *ttrA*, *ttrApduA* e *ttrACBS*

RESUMO – *Salmonella* Heidelberg (SH) é uma enterobactéria que pode afetar frangos comerciais, ocasionando prejuízos econômicos relevantes na avicultura, além de ser uma séria preocupação para a saúde pública em escala global. Após a colonização do intestino, *Salmonella* spp. faz uso de mecanismos associados às Ilhas de Patogenicidade (SPI), modificando o microambiente, e consequentemente induzindo uma resposta inflamatória benéfica para sua sobrevivência. A indução da inflamação, desencadeia a produção do tetrionato que é utilizado como acceptor de elétrons, promovendo novas fontes de carbono em ambiente anaeróbio e, assim, favorecendo a multiplicação dessa bactéria. Para utilizar o tetrionato, *Salmonella* spp. necessita da expressão de genes específicos localizados na SPI-1 e 2, como o *ttr*, *pduA* e *ttrACBS*. Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo investigar as consequências da deleção dos genes *ttrA*, *pduA* e *ttrACBS* na infecção de frangos de corte por SH. Foram construídas estirpes de SH mutante (SH Δ *ttrA*, SH Δ *ttrApduA* e SH Δ *ttrACBS*) e sua habilidade em colonizar o intestino das aves e ser excretada foi comparada à estirpe selvagem em dois experimentos. No primeiro foi avaliada a excreção fecal das quatro estirpes por 28 dias após a infecção (dpi), sendo que as estirpes SH Δ *ttrA* e SH Δ *ttrApduA* apresentaram maior excreção. No segundo experimento, a colonização cecal foi avaliada aos dois, cinco, sete, 14, 21 e 28 dpi, sendo que a estirpe SH Δ *ttrA* foi mais isolada aos 21 e 28 dpi, SH Δ *ttrApduA* foi menos isolada nos dois e sete dpi e a estirpe SH Δ *ttrACBS* não obteve diferenças estatísticas até os 28 dpi, na qual foi menos isolada nesse dia. Os resultados sugerem que mesmo sem a utilização do gene *ttrA*, *ttrApduA* e operon *ttr*, SH ainda foi capaz de colonizar o intestino da ave, possivelmente utilizando uma via alternativa para utilização de aceptores de elétrons.

Palavras-chaves: respiração anaeróbica, tetrionato, 1,2-propanodiol, paratifo aviário

INFECTION EVALUATION IN BROILER CHICKS BY *Salmonella* Heidelberg CONTAINING DELETION IN *ttrA*, *ttrApduA* and *ttrACBS* GENES

ABSTRACT – *Salmonella* Heidelberg (SH) is a enterobacterium that can affect commercial birds, causing significant economic losses in poultry industry, besides being a serious concern for public health on a global scale. After colonization of the intestine, *Salmonella* spp. makes use of mechanisms associated with *Salmonella* Pathogenicity Islands (SPI), modifying the microenvironment and consequently inducing an inflammatory response that is beneficial for its surveillance. The inflammation's induction triggers the production of tetrathionate, which is used as an electron acceptor, promoting new sources of carbon in an anaerobic environment, which favors the multiplication of this bacterium. To utilize the tetrathionate, *Salmonella* spp. requires the expression of specific genes located in SPI-1 and 2, such as *ttrA*, *pduA* and *ttrACBS*. Therefore, this study aimed to investigate the consequences of the *ttrA*, *pduA* and *ttrACBS* genes deletion in the infection of broilers by SH. Mutant SH strains (SH Δ *ttrA*, SH Δ *ttrApduA* and SH Δ *ttrACBS*) was constructed, compared to wild-type infection, in two experiments. In the first one, fecal excretion was evaluated during 28dpi and the SH Δ *ttrA* and SH Δ *ttrApduA* strain was more excreted than the wild type. In the second, cecal colonization was evaluated at two, five, seven, 14, 21 and 28dpi and SH Δ *ttrA* was more isolated at 21 and 28 dpi, SH Δ *ttrApduA* was less isolated at two and seven dpi and SH Δ *ttrACBS* did not has statistical differences up to 28 dpi, where it was less isolated on that day. The results suggest that even without the expression of the *ttrA* *ttrApduA* and operon *ttr* genes, SH is still able to stimulate intestinal inflammation and uses an alternative path of pathogenicity in the use of electron acceptors, conferring an advantage.

Keywords: anaerobic respiration, tetrathionate, 1,2-propanediol, fowl paratyphoid

Lista de Tabelas

Tabela 1. Fórmula antigênica de alguns sorotipos de <i>Salmonella</i>	4
Tabela 2. Especificidade do gênero <i>Salmonella</i>	5
Tabela 3. Ocorrência de <i>Salmonella</i> Heidelberg proveniente de produtos avícolas no Brasil e no mundo	7
Tabela 4. Ilhas de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>	19

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura do tetrionato redutase (<i>ttr</i>). Adaptado de Winter; Baumler (2011).	12
Figura 2. Organização genética das SPI-1. Adaptado de Amavisit et al. (2003); Gerlach et al. (2007).	14
Figura 3. Organização genética do locus da SPI-2, indicando a localização do gene <i>ttrA</i> . Adaptado de Hensel; Nikolaus; Egelseer (1999).	16
Figura 4. Organização genética das SPI-3, SPI-4 e SPI-5. Adaptado de Amavisit et al. (2003); Gerlach et al. (2007).	17

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* pertencente à família Enterobacteriaceae, abrange bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, fermentadoras de glicose, manitol e dulcitol, em formato de bastonetes.

Dentre os mais de 2659 sorovares identificados, aproximadamente 80-90 destes são considerados de importância para a saúde humana e animal. Entre estes, *Salmonella* Heidelberg tem ganhado destaque, principalmente nos continentes norte e sul americano e europeu.

A evolução contínua da *Salmonella* spp. adquirindo e perdendo genes, aumentou e refinou sua virulência. Como resultado, este gênero aprimorou características para seu crescimento em ambientes inflamados do intestino e, quando alcança este órgão do hospedeiro, interage com a microbiota existente e como mecanismo de patogenicidade induz à inflamação intestinal para maior crescimento em relação às outras bactérias.

Para que *Salmonella* consiga manter o ambiente inflamado, alguns fatores de virulência devem ser sintetizados e as Ilhas de Patogenicidade (SPIs), desempenham um papel fundamental nesse processo. As SPIs são regiões cromossômicas que possuem informações genéticas para codificar diferentes fatores de virulência necessários para a patogenicidade de *Salmonella* spp.

No ambiente inflamado, a bactéria se depara com um ambiente anaeróbico, portanto, sua sobrevivência depende da respiração sem utilização do oxigênio. Ocorre um aumento significativo da população de heterófilos durante a inflamação, que são responsáveis por oxidar o tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), gerando como produto desta reação o tetrationato ($S_4O_6^{2-}$). *Salmonella* spp. então, utiliza o tetrationato como aceptor de elétrons para aquisição de novas fontes de carbono na respiração anaeróbica.

Dentre as fontes de carbono existentes neste ambiente se destacam a etolonamina e o propanodiol. Este último é extensamente utilizado pela *Salmonella* como doador de elétrons e utiliza o operon *pdu* para a utilização desta fonte de carbono. Este *operon* se localiza na Ilha de Patogenicidade de *Salmonella*-1 (SPI-1) e pode ser dividido em duas partes funcionais, responsáveis pela degradação propriamente dita do propanodiol (*pduCDEPQW*) e pela formação da barreira poliedral (*pduABJKNTU*), tendo como principal efector o gene *pduA*.

Para utilização do tetrionato, vários genes devem ser expressos e o *ttrA* é o responsável por codificar as proteínas de respiração anaeróbicas utilizando o tetrionato como acceptor de elétrons, como analisado em modelos experimentais com camundongos. Este gene se localiza na SPI2 e juntamente com quatro genes (*ttrA*, *ttrC*, *ttrB*, *ttrS* e *ttrR*) em um *operon*. Quando o *ttrA* não é expresso, *Salmonella* perde a capacidade de utilizar o tetrionato como acceptor de elétrons e o 1-2 propanodiol como fonte de carbono.

Devido aos eventos citados, o fato de *Salmonella* spp. expressar os genes *ttrA* e *pduA* durante a colonização intestinal para auxiliar sua sobrevivência, corrobora com a hipótese de que, sem a expressão deste gene, seu metabolismo estará comprometido. Portanto, o propósito deste estudo foi avaliar como a *Salmonella* Heidelberg se comporta frente a colonização intestinal de aves, sem a expressão do gene *ttrA*, *pduA* e operon *ttA*

REVISÃO DE LITERATURA

1. Gênero *Salmonella*

A primeira descrição do gênero *Salmonella* foi feita no ano de 1866, porém, no início acreditava-se ser a causadora da cólera suína. Posteriormente, foi descoberto que o agente causador desta doença era na verdade viral e que a bactéria do gênero *Salmonella* era um agente secundário (Schultz, 2008). No ano de 1885, o gênero foi, por fim, identificado pelo pesquisador americano Dr. Daniel E. Salmon.

Pertencente à família Enterobacteriaceae, a classificação e identificação de *Salmonella* é complexa e diversos pesquisadores utilizam diferentes modos para referencia-la. Atualmente, o sistema mais aceito para a nomenclatura do gênero é a divisão em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bangori* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014). A primeira espécie é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, abrangendo um total de 2637 sorovares. Já a segunda espécie, *bangori*, é formada por apenas 22 sorovares (Grimont e Weill, 2007)

Os sorovares de *Salmonella*, seguem a dinâmica de identificação desde 1930, utilizando o esquema de White-Kauffmann-Le Minor, baseado na sorologia e bioquímica dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). O antígeno de virulência Vi nem sempre está presente (Grimont e Weill, 2007).

A composição e estrutura dos polissacarídeos que constituem uma parte da estrutura da superfície celular (porção mais externa), comum em todos os sorovares de *Salmonella*, permitem o reconhecimento e diferenciação de antígenos O (Le Minor, 1982; Guthrie, 1991; Holt et al., 1994).

Presentes no flagelo das enterobactérias móveis, estão os antígenos H. São compostos por uma proteína chamada flagelina (Helmunt, 2000). São designados com letras minúsculas e números arábicos, nas fases 1 e 2, respectivamente (Echeita, et al.,

2022). A combinação dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) determinam o sorovar. *Salmonella* Heidelberg, por exemplo, possui os antígenos somáticos (O: 1,4,5,12) e o flagelar (H: r) (Grimont e Weill, 2007), como descrito na tabela 1.

Em casos em que duas salmonelas pertencem a um mesmo sorovar, é necessária uma subdivisão, como é o caso do sorovar Gallinarum, na qual possui uma subdivisão em biovars Gallinarum e Pullorum. Devido ao fato de ambas terem a fórmula idêntica 1,9,12:-:-, não é possível sua diferenciação apenas por métodos sorológicos, sendo necessário o uso de prova bioquímicas para a definição. Como ambos não possuem flagelos, não apresentam os antígenos H na descrição de sua fórmula antigênica. (Grimont e Weill, 2007).

Tabela 1. Fórmula antigênica de alguns sorotipos de *Salmonella*.

Sorotipo	Antígeno somático (O)	Antígeno flagelar (H)	
		Fase 1	Fase 2
S. Enteritidis	1, 9, 12	g, m	(1, 7)
S. Gallinarum	1, 9, 12	-	-
S. Heidelberg	1, 4, 5, 12	r	1, 2
S. Typhimurium	1, 4, (5), 12	i	1, 2

Adaptado de Grimont e Weill (2007)

Outra divisão comumente associada ao gênero *Salmonella*, está relacionada à especificidade da bactéria ao seu hospedeiro. De acordo com essa divisão, os sorovares de *Salmonella* podem ser específicos, restritos e generalistas (vide tabela 2). O primeiro grupo abrange aquelas causadoras de infecção em uma espécie específica de hospedeiros. Os grupos restritos são mais comuns em infecções em um determinado hospedeiro. Porém, ao contrário do primeiro grupo, não se limitam a uma espécie. Por fim, o terceiro grupo, oferece risco a diferentes hospedeiros, sem predileção por algum em especial (Hoelzer, Switt e Wiedmann, 2011; Bäümle e Fang, 2013; Gal-mor et al., 2014).

Tabela 2. Especificidade do gênero *Salmonella*.

Sorotipo	Grupo	Hospedeiro
<i>Salmonella</i> Gallinarum	Específica	Aves
<i>Salmonella</i> Typhi	Específica	Humanos
<i>Salmonella</i> Dublin	Restritas	Bovinos (humanos)
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	Restritas	Suínos (humanos)
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Generalistas	Diversos
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Generalistas	Diversos

Salvo algumas exceções, como por exemplo *S. Typhimurium*, os sorotipos generalistas, tal qual *S. Heidelberg*, causam doenças gastrintestinais. Enquanto aqueles específicos ou restritos cursam com uma doença sistêmica, ou seja, não se restringem à gastrinterite (Sanderson e Nair, 2013).

Nesse contexto, as bactérias generalistas, também denominadas paratíficas, ganham destaque nas infecções alimentares em humanos, pois esses podem se infectar ao ingerirem ou manipularem produtos de origem animal contaminados, incluindo a carne de frango (Marus et al., 2019; Rukambile et al., 2019).

2. Paratifo aviário

A transmissão de *Salmonella* ocorre por meio da ingestão de água e/ou comida, como vegetais, ovos e carne contaminados (WHO, 2018). Incluídos neste contexto, os produtos de origem animal são os principais responsáveis por surtos de infecção alimentar em seres humanos (Rukambile et al., 2019).

Gastrinterite causada por *Salmonella* em humanos, são geralmente auto limitantes e de modo geral desaparecem entre quatro e sete dias, sem a necessidade de tratamento. Os principais sintomas apresentados por estas pessoas são diarreia, febre e dores gástricas (CDC, 2019). Por outro lado, crianças, idosos, gestantes e pessoas imunocomprometidas podem desenvolver uma forma mais grave da doença (CDC, 2019).

Dados sobre acometimento humano no Brasil são escassos. No entanto, anualmente, em torno de um milhão de pessoas são acometidas por *Salmonella* nos

Estados Unidos, resultando em 23 mil hospitalizações e 450 mortes em média (CDC, 2018). Muitos destes casos ocorrem por meio de surtos, publicados anualmente pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), como em 2014, ocasião em que ocorrência de *S. Heidelberg* proveniente de carne de frango afetou 634 pessoas (CDC, 2014).

Desde a década de 80, os sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* foram associados principalmente às infecções alimentares provenientes de produtos avícolas no Brasil. Porém, nos últimos anos houve aumento na frequência de isolados como *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Hadar* e *S. Virchow*. *S. Heidelberg* atualmente é considerado o sorovar mais isolado de produtos de origem avícola, sobretudo no Sul do Brasil. No período de 1995 a 2010, *S. Heidelberg* (40,6 %) e *S. Enteritidis* (34,2%) foram os mais frequentes dentre um total de amostras positivas para *Salmonella* spp. (Freitas Neto et al., 2009).

Em um estudo realizado por Monte et al., (2019), de 264 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de produtos avícolas no período de 2000 a 2016, nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, incluindo os estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e o Distrito Federal, *S. Heidelberg* foi o sorovar de maior ocorrência, demonstrando sua importância epidemiológica, na qual, correspondeu a expressivos 30,68%, seguida por *S. Typhimurium*, com 16,29%, *S. Infantis*, representando 13,26%, *S. Schwarzengrund* com 7,95% e por fim, com a menor frequência *S. Enteritidis*, com apenas 7,57%.

Está relatada a ocorrência de *S. Heidelberg* em todos os continentes. Em países como a Austrália, a ocorrência de *S. Heidelberg* está relacionada, principalmente, à ingestão carne vermelha e suína (Sarjit et al., 2019). Por outro lado, há diversos relatos em outros continentes como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Ocorrência de *Salmonella* Heidelberg proveniente de produtos avícolas no Brasil e no mundo.

Fonte	País	Ano de isolamento	Referência
Fezes	África do Sul	2020	Ramatla et al. (2020)
Suabes cloacais e produtos avícolas	Brasil	2020	Souza et al. (2020)
Carne de frango	Brasil	2020	Perin et al. (2020)
Suabes cloacais	Brasil	2020	Wilsmann et al. (2020)
Suabes cloacais	Egito	2019	Elhariri et al. (2019)
Carcaças	Canadá	2017	Boubendir et al. (2021)
Carcaças	Brasil	2015	Webber et al. (2019)
Carne de frango	China	2020	Lin et al. (2020)
Carcaças	Brasil	2012-2017	Rodrigues et al. (2020)
Carne de frango	EUA e Porto Rico	2013-2014	CDC (2014)
Carcaças	Brasil	2004-2006	Palmeira et al. (2016)
Produtos avícolas	Brasil	2000-2016	Monte. (2019)
Produtos avícolas	França	1993, 1997 e 2000	Cailhol et al. (2006)
Carcaças	EUA	1990-1991	Dreesen et al. (1992)
Instalações	Nova Escócia	1980	Long et al. (1980)

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), entre os anos 1968 e 2010, 71% dos isolados de *S. Heidelberg* foram oriundos de

produtos de origem avícola, indicando que esse sorovar vem se tornando motivo de preocupação para a indústria avícola (CDC, 2013).

3. Salmoneloses em aves

Nas aves existem três enfermidades causadas por *Salmonella* spp.: o tifo aviário, causado por *Salmonella* Gallinarum, a pulorose, causada por *Salmonella* Pullorum; e o paratifo aviário, causado por qualquer outro sorovar diferente dos dois primeiros (Gast et al., 2019; Berchieri Junior; Freitas Neto, 2009).

As duas primeiras são doenças hospedeiro-específico e são consideradas septicêmicas, uma vez que não se restringem ao trato gastrointestinal. O tifo aviário acomete aves em qualquer idade, porém poedeiras brancas leves são mais resistentes à doença. Quando acometidas, as aves apresentam sinais clínicos como apatia, sonolência, penas arrepiadas, queda do consumo de alimentos e diminuição da produção, além de diarreia esverdeada, característica da doença. A mortalidade pode chegar a altos patamares, ultrapassando 70% no lote acometido (Berchieri Junior; Freitas Neto, 2009; Shivaprasad, 2000).

A pulorose é uma doença grave, com alta morbidade e mortalidade, especialmente em aves jovens, manifestando sinais clínicos semelhantes ao tifo aviário, porém a diarreia se apresenta na coloração amarelada à branco amarelada (Barrow e Freitas Neto, 2011). Os dois patógenos pertencem ao mesmo biovar, devido ao fato de terem os mesmos antígenos O 1,9 e 12, fazendo com que sua diferenciação não seja possível por métodos sorológicos, necessitando de bioquímicos ou moleculares para sua diferenciação (Batista, et al., 2016)

As salmonelas paratíficas são mais comumente associadas a aves jovens, das quais são mais propensas a desenvolverem os sinais clínicos. Porém podem também acometer aves adultas (Berchieri Junior; Freitas Neto, 2009). Em aves jovens, os sinais clínicos aparecem após o quarto dia de infecção. Por outro lado, em aves com mais de 14 dias de vida, os sinais clínicos são raros e quando ocorrem são inespecíficos, com

acometimento do trato intestinal e ovário, principalmente, diminuindo os índices zootécnicos (Berchieri Junior; Freitas Neto, 2009).

De modo geral, dentre os principais sinais clínicos evidenciados pelo acometimento de salmonelas paratíficas em aves, podemos destacar: apatia, penas eriçadas e asas caídas, algumas aves apresentam diarreia aquosa com coloração variando de amarela à esverdeada e nos casos mais graves podendo levar à septicemia e morte. No exame necroscópico, em casos de septicemia aguda, não são encontradas lesões macroscópicas, enquanto que nos cursos mais crônicos, é possível notar enterite intensa com lesões necróticas em intestino delgado. No intestino grosso, em especial nos cecos, ocorre espessamento de parede com conteúdo líquido caseoso de coloração branca a branca-amarelada no lúmen intestinal. Rins, baço e fígado usualmente apresentam-se congestos, podendo ocorrer pericardite fibrino-purulenta (Berchieri Junior; Freitas Neto, 2009).

Salmonella. spp. possui capacidade de colonização em aves associada a habilidade de se ligar às células epiteliais do intestino do hospedeiro com auxílio de diferentes adesinas fimbriais ou não-fimbriais (Han et al., 2012, Richlyk, et al., 2014). A associação entre a resposta imunológica do hospedeiro e o curso da infecção estão intimamente ligadas ao sorovar e as características genéticas do hospedeiro. Em animais imunocompetentes, a infecção é transitória e o agente é, na maioria dos casos, eliminado pelo sistema imune (Wigley, 2014).

Existem diversos fatores que influenciam a colonização intestinal de salmonelas paratíficas, dentre estes destacam-se a virulência da estirpe, microbiota do hospedeiro e estresse sofrido pelas aves (Barrow, 2007; Foley et al., 2008). Ainda não está totalmente elucidada a interação entre a *Salmonella* e seu hospedeiro. No entanto diversos estudos demonstram características da virulência da estirpe que influenciam na infecção e colonização intestinal (Monte, 2020).

4. Patogenicidade de *Salmonella* spp.

Salvo a transmissão vertical, a infecção das aves por *Salmonella* spp. se inicia pela via fecal-oral (Adhikari et al., 2017). Após se instalarem no trato gastrintestinal, salmonelas paratíficas se multiplicam invadindo a mucosa entérica e órgãos linfoides como placas de Peyer e tonsilas cloacais. A homeostase da microbiota intestinal é afetada e reflete no desequilíbrio da mesma (Sadeyen, 2006).

No intestino do hospedeiro existem diversas barreiras no epitélio da mucosa que impedem ou bloqueiam a infecção por bactérias patogênicas para manter a integridade epitelial e limitar os danos associados à inflamação residente (Patel; McCormick, 2014). Outros mecanismos tais como a ação do suco gástrico, resposta imune do hospedeiro e redução da tensão de oxigênio dificultam a colonização destas bactérias patogênicas no trato gastrintestinal do hospedeiro inviabilizando os processos de patogenia e consequentemente a manifestação dos sinais clínicos (Berchieri Junior; Freitas Neto, 2009).

Entretanto, para sobreviver no organismo e superar tais barreiras, *Salmonella* desenvolve sua patogenia por meio de alguns mecanismos, como interação com o hospedeiro, capacidade de invasão, sobrevivência intracelular em macrófagos e evasão da resposta imune (Soria et al., 2013).

Uma das consequências da patogenicidade de *Salmonella* no hospedeiro é a indução da inflamação na mucosa intestinal (Winter, 2010). Para que a *Salmonella* consiga manter o ambiente inflamado, alguns fatores de virulência devem ser expressos e as Ilhas de Patogenicidade (SPI), que são regiões cromossômicas do genoma, desempenham um papel fundamental. Este arsenal enorme de fatores de virulência são mecanismos complexos que são sintetizados para regular a patogenia de *Salmonella* spp. Embora apresentem mais de 21 SPI, as SPI-1 a SPI-5 são atualmente as mais estudadas (Marcus et al., 2000).

Para que a inflamação ocorra, *Salmonella* expressa, principalmente, genes das Ilhas de Patogenicidade dos tipos 1 e 2 (SPI-1 e SPI-2), que através de proteínas secretadas que são transportadas às células da mucosa provocam a produção de citocinas pró-inflamatórias (Khan, 2014). Essas citocinas são expressas através da interação com as proteínas TRIP6 das células do hospedeiro e resultam no tropismo de

macrófagos e células dendríticas para o ambiente lesado que após serem fagocitadas, transportam a bactéria para o fígado e baço, onde inicia a infecção sistêmica (Monack et al., 2000; Coburn et al., 2007; Chappell et al., 2009).

Através da secreção de citocinas, como prostaglandina E_2 , fator de crescimento transformante beta ($TGF\beta$ - transforming growth factor β) e linfopoietina estromal tímica (TSLP - thymic stromal lymphopoietin), as células epiteliais do intestino podem regular a função dos macrófagos e células dendríticas. A $TGF\beta$ suprime a ativação do fator nuclear κB (NF κB – nuclear factor- κB), limitando assim a expressão de determinadas citocinas, como a interleucina 12 (IL-12). Esta por sua vez, é responsável pela ativação de células natural killer (NK), capazes de produzir interferon γ (IFN- γ) que ativam os macrófagos para eliminar bactérias intracelular. No entanto, durante a inflamação induzida por *Salmonella*, ocorre maior produção de interleucina 10 (IL-10), cuja função se limita a inibir a expressão de IL-12, resultando assim em maior sobrevivência do patógeno no interior das células fagocíticas (Abbas e Lichtman, 2003; Saenz et al., 2008; Coombes e Powrie, 2008).

No ambiente inflamado, a bactéria se depara com um meio anaeróbico. Portanto, sua sobrevivência depende da respiração sem utilização do oxigênio (Winter, 2010). Ocorre um aumento significativo da população de heterófilos durante a inflamação, que são responsáveis por oxidar o tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) (Furne et al., 2001), gerando como produto dessa reação o tetrionato ($S_4O_6^{2-}$) (Figura 1). A bactéria então, utiliza o tetrionato como aceptor de elétrons para aquisição de novas fontes de carbono na respiração anaeróbica (Winter, 2010). Estas novas fontes de carbono surgem após a degradação de glicanos dietéticos pelas bactérias, gerando como produtos ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato, propionato e butirato, que são utilizados posteriormente no metabolismo da *Salmonella* (Fischbach; Sonnenburg, 2011).

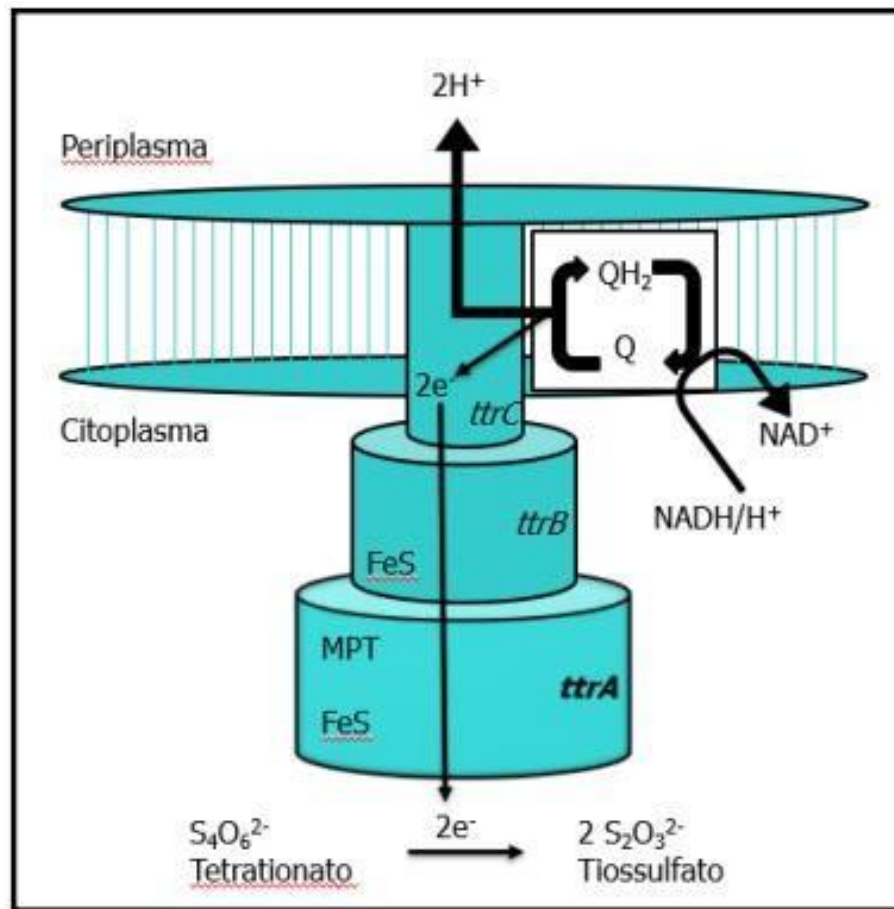


Figura 1. Estrutura do tetrionato redutase (*ttr*). Adaptado de Winter; Baumler (2011).

5. Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella*

Ilha de Patogenicidade é o termo usado para descrever elementos genéticos que atuam de forma isolada ou conjunta e se localizam dentro do cromossomo de uma bactéria (Hentschel e Hacker, 2001; Hensel, 2004). Em algumas enterobactérias, apenas uma Ilha de Patogenicidade é suficiente para torná-las patogênica, no entanto, o sucesso da infecção não se limita a possuir ou tal não recurso, uma vez que a expressão gênica e patogenicidade dependem também da interação entre o hospedeiro e o patógeno (Matulova et al., 2013).

Algumas características são comuns e compartilhadas por todas as ilhas, dentre estas, destacam-se: são inexistentes em bactérias estritamente não patogênicas; abrangem largas porções da região cromossômica (10-200kb); contém genes que conferem patogenicidade para as bactérias; estão inseridas em sítios de tRNA; e estão usualmente flanqueadas por sequências curtas (Hacker e Kaper, 2000; Hensel, 2004; Hentschel e Hacker, 2001; Marcus et al., 2000; van Asten e van Dijk, 2005).

5.1. SPI-1

Individualmente, as Ilhas de Patogenicidade apresentam características distintas. A SPI-1 (Figura 2) está localizada no centrossoma 63, e corresponde a 40 kB do genoma da *Salmonella*. Possui no total 41 genes e é flanqueado pelos genes *fhIA* e *mutS* (Mills et al., 1995). SPI-1 contém genes, assim como a SPI-2 – que será discutida posteriormente – que codificam o Sistema de Secreção Tipo 3 (TTSS), dando à bactéria a habilidade de colonizar e invadir as células epiteliais do intestino e transportar proteínas efetoras de virulência para o citosol do hospedeiro (Galán, 1999; Hansen-Wester e Hensel, 2001; Marcus et al., 2000; Ohl e Miller, 2001; Hensel, 2004). O gene *imvC*, corresponde ao maior componente estrutural da SPI-1 e estudos realizados por Galan e Curtiss (1989) demonstraram, que a deleção neste gene resultou em maior letalidade quando administrada oralmente em camundongos, porém com administração intraperitoneal não houveram diferenças significativas quando comparado com a estirpe selvagem, indicando a importância deste gene na fase inicial da infecção e não na fase sistêmica.

O TTSS codificado pela SPI-1 é regulado por fatores ambientais e genéticos. Dentre os diversos fatores, podem ser citados: presença de bile ou ácidos graxos de cadeia curta reprimem a expressão, uma vez que indicam que a *Salmonella* está na porção proximal do intestino e não na porção distal – principal sítio de invasão; outros fatores de estímulo da expressão incluem pH neutro, alta osmolaridade e presença de íon ferro (Fe^{2+}) (Garmendia et al., 2003; Altier, 2005; Ellermeyer e Schlauch, 2008).

Winter et al., (2010) demonstraram a importância dos genes *invA* e *sipB* na codificação do TTSS-1 e TTSS-2 respectivamente. Após a infecção de camundongos com mutações nos genes descritos, *S. Typhimurium* foi incapaz de induzir inflamação intestinal, uma vez que o tetratonato não foi detectado nestes animais.

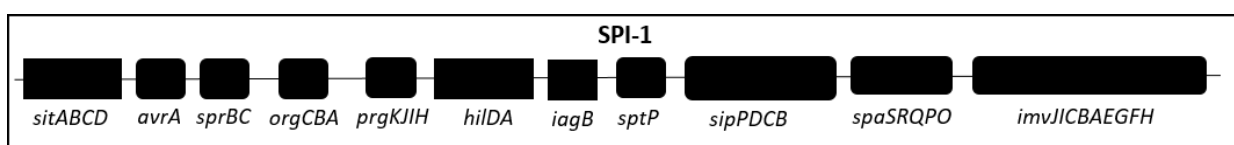


Figura 2. Organização genética das SPI-1. Adaptado de Amavisit et al. (2003); Gerlach et al. (2007).

Englobado na patogenicidade da *Salmonella* em condições anaeróbicas está a utilização do 1,2-propanodiol como fonte de carbono (Prince-Carter et al., 2001). Os genes envolvidos nesta utilização se encontram no locus *pdu*, responsável pela codificação de enzimas específicas para a degradação do 1,2-propanodiol assim, os genes podem ser divididos entre os responsáveis pela degradação do propanodiol propriamente dita – *pduCDEPQW* – e formação da barreira poliedral – *pduABJKNTU* (Bobik et al., 1999; Leal et al., 2003).

A degradação ocorre em organelas específicas chamadas Bacterial micro-compartments (MCPs) e forma aldeído tóxicos para a bactéria, na qual o gene *pduA* atua de forma majoritária na formação de barreiras poliedrais que servem como uma membrana semi-permeável, impedindo que estes compostos tóxicos cheguem à *Salmonella* (Havemann et al., 2002; Staib e Fuchs, 2015; Chowdhury et al., 2016). Foi demonstrado por Havemann et al., (2002) que mutantes de *S. Enteritidis* com deleção no gene *pduA* apresentaram um crescimento interrompido em meios com excesso de 1,2-propanodiol – consequentemente com excesso de metabólitos tóxicos –, diferente do crescimento normal em meio com baixas concentrações.

O operon *pdu* se encontra adjacente ao operon *cob*, responsável pela síntese da cobalamina (vitamina B¹²) e ambos são induzidos pela presença do 1,2-propanodiol (Escalante-Semerena e Roth, 1987). A cobalamina é um cofator utilizado na oxidação

do 1-2,propanodiol, em meio anaeróbico pelo tetrionato e embora mutação dupla nos genes *cob* *cbi* mostraram uma redução da virulência de *S. Gallinarum*, a mutação simples no gene *cobS* aumentou a virulência (Paiva et al., 2009)

5.2. SPI-2

Como fatores gerais, a SPI-2 possui papel na infecção, crescimento, sobrevivência e replicação da *Salmonella* nos macrófagos e células epiteliais (Fierer e Guiney, 2001). O locus da SPI-2 está localizado no centrossoma entre 30.5 e 31, com tamanho correspondente a 40 kB do genoma da *Salmonella* (Hensel et al., 1999; Ochman et al., 1996). A estrutura em forma de mosaico desta ilha, sugere que cada parte foi resultado de eventos de transferência distintos e separados (Hensel et al., 1999b) Dois segmentos estão disponíveis na SPI-2: uma porção maior com cerca de 25.3 kB, contendo mais de 30 genes de virulência; e outra menor, de apenas 14.5 kB, onde se encontra o cluster de 5 genes *ttr*. (Figura 3) (Hensel et al., 1999a; 1999b).

A primeira região é responsável por codificar o TTSS e é existente na espécie *S. enterica*, e ausente na *S. bangori*, sugerindo que esta porção foi adquirida pela primeira espécie após a divergência entre as duas (Hensel et al., 1997a; 1997b; Hensel et al., 1999b; Ochman e Groisman, 1996). Já a segunda, se encontra o *operon ttrRSBCA*, na qual está intimamente relacionado com a redução do tetrionato, para utilizá-lo como aceptor de elétrons (Hensel et al., 1999).

A expressão dos genes da SPI-2 é regulada pelos sistemas reguladores PhoP/PhoQ e EnvZ/OmpR. Em algumas condições como baixas concentrações de Mg^{2+} e Calcio (Ca^{2+}), PhoP induz a expressão gênica da SPI-2 por interação direta com o gene *ssrB* e ação no *ssrA*. Por outro lado, em condições de alta concentração de H^+ ($4 > pH < 5$) e baixa osmolaridade, OmpR ativa diretamente os genes *ssrA* e *ssrB* por transcrição (Deiwick et al., 1998; Feng et al., 2003; Garmendia et al., 2003; Walthers et al., 2007; Fass e Groisman, 2007).

A necessidade do tetrionato em meio anaeróbico foi evidenciada por Prince-Carter et al., (2001), na qual culturas de *S. Typhimurium* obtiveram um crescimento

esperado quando semeadas em meio com o tetrionato em diferentes substratos de carbono, incluindo acetato, etanolamina e propanodiol, não havendo multiplicação nestes meios sem a presença do tetrionato como aceptor de elétrons.

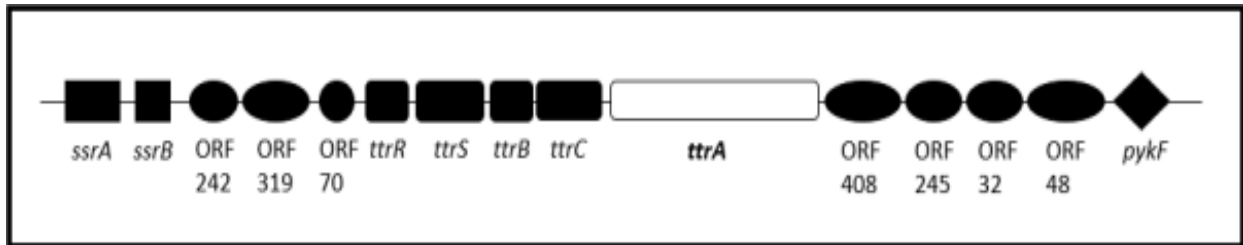


Figura 3. Organização genética do locus da SPI-2, indicando a localização do gene *ttrA*. Adaptado de Hensel; Nikolaus; Egelseer (1999).

Para utilização do tetrionato, ocorre a ativação da enzima tetrionato redutase, que pode ser subdividida em cinco subunidades: *ttrB*, *ttrC*, *ttrA*, *ttrS* e *ttrR* (Stecher et al., 2007; Winter; Baumler, 2011). Evidências científicas a respeito das subunidades do gene *ttr* são relativamente escassas, no entanto, é sabido que a subunidade *ttrA* é catalítica e contém uma porção de ferro-enxofre (FeS), assim como um cofator de molibdênio na forma de bis-Molibdopterina dinucleotídeo guanina (MGD). (Hensel et al., 1999). A molibdopterina é a responsável direta pela redução do tetrionato e encontra-se no centro ativo do gene *ttrA*. Já o *ttrB* é uma subunidade responsável por transferir cátions H^+ de *ttrC* para *ttrA*, além de possuir um domínio de ligação ferro-enxofre que é apenas processado na presença da molibdopterina (MPT) do *ttrA*. A terceira subunidade – *ttrC* – por sua vez, atua mais especificamente como uma ancoragem na membrana, assim como na liberação de prótons para o periplasma enquanto transfere elétrons para outros componentes do complexo redutase, advindos do “pool” de quinona S (Hensel et al., 1999; Hinsley e Berks, 2002; Winter; Baumler, 2011; James et al., 2013). Os outros dois genes do operon *ttr* – *ttrS* e *ttrR* – são os responsáveis pelo sistema de regulação específica do tetrionato. (Parkinson e Kofoed, 1992; Hensel, 1999).

Tanto o *ttrA* quanto *ttrB* são sintetizados pelo peptídeo de direcionamento Tat N-terminal (Hensel et al., 1999; Hinsley e Berks, 2002). Este peptídeo é responsável por direcionar proteínas para o sistema de translocação de dupla-arginina e esta transporta proteínas através da membrana interna (Palmer e Berks, 2012).

O sistema de direcionamento Tat também transporta enzimas relacionadas à molibdopterina e a ligação ferro-enzofre no que diz respeito ao *ttr*, incluindo complexos heterodiméricos como a subunidade DmsAB de dimetilsulfóxido redutase e a subunidade FdnGH de desidrogenase (Sargent, 2007).

5.3. Outras SPIs

A SPI-3 é específica de *Salmonella* spp. e está presente no centrossoma 82 e possui tamanho de 17 kB do genoma, no exato sítio de inserção *selC* RNAt onde se encontram as Ilhas de Patogenicidade de *Escherichia Coli*. Esta ilha possui 10 genes, incluindo: *mgtCB*, *rhuM*, *rmbA* e *sisA*.(Figura 4).

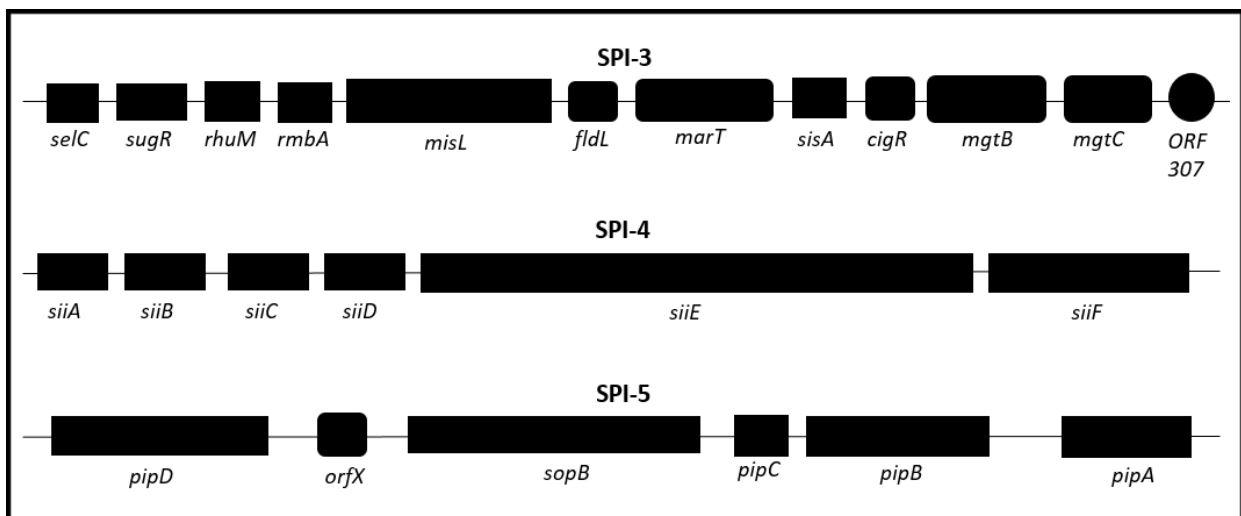


Figura 4. Organização genética das SPI-3, SPI-4 e SPI-5. Adaptado de Amavisit et al. (2003); Gerlach et al. (2007).

As funções desempenhadas pela SPI-3 demonstram a essencialidade para a virulência e sobrevivência no interior de macrófagos e crescimento em condições de baixas concentrações de magnésio (Mg^{2+}) (Blanc-Potard e Groisman, 1997; Blanc-Potard et al., 1999).

Localizado no centrossoma 92, com largura de 27 kB do genoma, está a SPI-4, flanqueada pelos locus *ssb* e *soxSR* (Wong et al., 1998) Diferente das SPI-1 e SPI-2, esta ilha é responsável por codificar o Sistema de Secreção Tipo I (T1SS) (Marcus et al., 2000). O operon *siiCDF* é expressado através da SPI-4 e análises sequenciais indicam que todos os genes do operon são transcritos juntos em uma larga fita de mRNA (Gerlach et al., 2007a; 2007b; Morgan et al., 2004; 2007). Existem indícios de que há ligação entre a regulação da SPI-1 e SPI-4, uma vez que a expressão gênica desta última é co-regulada sob condições mediadas pela primeira (Ahmer et al., 1999)

Por fim, a SPI-5 é uma região de 7,6 kB específica de *Salmonella*, localizada no centrossoma 25 e flanqueada pelos locus *serT* e *copS/copR*. (Hong e Miller, 1998; Wood et al., 1998). Esta região possui 6 genes singulares: *pipD*, *orfX*, *sopB/sigD*, *pipC/sigE*, *pipB* e *pipA* (Wood et al., 1998). A função da SPI-5 está envolvida na resposta inflamatória e secreção intestinal e se relaciona com a SPI-1 na invasão celular do hospedeiro (Norris et al., 1998; Wood et al., 1998; Mirold et al., 2001; Raffatellu et al., 2005). Todas as SPI citadas se encontram na Tabela 4.

Tabela 4. Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella*

SPI	Tamanho	Funções	Referência
SPI-1	40kb	Colonização e invasão de células epiteliais Codificação do TTSS	Hensel, 2004 Galán, 1999 Hansen-Wester e Hensel, 2001
SPI-2	40kb	Infecção, crescimento e replicação em macrófagos e células epiteliais Codificação do TTSS Redução do tetracionato	Fierer e Guiney, 2001 Hensel et al., 1999
SPI-3	17kb	Sobrevivência em macrófagos Crescimento em baixas concentrações de Mg^{2+}	Blanc-Potard e Groisman, 1997; Blanc-Potard et al., 1999
SPI-4	27kb	Codificação da T1SS Co-regulado pela SPI-1	Hong e Miller, 1998 Marcus et al., 2000
SPI-5	7,8kb	Envolvimento na resposta inflamatória e secreção intestinal Invasão celular mediada pela SPI-1	Hong e Miller, 1998; Wood et al., 1998

REFERÊNCIAS

Abbas AK e Lichtman AH, **Cellular and Molecular Immunology**. 5th ed 2003: Saunders.

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

Ahmer BM, van Reeuwijk J, Watson PR, Wallis TS, Heffron F (1999) *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. **Mol Microbiol** 31:971-982.

Altier C (2005) Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. **Journal of Microbiology** 43:85-92.

Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF; Markham PF (2003) Variation between Pathogenic Serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. **J Bacteriol** 185:3624-3635.

Barrow PA (2007) *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathology** 36:1-13.

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

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

Bäumler A, Fang FC (2013) Host specificity of bacterial pathogens. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine** 10:1-20.

Berchieri Jr. A, Murphy CK, Marston K, Barrow, PA (2001) Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology** 30:221-231.

Berchieri Jr. A, Freitas Neto OC (2009) Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI Jr. et al. **Doença das aves**. 2.ed. Campinas: Facta 435-451.

Blanc-Potard A, Groisman EA (1997) The *Salmonella* *SeiC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. **EMBO J** 16:5376-5385.

Blanc-Potard A, Solomon F, Kayser J, Groisman EA (1999) The SPI-3 Pathogenicity Island of *Salmonella enterica*. **J Bacteriol** 181:998-1004.

Bobik TA, Havemann, GD, Busch, RJ, Williams DS, Aldrich, HC (1999) The propanediol utilization (*pdu*) operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B(12)-dependent 1, 2-propanediol degradation. **J. Bacteriol** 181:5967-5975.

Boubendir S, Arsenault J, Qessy, S, Thibodeau A, Fravalo P, Theriault W, Fournaise S, Gaucher ML (2021) Research paper: *Salmonella* contamination of broiler chicken carcasses at critical steps of the slaughter process and in the environment of two slaughter plants: Prevalence, genetic profiles and association with the final carcass status. **Journal of Food Protection** 84:321-332.

Cailhol J, Lailier R, Bouvet P, Vieille SLA, Gauchard F, Sanders P, Brisabois A (2006) Trends in antimicrobial resistance phenotypes in non- 14 typhoid *Salmonellae* from human and poultry origins in France. **Epidemiology & Infection** 134:171-178.

Centers of Disease Control and Prevention CDC. (2013). **An atlas of *Salmonella* in the United States**, 1968- 2011.

Centers of Disease Control and Prevention CDC (2014) **Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Foster Farms Brand Chicken (Final Update)**.

Centers of Disease Control and Prevention CDC (2018). **National Outbreak Reporting System (NORS) Dashboard 1998-2016**. National center for emerging and zoonotic infectious diseases

Centers of Disease Control and Prevention (2019). **Salmonellosis (Nontyphoidal)**.

Chappell L, Kaiser P, Barrow PA, Jones MA, Johnston C, Wigley P (2009) The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 128:53-59.

Chowdhury C, Chun S, Sawaya MR, Yeates TO, Bobik TA (2016). The function of the *PduJ* microcompartment shell protein is determined by the genomic position of its encoding gene. **Molecular Microbiology** 101:770-783.

Coburn B, Sekirov I, Finlay BB (2007) Type III secretion systems and disease. **Clinical Microbiology Reviews** 20:535-49.

Coombes JL, Powrie F (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. **Nature Reviews Immunology** 8:435-46.

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

Deiwick J, Nikolaus T, Shea JE, Gleeson C, Holden DW, Hensel M (1998) Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. **Journal of Bacteriology** 180:4775-4780.

Dreesen DW, Barnhart HM, Burke JL, Chen T, Johnson DC (1992) Frequency of *Salmonella* Enteritidis and other *salmonellae* in the ceca of spent hens at time of slaughter. **Avian Diseases** 36:247-250.

Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, Usera MA (2022) Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. **Research in Microbiology** 153:107-113.

Elhariri M, Elhelw R, Selim S, Ibrahim M, Hamza D, Hamza E (2020) Virulence and Antibiotic Resistance Patterns of Extended-Spectrum Beta-Lactamase_Producing *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Isolated from Broiler Chickens and Poultry Workers: A Potential Hazard. **Foodborne Pathogens and Disease** 17:373-381.

Ellermeier JR, Slauch JM (2008) Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. **Journal of Bacteriology** 190:476-86.

Escalante-Semerena JC, Roth JR (1987). Regulation of cobalamin biosynthetic operons in *Salmonella* Typhimurium. **J. Bacteriol** 196:2251-2258.

Fass E, Groisman EA (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. **Current Opinion in Microbiology** 12:199-204.

Feng X, Oropeza R, Kenney LJ (2003) Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. **Molecular Microbiology** 48:1131-1143.

Fierer JDG (2001) Guiney. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. **J Clin Invest** 107:775-780.

Fischbach MA, Sonnenburg JL (2011) Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. **Cell Host and Microbe** 10:336-347.

Foley SL, Lynne AM, Nayak R (2008) *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **Journal of Animal Science, Champaign** 86:149-162.

Freitas Neto OC, Lages SL, Carrasco AT, Berchieri JR A (2009) Search for *Salmonella* spp. in ostrich productive chain of Brazilian southeast region. **Tropical Animal Health And Production** 41:1-8.

Furne J, Springfield J, Koenig T, Demaster E, Levitt MD (2001) Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: A specialized function of the colonic mucosa. **Biochemical Pharmacology** 62:255-259.

Galán JE, Curtiss R (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 86:6383-6387.

Galán JE (1999) Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. **Curr Opin Microbiol** 2:46-50.

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

Garmendia J, Beuzon CR, Ruiz-Albert J, Holden DW (2003) The roles of *SsrA-SsrB* and *OmpR-EnvZ* in the regulation of genes encoding the *Salmonella* Typhimurium SPI-2 type III secretion system. **Microbiology** 149:2385-2396.

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

Gerlach RG, Jäckel D, Geymeier N, Hensel M (2007a) *Salmonella* Pathogenicity Island 4-Mediated Adhesion Is Coregulated with Invasion Genes in *Salmonella enterica*. **Infect Immun** 75:4697-4709.

Gerlach RG, Jäckel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt WD, Hensel M (2007b) *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type I secretion system. **Cell Microbiol** 9:1834-1850.

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

Guthrie R (1991) Taxonomy and Grouping of the *Salmonella*. **Salmonella** 23-40.

Hacker J, Kaper JB (2000) Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. **Ann Rev Microbiol** 54:641-679.

Han J, Lynne AM, David DE, Tang H, Xu J, Nayak R, Kaldhane PK, Logue CM, Foley SL (2012). DNA sequence analysis of plasmids from multidrug resistant *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates. **PloS ONE** 7:1-8.

Hansen-Wester I, Hensel M (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes Infect** 3:549-559.

Helmuth R (2000) Antibiotic Resistance in *Salmonella*. **Salmonella in Domestic Animals** 6:89-106.

Hensel M (REVIEW) (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **Int J Med Microbiol** 294:95-102.

Hensel M, Hinsley AP, Nikolaus T, Sawers G, Berks BC (1999a) The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella* Typhimurium. **Mol Microbiol** 32:275-287.

Hensel M, Nikolaus T, Egelseer C (1999b) Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. **Mol Microbiol** 31:489-498.

Hensel M, Shea JE, Bäumler AJ, Gleeson C, Blattner F, Holden DW (1997a) Analysis of the Boundaries of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 and the Corresponding Chromosomal Region of *Escherichia coli* K-12. **J Bacteriol** 179:1105-1111.

Hensel M, Shea JE, Raupach B, Monack, D, Falkow S, Gleeson C, Kubo T, Holden DW (1997b) Functional analysis of *ssaJ* and *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. **Mol Microbiol** 24:155-167.

Hentschel U, Hacker J (2001) Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. **Microbes Infect** 3:545-548.

Hinsley AP, Berks BC (2002) Specificity of respiratory pathways involved in the reduction of sulfur compounds by *Salmonella enterica*. **Microbiology** 148:3631-3638.

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

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994) **Bergey's Manual of determinative Bacteriology**. Baltimore, Williams and Wilkins 8:787.

Hong KH, Miller VL (1998) Identification of a Novel *Salmonella* Invasion Locus Homologous to *Shigella ipgDE*. **J Bacteriol** 180:1793-1802.

James MJ, Coulthurst SJ, Palmer T, Sargent F (2013) Signal peptide etiquette during assembly of a complex respiratory enzyme. **Molecular Microbiology** 90:400-414.

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX (2014) Supplement 2008– 2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. **Research in Microbiology** 165:526-530.

Khan CMA (2014) The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota, with in the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. **International Scholarly Research Notices** 2014:1-23.

- Le Minor L, Veron M, Popoff M (1982) A proposal for *Salmonella* nomenclature. **Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie** 133:245-254.
- Leal NA, Havemann GD, Bobik TA (2003) *PduP* is a coenzyme-a-acylating propionaldehyde dehydrogenase associated with the polyhedral bodies involved in B12-dependent 1,2-propanediol degradation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Arch. Microbiol** 180:353-361.
- Lin D, Yan M, Lin S, Chen S (2014) Increasing prevalence of hydrogen sulfide negative *Salmonella* in retail meats. **Food Microbiology** 43:1-4.
- Long JR, Dewitt WF, Ruet JL (1980) Studies on *Salmonella* from floor litter of 60 broiler chicken houses in Nova Scotia. **Canadian Veterinary Journal** 21:91-94.
- Matulova M, Varmuzova K, Sisak F, Havlickova H, Babak V, Stejskal K, Zdrahal Z, Rychlik I (2013) Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Vet Res** 44:37.
- Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection / Institut Pasteur, Paris** 2:145-156.
- Marus JR, Magee MJ, Manikonda K, Nichols MC (2019) Outbreaks of *Salmonella enterica* infections linked to animal contact: Demographic and outbreak characteristics and comparison to foodborne outbreaks—United States, 2009–2014. **Zoonoses and Public Health** 66:370-376.
- Mills DM, Bajaj V, Lee CA (1995) A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. **Mol Microbiol** 15:749-759.
- Mirolid S, Ehrbar K, Weissmüller A, Prager R, Tshcäpe H, Rüssmann H, Hardt W (2001) *Salmonella* Host Cell Invasion Emerged by Acquisition of a Mosaic of Separate Genetic Elements, Including *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI1), SPI5 and *SopE2*. **J Bacteriol** 183:2348-2358.
- Monack DM, Hersh D, Ghorri N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S (2000). *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid fever. **The Journal of Experimental Medicine** 192:249-258.

Monte DFM (2019) **Genome-wide characterization of *Salmonella enterica* serovars circulating in the Brazilian animal food production chain**. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Norris FA, Wilson, MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW (1998). *SopB*, a protein required for virulence of *Salmonella* Dublin, is an inositol phosphate phosphatase. **Proc Natl Acad Sci USA** 95:14057-14059.

Ochman H, Groisman EA (1996) Distribution of Pathogenicity Islands in *Salmonella* spp. **Infect Immun** 64:5410-5412.

Ohl ME, Miller SI (2001) *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Ann Rev Med** 52:259-274.

Paiva JB, Penha Filho RA, Arguello YM et al. (2009) A defective mutant of *Salmonella enterica* Seroovar Gallinarum in cobalamin biosynthesis is avirulent in chickens. **Braz J Microbiol** 40:495-504.

Palmeira A, Santos LR, Borsoi A, Rodrigues LB, Calasans M, Nascimento VP (2016) Serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from turkey and broiler carcasses in Southern Brazil between 2004 and 2006. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo** 58:1-5.

Palmer T, Berks BC (2012) The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. **Nature Reviews Microbiology** 10:483-496.

Parkinson JS, Kofoed EC (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. **Annu Rev Genet** 26:71-112.

Patel S, McCormic BA (2014) Mucosal inflammatory response to *Salmonella* Typhimurium infection. **Frontiers in Immunology** 5:1-10.

Perin AP, Martins BTF, Barreiros MAB, Yamatogi RS, Nero LA, Bersot LS (2020) Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility 17 of *Salmonella* sp. isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 51:335-345.

Prince-Carter M, Tingey J, Bobik TA, Roth JR (2001) The Alternative Electron Acceptor Tetrathionate Supports B12-Dependent Anaerobic Growth of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on Ethanolamine or 1,2-Propanediol. **Journal of Bacteriology** 183:2463-2475.

Raffatellu M, Wilson RP, Chessa D, Andrews-Polymenis H, Tran QT, Lawhon S, Khare S, Adams LG, Bäumler AJ (2005) *SipA*, *SopA*, *SopB*, *SopD*, and *SopE2* Contribute to *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Invasion of Epithelial Cells. **Infect Immun** 73:146-154.

Ramatla TA, Mphuthi N, Ramaili T, Taioe MO, Thekiso OMM, Syakalima M (2020) Molecular detection of virulence genes in *Salmonella* spp. isolated from chicken faeces in Mafikeng, South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association** 91:1-7.

Richlyk I, Elsheimer-Matulova M, Kyrova K (2014) Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. **Veterinary Research** 45:119-133.

Rodrigues IBBE, Silva RL, Menezes J, Machado SCA, Rodrigues DP, Pamba C, Abreu DLC, Nascimento ER, Aquino MHC, Pereira VLA (2020) High Prevalence of Multidrug-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* Recovered from Broiler Chickens and Chicken Carcasses in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science** 22:1-6.

Rukambile E, Sintchenko V, Muscatello G, Kock R, Alders R (2019) Infection, colonization and shedding of *Campylobacter* and *Salmonella* in animals and their contribution to human disease: A review. **Zoonoses and Public Health** 66:562-578.

Sadeyen JR (2006) *Salmonella* carrier-state in hens: study of host resistance by a gene expression approach. **Microbes and Infection** 8:1308-1314.

Saenz SA, Taylor BC, Artis D (2008) Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. **Immunological Reviews** 226:172-190.

Sanderson KE, Nair S (2013) Taxonomy and Species Concepts in the Genus *Salmonella*. In: BARROW PA, METHNER U (Eds.). ***Salmonella* in Domestic Animals**. 2. ed. Oxfordshire: CAB International p. 1-19.

Schultz M, Smith T (2008) **Emerging Infectious Diseases** 14:1940-1942.

Saraiva MMS, Alves LBR, Monte DFM (2021) Deciphering the role of *ttrA* and *pduA* genes for *Salmonella enterica* serovars in a chicken infection model. **Avian Pathol** 50:257-268.

Sargent F (2007) Constructing the wonders of the bacterial world: biosynthesis of complex enzymes. **Microbiology** 153:633-651.

Sarjit A, Ravensdale JT, Coorey R, Fegan N, Dykes GA (2019) Draft Genome Sequences of Four Antibiotic-Resistant *Salmonella* Strains Isolated from Australian Red Meat Animal Species. **Microbiology Resource Announcements** 8:1-3.

Shivaprasad HL (2000) Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue Scientifique et technique** 19:405-424.

Soria MC, Soria MA, Bueno DJ, Terzolo HR (2013) Comparison of 3 culture methods and PCR assays for *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum detection in poultry feed. **Poultry Science** 92:1505-1515.

Souza AIS, Saraiva MMS, Casas MRT, Oliveira GM, Cardozo MV, Benevides VP, Barbosa FO, Freitas Neto OC, Almeida AM, Berchieri Junior A (2020) High occurrence of β -lactamase-producing *Salmonella* Heidelberg from poultry origin. **PLoS One** 15:1-11.

Stecher B, Robbiani R, Walker AW et al. (2007) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. **PLoS Biol** 5:2177-2189.

Staib L, Fuchs TM (2015). Regulation of fucose and 1, 2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Frontiers in Microbiology** 6:1-11.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon, JI (2007). The human microbiome project. **Nature** 449:804-810.

van Asten AJAM, van Dijk JE (2005) Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunol Med Microbiol** 44:251-259.

Walthers D, Carroll RK, Navarre WW, Libby SJ, Fang FC, Kenney LJ (2007) The response regulator *SsrB* activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. **Molecular Microbiology** 65:477-493.

Webber B, Borges KA, Furian TQ, Rizzo NN, Tondo EC, Santos LR, Rodrigues LB, Nascimento VP (2019) Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 61:1-7.

Wigley P (2014) *Salmonella enterica* in the Chicken: How it has Helped Our Understanding of Immunology in a Non-Biomedical Model Species. **Front Immunol** 5:1-7.

Wilsmann DE, Carvalho D, Chitolina GZ, Borges KA, Furian TQ, Martins AC, Webber B, Nascimento VP (2020) Electrochemically-Activated Water Presents Bactericidal Effect Against *Salmonella* Heidelberg Isolated from Poultry Origin. **Foodborne Pathogens and Disease** 17:228-233.

Wigley P (2014) *Salmonella enterica* in the Chicken: How it has Helped Our Understanding of Immunology in a Non-Biomedical Model Species. **Front Immunol** 5:1-7.

Winter SE, Baumler AJ (2011) A breath-taking feat: to compete with the gut microbiota, *Salmonella* drives its host to provide a respiratory electron acceptor. **Gut Microbes** 2:57-60.

Winter SE, Winter, MG, Godinez I, Yang HJ, Rüßmann, H, Andrews-Polymenis, HL, Bäuml, AJ (2010) A rapid change in virulence gene expression during the transition from the intestinal lumen into tissue promotes systemic dissemination of *Salmonella*. **PLoS Pathogens** 6:1-13.

Wong K, McCelland M, Stillwell LS, Sisk EC, Thurston SJ, Saffer JD (1998) Identification and Sequence Analysis of a 27-Kilobase Chromosomal Fragment Containing a *Salmonella* Pathogenicity Island Located at 92 Minutes on the Chromosome Map of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. **Infect Immun** 66:3365-3371.

Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. **Mol Microbiol** 29:883-891.

World Health Organization (WHO) (2018) ***Salmonella* (non-typhoidal)**.

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

CAPÍTULO 2 - *Salmonella* Heidelberg side-step gene loss of respiratory requirements in chicken infection model

RESEARCH ARTICLE

***Salmonella* Heidelberg side-step gene loss of respiratory requirements in chicken infection model**

Vinícius Góes^{1†}, Daniel F. M. Monte^{1*†}, Mauro de Mesquita Souza Saraiva¹, Adriana Maria de Almeida¹, Julia Memrava Cabrera¹, Lucas Bocchini Rodrigues Alves¹, Taísa Santiago Ferreira¹, Tulio Spina de Lima¹, Valdinete P. Benevides¹, Paul A. Barrow², Oliveira Caetano de Freitas Neto³, Angelo Berchieri Junior¹

¹Laboratory of Avian Pathology, Department of Pathology, Theriogenology, and One Health, São Paulo State University (FCAV-Unesp), Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil.

²School of Veterinary Medicine and Science, University of Surrey, Guildford GU2 7AL, United Kingdom. ³Department of Preventive Veterinary Medicine, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG ,31270-901, Brazil.

† Vinícius Góes and Daniel F. M. Monte contributed equally to this article.

***Corresponding author:** Dr. Daniel F. M. Monte, monte_dfm@alumni.usp.br, or Dr. Angelo Berchieri Junior, angelo.berchieri@unesp.br.

One sentence summary: Our molecular-*in vivo* combined approach constitutes a useful means to decipher the role of tetrathionate and 1,2-propanediol genes for *Salmonella* Heidelberg in a chicken infection model.

ABSTRACT

Among the important recent observations involving anaerobic respiration was that an electron acceptor produced as a result of an inflammatory response to *Salmonella* Typhimurium generates a growth advantage over the competing microbiota in the lumen. Here we sought to compare, whether *Salmonella* Heidelberg strains lacking the *ttrA*, *ttrApduA*, and *ttrACBSR* genes experience a disadvantage during cecal colonization in broiler chicks. In contrast to expectations, we found that the gene loss in *S. Heidelberg* potentially confers an increase in fitness in the chicken infection model. These data argue that *S. Heidelberg* may trigger an alternative pathway involving the use of an alternative electron acceptor, conferring a growth advantage for *S. Heidelberg* in chicks.

Keywords: anaerobic respiration, *Salmonella* Heidelberg, tetrathionate, 1,2-propanediol

1. INTRODUCTION

Salmonella enterica subsp. *enterica* remains a major public health concern, and their infections cause a substantial global burden (Majowicz et al. 2010). The continuous evolution of *Salmonella enterica* by acquiring and losing genes has enhanced and refined the virulence of this pathogen (Vernikos, Thomson and Parkhill 2007; Koskiniemi et al. 2012; Langridge et al. 2015). As a result, the fitness effects of the flux of genome size and content could provide a potential driving force for a growth advantage for *S. enterica* serovars over the competing microbiota in the lumen of the inflamed gut (Koskiniemi et al. 2012; Galán 2021).

Although infections caused by *Salmonella* Heidelberg have increased in North America, Europe and South America (Foley et al. 2011; Antunes et al. 2016; Melo et al. 2021), little is known about the virulence strategies used by *S. Heidelberg* during intestinal infection and its response to the gut-associated microbial community, resulting in colonisation, particularly in poultry and how this may differ from that of other serotypes studied in greater detail (Chaudhuri et al. 2013). Most interestingly, gut inflammation enhances the growth of *Salmonella enterica* by using tetrathionate as a respiratory electron acceptor and 1,2-propanediol and ethanolamine as electron donors (Winter et al. 2010; Winter, Lopez and Bäumler 2013; Faber et al. 2017). However, these studies were carried out with mice. In this regard, we have studied the role of *ttrA* and *pduA* genes for *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in the chicken infection model (Barrow et al. 2015; Saraiva et al. 2021). These investigations emphasize the complexities of the utilization of 1,2-propanediol or ethanolamine as carbon sources with tetrathionate as electron acceptor by *S. enterica* serovars during infection, since although mutations in *ttrA* mutants of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* showed enhanced pathogenicity in broiler chicks compared to layers, the deletion of *ttrA* and *pduA* genes did not impair gut colonization (Saraiva et al. 2021). These observations were remarkable since cobalamin (vitamin B₁₂) is a co-factor used in the 1,2-propanediol oxidation by tetrathionate and although double *cob cbi* mutants show

reduced virulence in *S. Gallinarum*, a single *cobS* mutation increases virulence (Paiva et al. 2009). Based on our previous results and considering the variation in the colonisation characteristics of *Salmonella* serovars, there was clear value in exploring these aspects of anaerobic respiration during colonisation in this serovar which is becoming epidemiologically more important both as a result of its prevalence in different countries and also its increasing antimicrobial resistance (Foley and Lynne 2008; Monte et al. 2019; EFSA et al. 2021). To do this, we performed an *in vivo* experiment using one-day-old broiler chicks challenged by three defective *S. Heidelberg* mutant strains carrying deletions in *ttrA*, *ttrApduA*, and *ttrACBSR* genes.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Bacterial strains

Salmonella Heidelberg wild-type strain (Lab ID: SH203) was routinely grown in Lysogeny Broth and Lysogeny agar (LB – Becton Dickinson, Maryland, USA) at 37°C. Spontaneous mutants of the *S. Heidelberg* wild-type strain resistant to nalidixic acid (100 µg/mL) or nalidixic acid (100 µg/mL) plus spectinomycin (100 µg/mL) were selected to facilitate recovery of the *S. Heidelberg* mutant strains (SH Δ *ttrA*, SH Δ *ttrA* Δ *pduA*, and SH Δ *ttrACBSR*) and *S. Heidelberg* wild-type (SH-wt), respectively, during the *in vivo* experiment.

2.2. Construction of *S. Heidelberg* mutants

The Lambda-Red technique was used to generate the SH Δ *ttrA* mutant with the gene replaced by a chloramphenicol cassette, SH Δ *ttrA* Δ *pduA* with a kanamycin cassette replacement for *pduA* and SH Δ *ttrACBSR* with the genes replaced by a kanamycin cassette (Datsenko and Wanner 2000). All primers used in this study are listed in Table S1 (Supporting Information). For all mutants, the bacteriophage P22A lysates of the resultant strains were used to transduce each mutation (*ttrA*, *ttrApduA*, and *ttrACBSR*) to a clean parental genetic background. The antimicrobial markers (chloramphenicol and kanamycin) were removed from their chromosomes by transformation using pCP20 plasmid (Datsenko and Wanner 2000). Subsequently, successive passages in LB broth at 42°C were carried out before streaking onto LB agar supplemented or not with antimicrobials to confirm the completely removal of the resistance cassettes. We also assessed complete lipopolysaccharide (smoothness) by absence of agglutination using 1:1000 acriflavine with smooth mutants selected and stored at -80°C in Lysogeny broth supplemented with 30% glycerol for future use (Alves Batista et al. 2018).

2.3. *In vivo* experiment

The experiments were performed according to the Ethical Principles on Animal Experimentation from the Brazilian College of Animal Experimentation and previously approved by the Ethical Committee on the Use of Animals (Process CEUA-006621/18; at May, 10th of 2018). The experiment was carried out in the Laboratory of Avian Pathology at the Faculty of Agricultural and Veterinary Science of São Paulo State University (FCAV/Unesp).

To evaluate the requirement of *ttrA*, *ttrApduA*, and *ttrACBSR* for *S. Heidelberg* infection, an *in vivo* assay was performed using 225 birds in total. One-day-old broiler chicks were obtained from a commercial hatchery. Upon arrival, sterile swabs were used to sample the bottom of the transport cardboard boxes to confirm the *Salmonella*-free status of the birds (Zancan et al. 2000). The birds were then distributed equally into five groups each of 45 birds [group 1 (infected with the *ttrA* strain), group 2 (*ttrApduA*), group 3 (*ttrACBSR*), group 4 (*S. Heidelberg* wild-type strain), and group 5 (uninfected control)] within metal cages in temperature-controlled rooms. They received sterilized water and antimicrobial-free balanced feed *ad libitum* throughout the experiment (28 days).

The birds in each group (1 to 4) were infected orally at 2 days of age with their corresponding mutant strain with group 5 remaining uninfected as a negative control. The birds were inoculated directly by gavage into the crop with 0.2 mL containing 10^8 CFU. Birds that developed severe clinical signs were euthanized humanely by cervical dislocation and were not included in the study. Fecal excretion and cecal colonization of *S. Heidelberg* were assessed over the experiment as outlined below.

2.4. Fecal excretion

Sixty birds were used to evaluate the fecal excretion, 15 birds each from groups 1 to 4. The chicks used to assess fecal excretion were identified individually by leg-bands and cloacal swabs and were swabbed exclusively twice a week throughout 28 days

post-infection (dpi). Swabs were transferred into 2 mL of Selenite Broth supplemented with 0.04% of novobiocin (SN – Becton Dickinson, Maryland, USA) and incubated for 24 hours at 37°C. Subsequently, they were streaked onto Brilliant Green Agar (BGA – Oxoid, UK) supplemented with 100 µg/mL of nalidixic acid for mutant strains (100 µg/mL) with or without spectinomycin (100 µg/mL), incubated for 24 hours at 37°C. Presumptive *Salmonella* colonies were confirmed using Triple Sugar Iron Agar (TSI - Oxoid, UK), Lysine Iron Agar (LI - Oxoid, UK), and Sulphide Indole Motility (SIM - Oxoid, UK) tests followed by slide agglutination test using *Salmonella* O and H Polyvalent antisera (anti-O – Bio-Rad, USA). We further checked colonies for roughness using acriflavine and strains recovered were confirmed by PCR.

2.5. Evaluation of cecal colonization

In order to enumerate bacteria, five birds from each group were euthanized at two, five, seven, 14-, 21, and 28 days post-infection (dpi). Cecal contents were homogenized directly into Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (PBS). Decimal dilutions (v/v) of the PBS homogenates were made and a 0.1 mL aliquot of each dilution was inoculated onto BGA^{Nal} or BGA^{Nal+Spc} agar plates. Concomitantly, 2x concentration of SN was added to samples (1:1), whilst plates and enriched samples were incubated at 37°C for 24 hours. The CFU/g values were normalized by log₁₀ for statistical analysis. When negative plates were obtained, enriched samples were re-streaked onto BGA^{Nal} or BGA^{Nal+Spc} plates and incubated as previously described. The value of 10² CFU/mL was assigned for positives samples for the purpose of further analysis. In addition, clinical signs and mortality were daily recorded throughout 28 dpi.

2.6. Statistical analysis

Faecal excretion data were compared by Fisher's exact test, and the logarithmically transformed values for bacterial numbers were submitted to two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test ($P < 0.05$). To evaluate

normality, the Shapiro-Wilk test was performed and data from bacterial counts were fitted into polynomial regression curve or nonlinear regression to choose the best curve for the results. The difference between areas under curves were analysed by Unpaired t-test ($P < 0.05$). All statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism, version 8.2.1.

3. RESULTS

3.1. Deletion of *ttrA*, *ttrApduA*, or *ttrACBSR* does not impair fecal excretion in chicks

To determine whether *S. Heidelberg* strains with deletions in *ttrA*, *ttrApduA*, or *ttrACBSR* genes affect their colonization of the gut, we evaluated fecal excretion for four weeks. Compared to the wild-type strain, excretion of the $\Delta ttrACBSR$ mutant was not statistically significantly different ($P > 0.05$) (Fig. 1). In contrast, the mutant strains carrying deletions in *ttrA* or *ttrApduA* were excreted in significantly higher numbers than the parental wild-type strain during the experimental period ($P < 0.01$; Fig. 1).

3.2. Gene loss may enhance the gut colonization by *Salmonella Heidelberg* in chicks

During the first 5 days p.i. there was little significant difference in bacterial enumeration of the four strains (Fig. 2). At day 7 the parent strains and $\Delta ttrACBSR$ mutant were isolated in significantly higher numbers than either $\Delta ttrA$ or $SH\Delta ttrApduA$. After this time, the latter two mutants began to predominate and did so until day 28 when the experiment was terminated.

4. DISCUSSION

We sought to compare in this study, whether *S. Heidelberg* strain lacking tetrathionate respiration and 1,2-propanediol genes confers a disadvantage during cecal colonization in broiler chicks.

First, we deleted the *ttrA* gene to investigate if this single mutation could attenuate the *S. Heidelberg* strain. The present report is the first to test the hypothesis that a single mutation in tetrathionate respiration (*ttrA*) might contribute to inhibition of *S. Heidelberg* growth in the gut lumen. Our results indicate that this mutant colonised the ceca more effectively at 21 and 28 dpi, instead of showing reduction in cecal colonization and virulence of *S. Heidelberg*.

Second, we constructed a strain carrying deletion in *ttrApduA* genes to confirm previous results obtained in the mouse model. Winter et al. (2010) and Faber et al. (2017) found that generation of this electron acceptor during 1,2-propanediol utilization produced a growth advantage for *S. Typhimurium* over the competing microbiota in the inflamed intestine. It was thus puzzling that *S. Typhimurium* with defective tetrathionate respiration provided a growth advantage for *S. Typhimurium* in young chickens as recently reported by Saraiva et al. (2021). In that study, double *ttrApduA* mutants generally colonized the alimentary tract of very young chickens better than the parent colonize and were isolated from the liver and spleen more frequently indicating little effect on invasion and virulence in these young birds.

At first glance, these dissimilarities appear to be related to physiological differences between mammals and birds, but this remains unclear and further investigations are needed. It is also clear that the use of very young chickens with, at most, a rudimentary gut flora presents a very different ecological picture and challenge for colonizing bacteria since it is known that the absence of a mature gut flora facilitates colonization by *Salmonella* strains that would not normally colonise well (Nurmi and Rantala 1974; Barrow, Simpson and Lovell 1988). This may be supported by the fact that Barrow et al. (2015) found that *ttrR* and *ttrS* mutants colonized less well in birds with

a gut flora. However, it is appreciated that these two genes are regulatory and may have had different effects than deletions of structural genes or the whole operon. The inflammatory response of the intestine of day-old chickens is maybe very different to that of older birds whether or not they possess a gut flora and this deserves to be investigated further (Schokker et al. 2017).

There is a hierarchy of electron acceptor usage in the highly metabolically flexible enteric bacteria dependent on the redox conditions and the energy (ATP) generated by their utilization. Thus, nitrate reductase is energetically more favourable in terms of energy generation than other electron acceptors such as manganese, iron oxides, fumarate, DMSO and other N- and S- oxides and tetrathionate. It is thus entirely possible that, although tetrathionate is one of the least favourable electron acceptors in terms of energy generation under anaerobic redox conditions, in the presence of excessive amounts as result of the inflammatory response generated in response to *Salmonella* invasion and localized tissue destruction, it becomes the preferred acceptor. Thus, in mutants, which are unable to utilize tetrathionate other, energetically more favourable acceptors may be used and S-oxides and DMSO may also be available as a result of tissue destruction under anaerobic conditions.

Thus, considering that SH Δ *ttrA* and SH Δ *ttrApduA* mutants remained capable to colonize the ceca without attenuation, it is thus likely that these strains are still able to stimulate intestinal inflammation enabling them to compete with resident microbiota acquiring essential nutrients provided by inflamed gut (Galán 2021).

In the context of the alternative pathway, another hypothesis that supports the successful establishment of these mutants might be that the deletions effectively blocked the bacterial ability to trigger intestinal inflammation but resulted in increased replication disseminating systemically (Galán 2021). Indeed, according to nutrient repertoire available in the gut environment, *Salmonella* activates a regulatory system that influences the flux of intestinal colonization and bacterial internalization into host cells by using Enzyme IIA^{Ntr} via 1,2-propanediol and propionate catabolism (Yoo et al. 2017).

Nonetheless, for these reasons stated above, we wondered if, after removal of *ttr* operon [see the *ttr* operon architecture by Price-Carter et al. (2001)], a different response might match the observations in the literature, and if so, whether such mutation could favour an attenuated mutant. Therefore, we revisited the mutation by deleting the complete *ttr* operon in an attempt to block the ability of *S. Heidelberg* to stimulate inflammatory signalling and subsequently to secure carbon sources and electron acceptors.

In our third attempt, we provide compelling experimental support that tetrathionate respiration is dispensable in the chicks infection model by constructing a third mutant carrying a deletion in *ttr* operon ($SH\Delta ttrACBSR$). Although this strain did not have higher counts during the 28 dpi, we cannot yet consider it a significant attenuation, since on days 2, 5, 14, and 21 post-infection there was no statistical difference in comparison to SH-wt, which in principle ruled out our third hypothesis using chicks as an infection model. Besides, it should be noted that in anaerobic conditions, *Salmonella* requires *cob*, *pdu*, and *prp* operons together with the *ttr* operon using tetrathionate as the final electron acceptor, which provides for the bacteria a broad arsenal to use an alternative pathway to remain virulent demonstrating the extensive metabolic flexibility (Yoo et al. 2017). These findings led to a conundrum suggesting that there is much to be learned and deciphered about *Salmonellae* and its use of tetrathionate respiration, as well as their variety of responses according to different hosts.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1 Primers used in this study.

ACKNOWLEDGEMENTS

FAPESP, CAPES and CNPq research grants are gratefully acknowledged. ABJ is a research fellow of CNPq.

FUNDING

This work was supported by research grants from The São Paulo Research Foundation (FAPESP 2018/03189-0, 2018/21301-2, and 2020/06076-2).

CONFLICT OF INTEREST

We have no conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

- Alves Batista DF, de Freitas Neto OC, Maria de Almeida A et al. Evaluation of pathogenicity of *Salmonella* Gallinarum strains harbouring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*. PLoS One 2018;13:e0200585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200585>.
- Antunes P, Mourão J, Campos J et al. Salmonellosis: the role of poultry meat. Clin Microbiol Infect 2016;22:110-121. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>.
- Barrow PA, Berchieri A, Freitas Neto OC et al. The contribution of aerobic and anaerobic respiration to intestinal colonization and virulence for *Salmonella* Typhimurium in the chicken. Avian Pathol 2015;44:401-7. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1062841>.
- Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA. Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning *Salmonella* serotypes; microbial characteristics associated with faecal excretion. Avian Pathol 1988;17:571-88. <https://doi.org/10.1080/03079458808436478>.
- Chaudhuri RR, Morgan E, Peters SE et al. Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals. PLoS Genet 2013;9:e1003456. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003456>.
- Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-270 12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:6640-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
- de Paiva JB, Penha Filho RA, Arguello YM et al. A defective mutant of *Salmonella* enterica Serovar Gallinarum in cobalamin biosynthesis is avirulent in chickens. Braz J Microbiol 2009;40:495-504. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090003000012>.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis K, Allende A et al. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. EFSA J 2021;19:e06651. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6651>.

Faber F, Thiennimitr P, Spiga L et al. Respiration of Microbiota-Derived 1,2-propanediol Drives *Salmonella* Expansion during Colitis. PLoS Pathog 2017;13:e1006129. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006129>.

Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci 2008;86:E173-87. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0447>.

Foley SL, Nayak R, Hanning IB et al. Population dynamics of *Salmonella* enterica serotypes in commercial egg and poultry production. Appl Environ Microbiol 2011;77:4273-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.00598-11>.

Galán JE. *Salmonella* Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. Nat Rev Microbiol 2021;19:716-725. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00561-4>.

Havemann G.D.; Sampson E.M.; Bobik T.A. duA Is a Shell Protein of Polyhedral Organelles Involved in Coenzyme B12-Dependent Degradation of 1,2-Propanediol in *Salmonella* enterica Seroovar Typhimurium LT2. **J Bacteriol.** 184 (5): 1253-1261, 2002.

Koskiniemi S, Sun S, Berg OG et al. Selection-driven gene loss in bacteria. PLoS Genet 2012;8:e1002787. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002787>.

Langridge GC, Fookes M, Connor TR et al. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:863-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416707112>.

Majowicz SE, Musto J, Scallan E et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 2010;50:882-9. <https://doi.org/10.1086/650733>.

Melo RT, Galvão NN, Guidotti-Takeuchi M et al. Molecular Characterization and Survive Abilities of *Salmonella* Heidelberg Strains of Poultry Origin in Brazil. *Front Microbiol* 2021;12:674147. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.674147>.

Monte DF, Lincopan N, Berman H et al. Genomic Features of High-Priority *Salmonella* enterica Serovars Circulating in the Food Production Chain, Brazil, 2000-2016. *Sci Rep* 2019;9:11058. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45838-0>.

Nurmi E, Rantala M. The influence of zinc bacitracin on the colonization of *Salmonella* Infantis in the intestine of broiler chickens. *Res Vet Sci* 1974; 17:24-7.

Price-Carter M, Tingey J, Bobik TA et al. The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *J Bacteriol* 2001;183:2463-75. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2463-2475.2001>.

Saraiva MMS, Rodrigues Alves LB, Monte DFM et al. Deciphering the role of *ttrA* and *pduA* genes for *Salmonella* enterica serovars in a chicken infection model. *Avian Pathol* 2021;50:257-268. <https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1909703>.

Schokker D, Jansman AJ, Veninga G et al. Perturbation of microbiota in one-day old broiler chickens with antibiotic for 24 hours negatively affects intestinal immune development. *BMC Genomics* 2017;18:241. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3625-6>.

Vernikos GS, Thomson NR, Parkhill J. Genetic flux over time in the *Salmonella* lineage. *Genome Biol* 2007;8:R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-6-r100>.

Winter SE, Lopez CA, Bäumlér AJ. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO Rep* 2013;14:319-27. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.27>.

Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*. 2010;467:426-9. <https://doi.org/10.1038/nature09415>.

Yoo W, Kim D, Yoon H et al. Enzyme IIA_{Ntr} Regulates *Salmonella* Invasion Via 1,2-Propanediol And Propionate Catabolism. *Sci Rep* 2017;7:44827. <https://doi.org/10.1038/srep44827>.

Zancan FB, Berchieri Junior A, Fernandes SA et al. *Salmonella* spp. investigation in transport box of day old birds. *Braz J Microbiol* 2000;31:230-232.

Figure legends

Figure 1. Faecal excretion of mutants (*SH Δ ttrA*, *SH Δ ttrA Δ pduA*, and *SH Δ ttrACBSR*) and wild type strains from broiler chicks during 4 weeks.

Figure 2. Bacterial counts in cecal content from broiler chicks challenged by *SH Δ ttrA*, *SH Δ ttrA Δ pduA*, *SH Δ ttrACBSR*, and SH-wt sampled at 2, 5, 7, 14, 21 and 28 days post-infection. a, b, and c indicate statistical difference by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively)

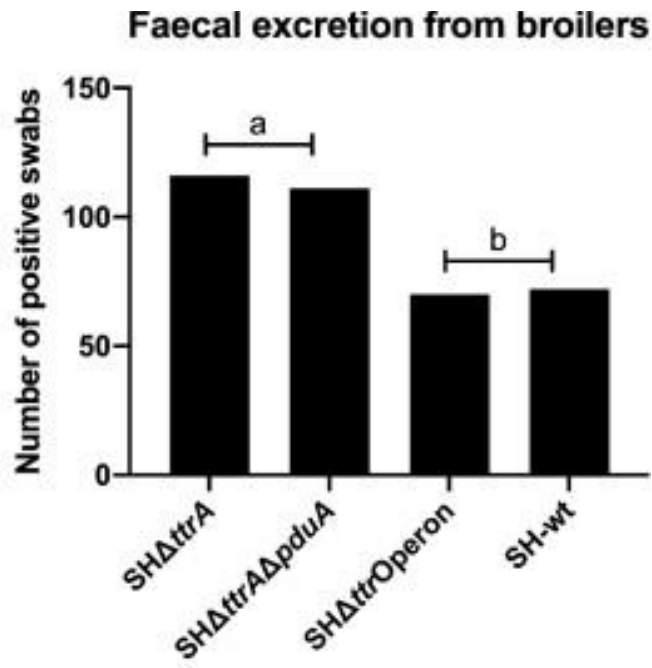


Fig. 1

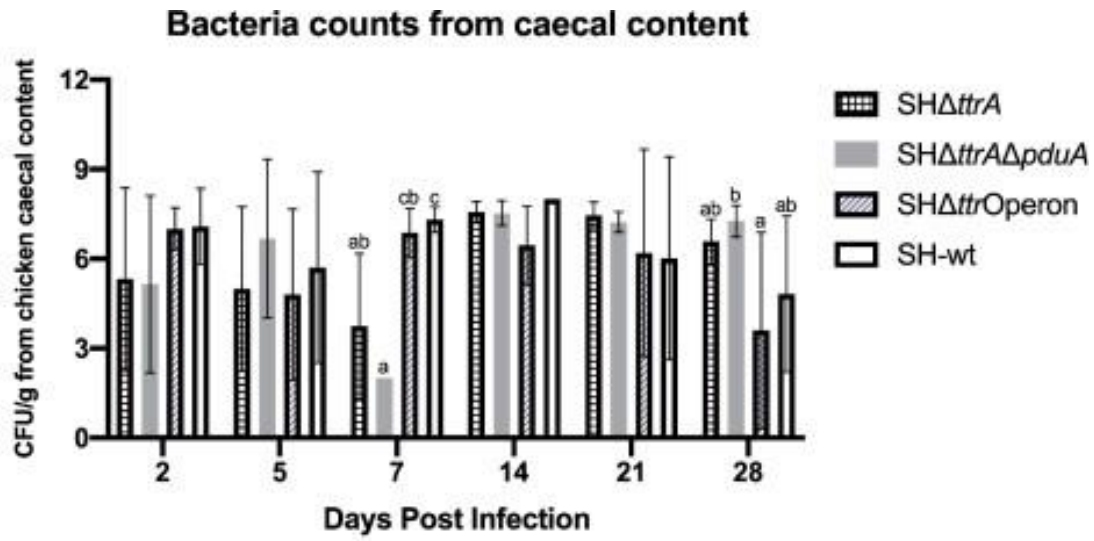


Fig. 2

Apêndice A: artigo publicado na revista Microbial Pathogenesis, no dia 22 de agosto de 2022.

Microbial Pathogenesis 171 (2022) 105725



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath



Salmonella Heidelberg side-step gene loss of respiratory requirements in chicken infection model

Vinícius Góes^{a,1}, Daniel F.M. Monte^{a,1,*}, Mauro de Mesquita Souza Saraiva^a,
Adriana Maria de Almeida^a, Julia Memrava Cabrera^a, Lucas Bocchini Rodrigues Alves^a,
Taísa Santiago Ferreira^a, Tulio Spina de Lima^a, Valdinete P. Benevides^a, Paul A. Barrow^b,
Oliveiro Caetano de Freitas Neto^c, Angelo Berchieri Jr.^{a,**}

^a São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinary Sciences, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil
^b School of Veterinary Medicine and Science, University of Surrey, Guildford, GU2 7AL, United Kingdom
^c Department of Preventive Veterinary Medicine, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
 Anaerobic respiration
 Tetrathionate
 1,2-Propanediol
 Salmonellosis

ABSTRACT

Among the important recent observations involving anaerobic respiration was that an electron acceptor produced as a result of an inflammatory response to *Salmonella Typhimurium* generates a growth advantage over the competing microbiota in the lumen. In this regard, anaerobically, salmonellae can oxidize thiosulphate ($S_2O_3^{2-}$) converting it into tetrathionate ($S_4O_6^{2-}$), the process by which it is encoded by *tr* gene cluster (*trSRtrBCA*). Another important pathway under aerobic or anaerobic conditions is the 1,2-propanediol-utilization mediated by the *pdu* gene cluster that promotes *Salmonella* expansion during colitis. Therefore, we sought to compare in this study, whether *Salmonella Heidelberg* strains lacking the *trA*, *trApduA*, and *trACBSR* genes experience a disadvantage during cecal colonization in broiler chicks. In contrast to expectations, we found that the gene loss in *S. Heidelberg* potentially confers an increase in fitness in the chicken infection model. These data argue that *S. Heidelberg* may trigger an alternative pathway involving the use of an alternative electron acceptor, conferring a growth advantage for *S. Heidelberg* in chicks.

1. Introduction

Salmonella enterica subsp. *enterica* remains a major public health concern, and their infections cause a substantial global burden [1]. The continuous evolution of *Salmonella enterica* by acquiring and losing genes has enhanced and refined the virulence of this pathogen [2–4]. As a result, the fitness effects of the flux of genome size and content could provide a potential driving force for a growth advantage for *S. enterica* serovars over the competing microbiota in the lumen of the inflamed gut [3,5].

Although infections caused by *Salmonella Heidelberg* have increased in North America, Europe, and South America [6–8], little is known about the virulence strategies used by *S. Heidelberg* during intestinal infection and its response to the gut-associated microbial community, resulting in colonization, particularly in poultry and how this may differ

from that of other serotypes studied in greater detail [9]. Most interestingly, gut inflammation enhances the growth of *Salmonella enterica* by using tetrathionate as a respiratory electron acceptor and 1,2-propanediol and ethanolamine as electron donors [10–12]. In these anaerobic process, salmonellae can oxidize thiosulphate ($S_2O_3^{2-}$) converting it into tetrathionate ($S_4O_6^{2-}$), the process by which it is encoded by *tr* gene cluster (*trSRtrBCA*), while 1,2-propanediol-utilization is mediated by the *pdu* gene cluster that promotes *Salmonella* expansion during colitis. However, these studies were carried out with mice [10–12]. In this regard, we have studied the role of *trA* and *pduA* genes for *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis* in the chicken infection model [13,14]. These investigations emphasize the complexities of the utilization of 1,2-propanediol or ethanolamine as carbon sources with tetrathionate as electron acceptor by *S. enterica* serovars during infection, since although mutations in *trApduA* mutants of *S. Typhimurium* and *S.*

* Corresponding author.
 ** Corresponding author.
 E-mail addresses: monte_dfm@alumni.unesp.br (D.F.M. Monte), angelo.berchieri@unesp.br (A. Berchieri Jr).
¹ Vinícius Góes and Daniel F. M. Monte contributed equally to this article.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105725>
 Received 11 February 2022; Received in revised form 15 July 2022; Accepted 14 August 2022
 Available online 22 August 2022
 0882-4010/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Enteritidis showed enhanced pathogenicity in broiler chicks compared to layers, the deletion of *trrA* and *pduA* genes did not impair gut colonization [14]. These observations were remarkable since cobalamin (vitamin B₁₂) is a co-factor used in the 1,2-propanediol oxidation by tetrathionate and although double *cob* (nucleotide loop assembly) *chi* (corrin ring synthesis) mutants show reduced virulence in *S. Gallinarum*, a single *cobS* mutation increases virulence [15].

Based on our previous results and considering the variation in the colonization characteristics of *Salmonella* serovars, there was clear value in exploring these aspects of anaerobic respiration during colonization of this serovar, which is becoming epidemiologically more important both as a result of its prevalence in different countries and also its increasing antimicrobial resistance [16–18]. To do this, we performed an *in vivo* experiment using one-day-old broiler chicks challenged by three defective *S. Heidelberg* mutant strains carrying deletions in *trrA*, *trrApduA*, and *trrACBSR* genes.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Salmonella Heidelberg wild-type strain (Lab ID: SH203) was routinely grown in Lysogeny Broth and Lysogeny agar (LB – Becton Dickinson, Maryland, USA) at 37 °C. Spontaneous mutants of the *S. Heidelberg* wild-type strain resistant to nalidixic acid (NAL) (100 µg/mL) or nalidixic acid (100 µg/mL) plus spectinomycin (SPC) (100 µg/mL) were selected to facilitate recovery of the *S. Heidelberg* mutant strains (SHΔ*trrA*, SHΔ*trrApduA*, and SHΔ*trrACBSR*) and *S. Heidelberg* wild-type (SH-wt), respectively, during the *in vivo* experiment.

2.2. Construction of *S. Heidelberg* mutants

The Lambda-Red technique was used to generate the SHΔ*trrA* mutant with the gene replaced by a chloramphenicol (Chl) cassette, SHΔ*trrApduA* with a kanamycin (Kan) cassette replacement for *pduA* and SHΔ*trrACBSR* with the operon replaced by a kanamycin cassette [19]. All primers used in this study are listed in Table S1. Briefly, a region upstream and downstream of each target gene (*trrA*, *trrApduA*, and *trrACBSR*) were PCR amplified from the *S. Heidelberg* wild-type strain by using primers described in Table S1. Plasmids pKD3 (Chl) or pKD4 (Kan) were used as the DNA template and the proper length of the PCR products was ensured by agarose gel electrophoresis (1.5%). *S. Heidelberg* wild-type strain carrying λ Red recombinase plasmid (pKD46) was used as electrocompetent strain to insert by electroporation the PCR products (*trrA*, *trrApduA*, and *trrACBSR*). After electroporation, transformants were kept at 37 °C for 1 h and subsequently plated onto LB + Chl or LB + Kan, which were grown at 37 °C for 24 h. The selection of clones that had integrated the PCR products was confirmed by PCR.

For all mutants, the bacteriophage P22A lysates of the resultant strains were used to transduce each mutation (*trrA*, *trrApduA*, and *trrACBSR*) to a clean parental genetic background. The antimicrobial markers (chloramphenicol and kanamycin) were removed from their chromosomes by transformation using pCP20 plasmid [19]. Subsequently, successive passages in LB broth at 42 °C were carried out before streaking onto LB agar supplemented or not with antimicrobials to confirm the complete removal of the resistance cassettes. We also assessed complete lipopolysaccharide (smoothness) by absence of agglutination using 1:1000 acriflavine with smooth mutants selected and stored at –80 °C in Lysogeny broth supplemented with 30% glycerol for future use [20].

2.3. *In vivo* experiment

The experiments were performed according to the Ethical Principles on Animal Experimentation from the Brazilian College of Animal Experimentation and previously approved by the Ethical Committee on

the Use of Animals (Process CEUA-006621/18; at May, 10th of 2018). The experiment was carried out in the Laboratory of Avian Pathology at the Faculty of Agricultural and Veterinary Science of São Paulo State University (FCAV/Unesp).

To evaluate the requirement of *trrA*, *trrApduA*, and *trrACBSR* for *S. Heidelberg* infection, an *in vivo* assay was performed using 225 birds in total. One-day-old broiler chicks were obtained from a commercial hatchery. Upon arrival, sterile swabs were used to sample the bottom of the transport cardboard boxes to confirm the *Salmonella*-free status of the birds [21]. The birds were then distributed equally into five groups each of 45 birds [group 1 (infected with the *trrA* strain), group 2 (*trrApduA*), group 3 (*trrACBSR*), group 4 (*S. Heidelberg* wild-type strain), and group 5 (uninfected control)] within metal cages in temperature-controlled rooms. They received sterilized water and antimicrobial-free balanced feed *ad libitum* throughout the experiment (28 days).

The birds in each group (1–4) were infected orally at 2 days of age with their corresponding mutant strain with group 5 remaining uninfected as a negative control. The birds were inoculated directly by gavage into the crop with 0.2 mL containing 10⁹ CFU. Birds that developed severe clinical signs were euthanized humanely by cervical dislocation and were not included in the study. Fecal excretion and cecal colonization of *S. Heidelberg* were assessed over the experiment as outlined below.

2.4. Fecal excretion

Sixty birds were used to evaluate the fecal excretion, 15 birds each from groups 1 to 4. The chicks used to assess fecal excretion were identified individually by leg-bands and cloacal swabs and were swabbed exclusively twice a week throughout 28 days post-infection (dpi). Swabs were transferred into 2 mL of Selenite Broth supplemented with 0.04% of novobiocin (SN – Becton Dickinson, Maryland, USA) and incubated for 24 h at 37 °C. Subsequently, they were streaked onto Brilliant Green Agar (BGA – Oxoid, UK) supplemented with 100 µg/mL of nalidixic acid for mutant strains (100 µg/mL) with or without spectinomycin (100 µg/mL), incubated for 24 h at 37 °C. Presumptive *Salmonella* colonies were confirmed using Triple Sugar Iron Agar (TSI – Oxoid, UK), Lysine Iron Agar (LI – Oxoid, UK), and Sulphide Indole Motility (SIM – Oxoid, UK) tests followed by slide agglutination test using *Salmonella* O and H Polyvalent antisera (anti-O – Bio-Rad, USA). We further checked colonies for roughness using acriflavine and strains recovered were confirmed by PCR.

2.5. Evaluation of cecal colonization

In order to enumerate bacteria, five birds from each group were euthanized at two, five, seven, 14, 21, and 28 days post-infection (dpi). Cecal contents were homogenized directly into Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (PBS). Decimal dilutions (v/v) of the PBS homogenates were made and a 0.1 mL aliquot of each dilution was inoculated onto BGA^{Nal} or BGA^{Nal+Sp} agar plates. Concomitantly, 2x concentration of SN broth was added to samples (1:1), whilst plates and enriched samples were incubated at 37 °C for 24 h. The CFU/g values were normalized by log₁₀ for statistical analysis. When negative plates were obtained, enriched samples were re-streaked onto BGA^{Nal} or BGA^{Nal+Sp} plates and incubated as previously described. The value of 10² CFU/mL was assigned for positives samples for the purpose of further analysis. In addition, clinical signs and mortality were daily recorded throughout 28 dpi.

2.6. Statistical analysis

Faecal excretion data were compared by Fisher's exact test, and the logarithmically transformed values for bacterial numbers were submitted to two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test (*P* < 0.05). To evaluate normality, the Shapiro-Wilk test was performed

and data from bacterial counts were fitted into polynomial regression curve or nonlinear regression to choose the best curve for the results. The difference between areas under curves were analysed by Unpaired *t*-test ($P < 0.05$). All statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism, version 8.2.1 for Mac OS.

3. Results

3.1. Deletion of *ttrA*, *ttrApduA*, or *ttrACBSR* genes does not impair fecal excretion in chicks

To determine whether *S. Heidelberg* strains with deletions in *ttrA*, *ttrApduA*, or *ttrACBSR* genes affect their colonization of the gut, we evaluated fecal excretion for four weeks. Compared to the wild-type strain, excretion of the $\Delta ttrACBSR$ mutant was not statistically significantly different ($P > 0.05$) (Fig. 1). In contrast, the mutant strains carrying deletions in *ttrA* or *ttrApduA* were excreted in significantly higher numbers than the parental wild-type strain during the experimental period ($P < 0.01$; Fig. 1).

3.2. Gene loss may enhance the gut colonization by *Salmonella Heidelberg* in chicks

During the first 5 days p.i. there was little significant difference in bacterial enumeration of the four strains (Fig. 2). At day 7 the parent strains and $\Delta ttrACBSR$ mutant were isolated in significantly higher numbers than either $\Delta ttrA$ or $\Delta ttrApduA$. After this time, the latter two mutants reached the same CFU/g as the other bacteria (on days 14 and 21) and did so until day 28 when the $\Delta ttrApduA$ mutant became significantly predominant in comparison to the $\Delta ttrACBSR$.

4. Discussion

We sought to compare in this study, whether *S. Heidelberg* strain lacking tetrathionate respiration and 1,2-propanediol genes confers a disadvantage during cecal colonization in broiler chicks.

First, we deleted the *ttrA* gene to investigate if this single mutation could attenuate the *S. Heidelberg* strain. The present report is the first to test the hypothesis that a single mutation in tetrathionate respiration (*ttrA*) might contribute to inhibition of *S. Heidelberg* growth in the gut lumen. Our results indicate that this mutant colonized the ceca more effectively at 21 and 28 dpi, instead of showing reduction in cecal colonization and virulence of *S. Heidelberg*.

Second, we constructed a strain carrying deletion in *ttrApduA* genes

to confirm previous results obtained in the mouse model. Winter et al. [10] and Faber et al. [12] found that generation of this electron acceptor during 1,2-propanediol utilization produced a growth advantage for *S. Typhimurium* over the competing microbiota in the inflamed intestine. It was thus puzzling that *S. Typhimurium* with defective tetrathionate respiration provided a growth advantage for *S. Typhimurium* in young chickens as recently reported by Saraiva et al. [14]. In that study, double *ttrApduA* mutants generally colonized the alimentary tract of very young chickens better than the parent colonize and were isolated from the liver and spleen more frequently indicating little effect on invasion and virulence in these young birds.

At first glance, these dissimilarities appear to be related to physiological differences between mammals and birds, but this remains unclear and further investigations are needed. It is also clear that the use of very young chickens with, at most, a rudimentary gut microbiota presents a very different ecological picture and challenge for colonizing bacteria since it is known that the absence of a mature gut microbiota facilitates colonization by *Salmonella* strains that would not normally colonize well [22,23]. This may be supported by the fact that Barrow et al. [13] found that *ttrR* and *ttrS* mutants colonized less well in birds with a gut microbiota. However, it is appreciated that these two genes are regulatory and may have had different effects than deletions of structural genes or the whole operon. The inflammatory response of the intestine of day-old chickens is maybe very different to that of older birds whether or not they possess a gut microbiota and this deserves to be investigated further [24].

There is a hierarchy of electron acceptor usage in the highly metabolically flexible enteric bacteria dependent on the redox conditions and the energy (ATP) generated by their utilization. Thus, nitrate reductase is energetically more favourable in terms of energy generation than other electron acceptors such as manganese, iron oxides, fumarate, dimethyl sulfoxide (DMSO) and other N- and S- oxides and, tetrathionate. It is thus entirely possible that, although tetrathionate is one of the least favourable electron acceptors in terms of energy generation under anaerobic redox conditions, in the presence of excessive amounts as result of the inflammatory response generated in response to *Salmonella* invasion and localized tissue destruction, it becomes the preferred acceptor. Thus, in mutants, which are unable to utilize tetrathionate other, energetically more favourable acceptors may be used and S-oxides and DMSO may also be available as a result of tissue destruction under anaerobic conditions.

Thus, considering that $\Delta ttrA$ and $\Delta ttrApduA$ mutants remained capable to colonize the ceca without attenuation, it is thus likely that these strains are still able to stimulate intestinal inflammation enabling



Fig. 1. Faecal excretion of mutants ($\Delta ttrA$, $\Delta ttrApduA$, and $\Delta ttrACBSR$) and wild type strains from broiler chicks during 4 weeks.

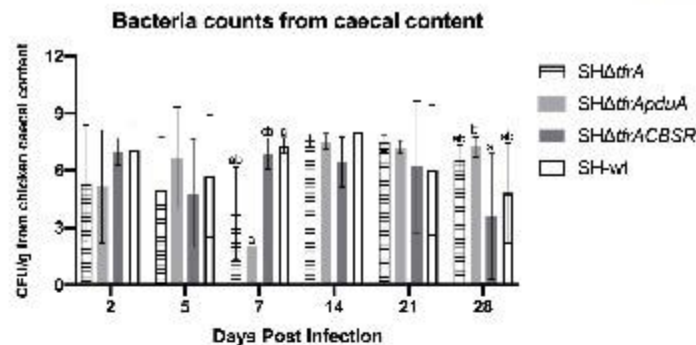


Fig. 2. Bacterial counts in caecal content from broiler chicks challenged by SHΔtrA, SHΔtrAΔpduA, SHΔtrACBSR, and SH-wt sampled at 2, 5, 7, 14, 21 and 28 days post-infection.

a, b, and c indicate statistical difference by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively).

them to compete with resident microbiota acquiring essential nutrients provided by inflamed gut [5].

In the context of the alternative pathway, another hypothesis that supports the successful establishment of these mutants might be that the deletions effectively blocked the bacterial ability to trigger intestinal inflammation, but resulted in increased replication disseminating systemically [5]. Indeed, according to nutrient repertoire available in the gut environment, *Salmonella* activates a regulatory system that influences the flux of intestinal colonization and bacterial internalization into host cells by using Enzyme IIA^{Ntr} via 1,2-propanediol and propionate catabolism [25].

Nonetheless, for these reasons stated above, we wondered if, after removal of *tr* operon (see the *tr* operon architecture) [26] a different response might match the observations in the literature, and if so, whether such mutation could favour an attenuated mutant. Therefore, we revisited the mutation by deleting the complete *tr* operon in an attempt to block the ability of *S. Heidelberg* to stimulate inflammatory signalling and subsequently to secure carbon sources and electron acceptors.

In our third attempt, we provide compelling experimental support that tetrathionate respiration might be dispensable in the chicks infection model by constructing a third mutant carrying a deletion in *tr* operon (SHΔtrACBSR). Although this strain did not have higher counts during the 28 dpi, we cannot yet consider it a significant attenuation, since on days 2, 5, 14, and 21 post-infection there was no statistical difference in comparison to SH-wt, which in principle ruled out our third hypothesis using chicks as an infection model. Besides, it should be noted that in anaerobic conditions, *Salmonella* requires *cob* (cyanocobalamin biosynthetic pathway), *pdu* (degradation of 1,2-propanediol), and *prp* (catabolism of propionate) operons together with the *tr* operon using tetrathionate as the final electron acceptor, which provides for the bacteria a broad arsenal to use an alternative pathway to remain virulent demonstrating the extensive metabolic flexibility [25]. These findings led to a conundrum suggesting that there is much to be learned and deciphered about *Salmonellae* and its use of tetrathionate respiration, as well as their variety of responses according to different hosts.

Funding

This work was supported by research grants from The São Paulo Research Foundation (FAPESP 2018/03189-0, 2018/21301-2, and 2020/06076-2).

CRediT authorship contribution statement

Vinícius Góes: Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. Daniel F.M. Monte: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. Mauro de Mesquita Souza Saraiva: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. Adriana Maria de Almeida: Methodology, Formal analysis. Julia Membrava Cabrera: Writing – review & editing, Methodology, Formal analysis. Lucas Boechini Rodrigues Alves: Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. Taísa Santiago Ferreira: Methodology, Formal analysis. Tulio Spina de Lima: Methodology, Formal analysis. Valdinete P. Benevides: Methodology, Formal analysis. Paul A. Barrow: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Project administration, Investigation, Data curation, Conceptualization. Oliveira Caetano de Freitas Neto: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Project administration, Investigation, Data curation, Conceptualization. Angelo Berchieri Jr: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

We have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgements

FAPESP and CAPES research grants are gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105725>.

References

- [1] S.E. Majowicz, J. Muto, E. Scallan, et al., The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis, *Clin. Infect. Dis.* 50 (2010) 882–889, <https://doi.org/10.1093/cid/cir033>.
- [2] G.S. Venkova, N.R. Thomson, J. Parkhill, Genetic flux over time in the *Salmonella* lineage, *Genome Biol.* 8 (2007) R100, <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-r100>.

- [3] S. Koshinami, S. Sun, O.G. Berg, et al., Selection-driven gene loss in bacteria, *PLoS Genet.* 8 (2012), e1002787, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002787>.
- [4] G.C. Langridge, M. Poole, T.R. Connor, et al., Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 863–868, <https://doi.org/10.1073/pnas.1416707112>.
- [5] J.E. Galán, *Salmonella* Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair, *Nat. Rev. Microbiol.* 19 (2021) 716–725, <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00561-4>.
- [6] S.L. Foley, R. Nayak, L.B. Hanning, et al., Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 4273–4279, <https://doi.org/10.1128/AEM.00598-11>.
- [7] P. Antunes, J. Mourão, J. Campos, et al., Salmonellosis: the role of poultry meat, *Clin. Microbiol. Infect.* 22 (2016) 110–121, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>.
- [8] R.T. Melo, N.N. Galvão, M. Guidotti-Takachi, et al., Molecular characterization and survival abilities of *Salmonella* Heidelberg strains of poultry origin in Brazil, *Front. Microbiol.* 12 (2021), 674147, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.674147>.
- [9] R.R. Chandhuri, E. Morgan, S.E. Peters, et al., Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals, *PLoS Genet.* 9 (2013), e1003456, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003456>.
- [10] S.E. Winter, P. Thiérmir, M.G. Winter, et al., Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*, *Nature* 467 (2010) 426–429, <https://doi.org/10.1038/nature09415>.
- [11] S.E. Winter, C.A. Lopez, A.J. Stumler, The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation, *EMBO Rep.* 14 (2013) 319–327, <https://doi.org/10.1038/embo.2013.27>.
- [12] P. Palmer, P. Thiérmir, L. Spiga, et al., Respiration of microbiota-derived 1,2-propanediol drives *Salmonella* expansion during colitis, *PLoS Pathog.* 13 (2017), e1006129, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006129>.
- [13] P.A. Barrow, A. Berchieri, O.C. Freitas Neto, et al., The contribution of aerobic and anaerobic respiration to intestinal colonization and virulence for *Salmonella* Typhimurium in the chicken, *Avian Pathol.* 44 (2015) 401–407, <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1062841>.
- [14] M.M.S. Saraiva, L.B. Rodrigues Alves, D.F.M. Monte, et al., Deciphering the role of *tetA* and *pdaA* genes for *Salmonella enterica* serovar in a chicken infection model, *Avian Pathol.* 50 (2021) 257–266, <https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1909793>.
- [15] J.B. de Paiva, R.A. Pêça Filho, Y.M. Arguello, et al., A defective mutant of *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum in cobalamin biosynthesis is avirulent in chickens, *Braz. J. Microbiol.* 40 (2009) 495–504, <https://doi.org/10.1590/S1517-836220090003000012>.
- [16] S.L. Foley, A.M. Lyons, Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance, *J. Anim. Sci.* 86 (2008) E173–E187, <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0447>.
- [17] D.F. Monte, N. Lincoff, H. Berman, et al., Genomic features of high-priority *Salmonella enterica* serovars circulating in the food production chain, Brazil, 2006–2016, *Sci. Rep.* 9 (2019), 11058, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43639-0>.
- [18] EPSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), K. Koutsouris, A. Almeida, et al., Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain, *EPSA J.* 19 (2021), e06651, <https://doi.org/10.2903/j.esa.2021.6651>.
- [19] K.A. Dubenko, B.L. Warner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 6640–6645, <https://doi.org/10.1073/pnas.120143097>.
- [20] D.F. Alves Batista, O.C. de Freitas Neto, A. Maria de Almeida, et al., Evaluation of pathogenicity of *Salmonella* Gallinarum strains harbouring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*, *PLoS One* 13 (2018), e0200585, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200585>.
- [21] F.B. Zanoni, A. Berchieri Junior, S.A. Fernandes, et al., *Salmonella* spp. investigation in transport box of day old birds, *Braz. J. Microbiol.* 31 (2000) 230–232.
- [22] E. Nurmi, M. Rantala, The influence of zinc bacitracin on the colonization of *Salmonella* infantis in the intestine of broiler chickens, *Res. Vet. Sci.* 17 (1974) 24–27.
- [23] P.A. Barrow, J.M. Simpson, M.A. Lovell, Intestinal colonization in the chicken by food-poisoning *Salmonella* serotypes: microbial characteristics associated with faecal excretion, *Avian Pathol.* 17 (1998) 571–580, <https://doi.org/10.1080/030794598086436478>.
- [24] D. Scholker, A.J. Jaraman, G. Venings, et al., Perturbation of microbiota in one-day old broiler chickens with antibiotic for 24 hours negatively affects intestinal immune development, *BMC Genom.* 18 (2017) 241, <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3625-4>.
- [25] W. Yoo, D. Kim, H. Yoon, et al., Enzyme IIA_{Ntr} regulates *Salmonella* invasion via 1,2-propanediol and propionate catabolism, *Sci. Rep.* 7 (2017), 44027, <https://doi.org/10.1038/srep44027>.
- [26] M. Price-Carter, J. Tingey, T.A. Bolik, et al., The alternative electron acceptor tetrathionate supports E12-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 2463–2475, <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2463-2475.2001>.