

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

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ESTIRPES  
MUTANTES DE *Salmonella* GALLINARUM BIOVAR  
GALLINARUM PARA GENES RELACIONADOS AO  
METABOLISMO NATURALMENTE DEFECTIVOS EM *S.*  
GALLINARUM BIOVAR PULLORUM**

**Diego Felipe Alves Batista**

Médico veterinário

2017

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

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ESTIRPES  
MUTANTES DE *Salmonella* GALLINARUM BIOVAR  
GALLINARUM PARA GENES RELACIONADOS AO  
METABOLISMO NATURALMENTE DEFECTIVOS EM *S.*  
GALLINARUM BIOVAR PULLORUM**

**Diego Felipe Alves Batista**

**Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior**

**Coorientador: Prof. Dr. Oliveiro Caetano de Freitas Neto**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias –  
Unesp, Câmpus de Jaboticabal,  
como parte das exigências para a  
obtenção do título de Doutor em  
Microbiologia Agropecuária**

**2017**

Batista, Diego Felipe Alves  
B333a Avaliação da patogenicidade de estirpes mutantes de *Salmonella*  
*Gallinarum* biovar *Gallinarum* para genes relacionados ao  
metabolismo naturalmente defectivos em *S. Gallinarum* biovar  
*Pullorum* / Diego Felipe Alves Batista. -- Jaboticabal, 2017  
xxi, 111 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Oliveiro Caetano de Freitas Neto

Banca examinadora: Wanderley Dias da Silveira, Gerson  
Nakazato, Manoel Victor Franco Lemos, Marcos Tulio de Oliveira  
Bibliografia

1. Metabolismo bacteriano. 2. Pseudogenes. 3. Pulorose. 4.  
Relação patógeno-hospedeiro. 5. Tifo aviário. 6. Virulência  
bacteriana. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 576.8:636.6

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ESTIRPES MUTANTES DE *Salmonella* GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM PARA GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO NATURALMENTE DEFECTIVOS EM *S. GALLINARUM* BIOVAR PULLORUM

**AUTOR: DIEGO FELIPE ALVES BATISTA**  
**ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR**  
**COORIENTADOR: OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO  
Departamento de Medicina Veterinárias / Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - Areia/PB

  
Prof. Dr. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA  
Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes / UNICAMP / Campinas/SP

  
Pesquisador Dr. GERSON NAKAZATO  
Departamento de Microbiologia / Universidade Estadual de Londrina / Londrina/PR

  
Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA  
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de julho de 2017

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Diego Felipe Alves Batista, nascido na cidade do Rio de Janeiro (RJ) aos 16 de Julho de 1986, ingressou em Agosto de 2005 no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e recebeu o título de Médico Veterinário em Julho de 2010. Durante a graduação desenvolveu trabalhos principalmente na área de suinocultura e qualidade de carne suína sob a orientação do Dr. Robson Carlos Antunes. Em Abril de 2011, o estudante iniciou atividades como estagiário no laboratório de Ornitopatologia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp), em Jaboticabal, sob supervisão do Professor Angelo Berchieri Junior o qual, quatro meses mais tarde, se tornou oficialmente seu orientador no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária nessa instituição de ensino. Ao longo dos dois anos de mestrado, o estudante foi treinado em técnicas básicas de microbiologia e biologia molecular, e obteve o título de mestre, em Julho de 2013, ao defender a pesquisa intitulada “Análise comparativa dos genomas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovars Gallinarum 287/91 e Pullorum 449/87 para identificação de Regiões de Diferenças (RODs)”. Em Agosto de 2013, o estudante iniciou, na mesma instituição, o curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária sob a supervisão do Professor Angelo Berchieri Junior e do Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto; o último, professor de Ornitopatologia na Universidade Federal de Paraíba (UFPB). Desde então, o doutorando vem desenvolvendo o projeto de pesquisa vinculado a atual tese de doutorado. O estudante também participou, por um ano, de doutorado sanduiche por meio do programa Ciências sem Fronteiras (processo 234068/2014-0) na “The University of Nottingham”, sob a supervisão do professor doutor Paul Andrew Barrow, onde desenvolveu projeto na área de imunologia com ênfase no cultivo e infecção de macrófagos primários de bovinos por *Salmonella* Dublin.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Deus todo poderoso, pois os últimos quatro anos foram repletos de desafios e Sua graça foi necessária para superá-los.

Aos meus pais, Geraldo Magela Batista e Marleide Moreira Alves Batista, que me garantiram total liberdade para que eu seguisse o meu caminho, ao passo que se mantiveram próximos para que eu tivesse um porto seguro caso o planejamento falhasse.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista por fornecer a infraestrutura e os recursos humanos necessários para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Professor Angelo Berchieri Junior e ao Dr. Oliveiro Caetano de Freitas Neto por me transferirem os seus conhecimentos e compartilharem experiências profissionais e pessoais que me ajudaram a moldar o meu perfil profissional.

À “School of Veterinary and Science” da “The University of Nottingham” que me aceitou como estudante de intercâmbio por um ano.

Ao Professor Paul Andrew Barrow que acreditou no meu trabalho e me ajudou a modelar minhas habilidades como pesquisador ao compartilhar várias de suas experiências.

À Ma. Adriana Maria de Almeida pelo suporte técnico no laboratório e por sempre ouvir e discutir as minhas ideias.

Aos vários amigos no Brasil e no exterior, cujos nomes eu não ousou aqui citar por medo de que minha memória me leve a cometer a injustiça do esquecimento. Estejam certos de que vocês foram importantes na minha vida, mesmo que eu não tenha sido capaz de expressar adequadamente a minha gratidão.

À FAPESP (processos 2013/22920-4 e 2013/26127-7), CAPES e CNPq por fornecer o suporte financeiro que permitiu a execução desse estudo.

## Sumário

|   | Página |
|---|--------|
| Certificado de Aprovação pelo CEUA .....  | viii   |
| Certificado de aprovação pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança .....                              | ix     |
| RESUMO .....  | x      |
| ABSTRACT .....  | xi     |
| Listas de abreviaturas .....  | xii    |
| Lista de Tabelas .....  | xvii   |
| Lista de Figuras .....  | xviii  |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1      |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....   | 3      |
| 2.1. Gênero <i>Salmonella</i> : Características gerais e nomenclatura .....                                 | 3      |
| 2.2. Patogenia das salmoneloses .....   | 5      |
| 2.3. Tifo Aviário e Pulorose .....  | 10     |
| 2.3.1. Propriedades dos agentes etiológicos .....   | 10     |
| 2.3.2. Salmonelas sistêmicas nas aves: O tifo aviário e a pulorose .....                                    | 11     |
| 2.3.3. Imunobiologia do tifo aviário e da pulorose .....  | 15     |
| 2.3.4. Genética dos biotipos Gallinarum e Pullorum: Evolução, restrição ao hospedeiro e patogenicidade..... | 19     |
| 3. OBJETIVOS.....   | 24     |
| 3.1. Objetivo Geral .....   | 24     |
| 3.2. Objetivos Específicos .....  | 24     |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 25     |
| 4.1. Informações gerais.....  | 25     |
| 4.2. Estirpes utilizadas nesse estudo .....   | 25     |
| 4.3. Construção das estirpes mutantes .....   | 26     |
| 4.3.1. Informações sobre os genes alvo e comparações das sequências.....                                    | 26     |
| 4.3.2. Purificação dos plasmídios utilizados na mutagênese.....   | 27     |
| 4.3.3. Inserção do plasmídio pKD46 em SG287/91 .....  | 28     |
| 4.3.4. Teste de rugosidade .....  | 29     |
| 4.3.5. Amplificação e purificação do fragmento de mutagênese .....  | 29     |
| 4.3.6. Mutagênese propriamente dita .....   | 32     |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 4.3.7.   | Confirmação da mutação por reação em cadeia da polimerase.....                        | 33 |
| 4.3.7.1. | Extração do DNA cromossômico .....  | 33 |
| 4.3.7.2. | PCR dos clones sugestivos positivos para confirmação da alteração genética .....      | 34 |
| 4.3.7.3. | Visibilização dos produtos amplificados.....  | 38 |
| 4.3.8.   | Transdução das estirpes mutantes.....   | 38 |
| 4.3.9.   | Eliminação do marcador de resistência do cromossomo bacteriano .....                  | 40 |
| 4.4.     | Curvas de multiplicação bacteriana.....   | 41 |
| 4.5.     | Ensaio <i>in vivo</i> .....   | 42 |
| 4.5.1.   | Experimento 1: Patogenicidade e virulência.....                                       | 42 |
| 4.5.2.   | Experimento 2: Contagem bacteriana em órgãos e colheita de tecidos para RT-qPCR ..... | 44 |
| 4.6.     | Expressão relativa de genes por RT-qPCR .....   | 46 |
| 4.6.1.   | Purificação de RNA total e transformação em cDNA.....                                 | 46 |
| 4.6.2.   | Seleção dos genes de referência .....   | 47 |
| 4.6.3.   | Expressão gênica das citocinas alvo deste estudo.....                                 | 49 |
| 4.7.     | Análise dos resultados .....  | 49 |
| 5.       | RESULTADOS .....  | 51 |
| 5.1.     | Construção das estirpes mutantes.....   | 51 |
| 5.2.     | Curvas de multiplicação bacteriana.....   | 54 |
| 5.3.     | Experimentação <i>in vivo</i> .....   | 55 |
| 5.3.1.   | Experimento 1: Sinais clínicos, mortalidade e achados macroscópicos                   | 55 |
| 5.3.2.   | Experimento 2: Contagem bacteriana em órgãos.....                                     | 59 |
| 5.4.     | Expressão de citocinas em tonsila cecal e em baço .....                               | 61 |
| 6.       | DISCUSSÃO.....  | 65 |
| 7.       | CONCLUSÕES.....   | 70 |
|          | REFERÊNCIAS.....  | 71 |
|          | APÊNDICES .....   | 88 |



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

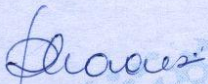


## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 028358/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação da patogenicidade de estirpes mutantes de *Salmonella Gallinarum* biovar *Gallinarum* para genes relacionados ao metabolismo naturalmente defectivos em *S. Gallinarum* biovar *Pullorum***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de fevereiro de 2014.

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2014.

  
**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora - CEUA

# Certificado de aprovação pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Nº 70, terça-feira, 14 de abril de 2015

Diário Oficial da União - Seção 1

ISSN 1677-7042

11



## EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 4.429/2015

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 181ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 09 de abril de 2015, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo nº: 01200.003301/1998-98  
 Requerente: Universidade Estadual Paulista - UNESP  
 CQB: 083/98  
 Prot.: 6205/14  
 Assunto: Solicitação de Parecer para Projeto NB-2  
 Extrato Prévio: 4345/14 publicado em 19/11/14  
 Decisão: DEFERIDO

A presidência da Comissão Interna de Biossegurança da instituição solicitou parecer técnico da CTNBio para a execução de projeto de Nivel de Biossegurança 2/NB-2 a ser executado em área já credenciada pela CTNBio como NB-2, assim denominado: "Avaliação da patogênese de estirpes mutantes de *Salmonella Gallinarum* biovar Gallinarum para genes relacionados ao metabolismo naturalmente defeituosos em *S. Gallinarum* biovar Pullorum". O projeto foi enviado contendo as informações concernentes à biossegurança necessárias ao desenvolvimento da pesquisa.

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

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

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.

EDIVALDO DOMINGUES VELINI

## EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 4.430/2015

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 181ª Reunião Ordinária, ocorrida em 9 de abril de 2015, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo nº: 01200.004299/2014-91  
 Requerente: FuturaGene Blysil Tecnologia Ltda.  
 CNPJ: 12.777.984/0001-09  
 Endereço: Av. Dr. José Lembo, 1010 - sala A - Jardim Bela Vista - CEP 18207-780 - Itapetininga/SP.  
 Assunto: Liberação Planejada no Meio Ambiente (RN08).  
 Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após análise do pleito, concluiu pelo DEFERIMENTO. A requerente solicitou autorização para conduzir liberação planejada no meio ambiente de eventos de eucalipto gene-

ticamente modificado tolerante a herbicida. Os ensaios serão conduzidos na Fazenda Água Vermelha, em Mucuri/BA, e na Fazenda São Bento, em Apilândia/MA, com área total de 4,1 ha e área com OGM de 2,95 ha por localidade.

No âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que as medidas de biossegurança propostas atendem às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal. Como observado, o OGM será plantado em condições experimentais controladas, evitando eventuais danos ao meio ambiente. Assim, atendidas as condições descritas no processo e neste parecer técnico, essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana.

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

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

EDIVALDO DOMINGUES VELINI

## DESPACHOS DO PRESIDENTE

Em 10 de abril de 2015

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que ficam encerrados os Processos, conforme deliberado na 181ª Reunião Ordinária, ocorrida em 9/4/2015: 01200.000496/2013-53, aprovado pelo Parecer Técnico 3759/2013, publicado no DOU nº 185, Seção 1, pg 6 de 24/9/2013; 01200.004550/2012-56, aprovado pelo Parecer Técnico 3714/2013, publicado no DOU 160, Seção 1, pg 4 de 20/8/2013; 01200.003842/2012-71, aprovado pelo Parecer Técnico 3447/2012, publicado no DOU 217, Seção 1, pg 5 de 9/11/2012;

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público, após decisão ocorrida na 181ª Reunião Ordinária da CTNBio, em 08/04/2015, que ficam APROVADOS, os seguintes relatórios de liberação planejada após sua conclusão. Processos: 01200.001119/2009-52, 01200.003885/2008-71, 01200.003233/2009-17, 01200.003698/2011-51, 01200.003700/2011-23, 01200.000940/2010-95, 01200.000068/2011-66, 01200.003092/2011-57, 01200.000942/2010-84, 01200.003194/2010-91, 01200.004956/2009-33, 01200.003138/2011-02.

EDIVALDO DOMINGUES VELINI

A CTNBio, após apreciação do pedido de liberação planejada no meio ambiente de arroz geneticamente modificado, concluiu pelo seu DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico. A BASF SA, detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB 31/97 -, solicita autorização para liberação planejada no meio ambiente de soja geneticamente modificada para aumento da produtividade. A proposta intitulada "ARROZ GM 14/17 - Produção de sementes no Ceará (RPD19 - RPD38)" tem como objetivo a produção de sementes de 229 diferentes eventos de arroz geneticamente modificado (GM) contendo genes relacionados ao aumento de produtividade. Os experimentos serão realizados em Jaguaruana - CE e Limoeiro - CE e ocuparão uma área total de 2,9 ha, as OGMs ocuparão uma área de 1,8 ha.

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

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

EDIVALDO DOMINGUES VELINI

## EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 4.428/2015

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 181ª Reunião Ordinária, ocorrida em 08 de abril de 2015, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo nº: 01200.003892/2014-73  
 Requerente: Centro de Tecnologia Canavieira  
 CNPJ: 06.981.381/0002-02  
 Endereço: Faz. São Antônio, s/nº - Bairro Santo Antônio - C.P.162, Piracicaba - SP.

Assunto: Liberação planejada no meio ambiente.

Ementa: A CTNBio, após apreciação de liberação planejada no meio ambiente de cana-de-açúcar geneticamente modificada, concluiu pelo seu DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico. O Centro de Tecnologia Canavieira - CTC, detentor do Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB 06/96, solicita autorização para conduzir liberação planejada no meio ambiente de cana-de-açúcar geneticamente modificada resistente a insetos. Os experimentos serão realizados na Estação Experimental do CTC, Piracicaba (SP). A área total será de 1,239 hectares e a área com OGM será de 1,094 hectares.

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

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

EDIVALDO DOMINGUES VELINI

# MACHADO DE ASSIS

## Patrono da Imprensa Nacional

Machado de Assis, no início de sua carreira literária, trabalhou, de 1856 a 1858, como aprendiz de tipógrafo, usando o prelo que hoje está em exposição no Museu da Imprensa.

Em 1867 regressa ao órgão oficial para trabalhar como ajudante do diretor de publicação do **Diário Oficial**, cargo que ocupou até 6 de janeiro de 1874.



O autor de "Dom Casimiro", "Quincas Borba", entre outras obras, é patrono in memoriam da Imprensa Nacional desde janeiro de 1997.



Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/atividade/ckck.html>, pelo código 00012015041400011

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

## AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ESTIRPES MUTANTES DE *Salmonella* GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM PARA GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO NATURALMENTE DEFECTIVOS EM *S. GALLINARUM* BIOVAR PULLORUM

**RESUMO** – O tifo aviário, causado por *Salmonella* Gallinarum biotipo Gallinarum, é uma infecção caracterizada pela alta mortalidade nos lotes de aves suscetíveis acometidos, enquanto *S. Gallinarum* biotipo Pullorum, o agente da pulorose, infecta as aves de produção industrial com as quais desenvolve relação mais branda. Ainda é escasso o conhecimento sobre os mecanismos moleculares que sustentam essas diferentes interações patógeno-hospedeiro. Nesse estudo, objetivou-se investigar o efeito de deleção parcial das sequências codificantes dos genes *idnT* (transportador de L-idonato ou D-gluconato), *idnO* (5-cetogluconato redutase) e *ccmH* (heme liase necessária na montagem de citocromos do tipo C) sobre a patogenicidade de *S. Gallinarum* 287/91 (SG287/91), uma vez que seus ortólogos são pseudogenes conservados em *S. Pullorum*. Os clones mutantes SG $\Delta$ *idnTO*, SG $\Delta$ *ccmH* e SG $\Delta$ *ccmHidnTO* foram obtidos por meio da técnica de mutação sítio-dirigida, denominada de recombinação Lambda-Red e testados em dois experimentos independentes com aves comerciais semipesadas de postura suscetíveis ao tifo aviário. No 1º experimento não se observou alteração da patogenicidade dos clones mutantes após inoculação oral, pois todos os animais infectados desenvolveram sinais clínicos típicos do tifo aviário e vieram a óbito ao longo de 12 dias pós-infecção (dpi). Apesar dos 100% de mortalidade, as infecções desenvolvidas pelos clones SG $\Delta$ *idnTO* e SG $\Delta$ *ccmHidnTO* levaram os animais a óbito dentro de 48 horas desde o aparecimento dos sinais clínicos, enquanto SG287/91 o fez em 6 dias, sugerindo aumento da virulência dos clones mutantes. No 2º experimento observou-se que as mutantes invadiram o hospedeiro a partir do intestino, embora as quantidades recuperadas de SG $\Delta$ *idnTO* e SG $\Delta$ *ccmHidnTO* nos fígados e de SG $\Delta$ *idnTO* nos baços, no 5º dpi, foram superiores a de SG287/91, reforçando a hipótese de aumento da virulência dos clones contendo a alteração *idnTO*. Apesar disso, os níveis de transcrição das citocinas CXCLi2 e IL6 produzidos à infecção por SG $\Delta$ *idnTO* e SG $\Delta$ *ccmHidnTO* não diferiram nas tonsilas cecais nos 1º e 3º dpi e nos baços no 3º dpi em relação à infecção por SG287/91. Somente SG $\Delta$ *ccmH* inclinou-se a estimular a transcrição de CXCLi2 e IL6 nas tonsilas cecais no 1º dpi em relação ao grupo controle, enquanto SG287/91 tendeu a suprimi-la. Porém, não houve suporte estatístico para essa observação. Os níveis de mRNA do IFN $\gamma$  estavam aumentados para todas as estirpes de *S. Gallinarum*, mutantes ou não, porém sem diferença estatística entre eles. Os resultados do presente estudo indicam que a ruptura nos genes *idnTO*, e em menor grau do gene *ccmH*, poderiam levar a perda de “fitness” em *S. Gallinarum*, lhes justificando a permanência no genoma desse micro-organismo, ao contrário do que ocorre com *S. Pullorum*. O estudo da patogenicidade de estirpe de *S. Pullorum* tendo reconstituídos os genes *idnTO* e *ccmH* no seu genoma poderia esclarecer os motivos pelos quais esses foram negativamente selecionados por esse micro-organismo.

**Palavras-chave:** Metabolismo bacteriano, pseudogenes, pulorose, relação patógeno-hospedeiro, tifo aviário, virulência bacteriana

## EVALUATION ON THE PATHOGENICITY OF GENETICALLY ENGINEERED *Salmonella* GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM STRAINS HARBOURING MUTATIONS IN METABOLISM-RELATED GENES NATURALLY INACTIVATED IN *S. GALLINARUM* BIOVAR PULLORUM GENOMES

**ABSTRACT** – Fowl typhoid, caused by *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum, is an infectious disease which elicits high mortality into a flock of susceptible birds whereas *S. Gallinarum* biovar Pullorum, the aetiological agent of pullorum disease, infects poultry of commercial importance with which such a bacterium sets off a more permissive host-pathogen interaction. Little is known about the molecular mechanisms driving these distinct interplays with the host. Herein, we aimed at investigating the effect of partial deletions in the *idnT* (L-idonate / D-gluconate transporter), *idnO* (5-ketogluconase reductase) and *ccmH* (heme liase involved in the c-type cytochrome maturation) coding sequences on *S. Gallinarum* 287/91 (SG287/91) pathogenicity since they are conserved pseudogenes in *S. Pullorum* genomes.  $SG\Delta idnTO$ ,  $SG\Delta ccmH$  and  $SG\Delta ccmHidnTO$  mutant strains were constructed through a one-step inactivation technique, known as Lambda-Red-mediated recombination, and tested on two independent experiments by using a commercial brown egg-producing layer line susceptible to fowl typhoid. On the experiment 1, no changing was observed in the pathogenicity of the mutant strains upon oral inoculation as the infected animals developed typical fowl typhoid clinical signs and died along 12 days post-infection (dpi). In spite of causing 100% mortality,  $SG\Delta idnTO$  and  $SG\Delta ccmHidnTO$  killed all the animals within 48 hours since the clinical signs appearance while SG287/91 did so in 6 days, indicating an increased virulence by these mutant strains. On the experiment 2 every mutant strain were able to invade the host system from the intestine albeit  $SG\Delta idnTO$  and  $SG\Delta ccmHidnTO$  were recovered from livers and  $SG\Delta idnTO$  alone from spleens at higher numbers than was SG287/91, supporting the hypothesis of increased virulence for those clones harbouring the *idnTO* mutation. Despite the results above, CXCLi2 and IL6 transcription levels during infection by  $SG\Delta idnTO$  and  $SG\Delta ccmHidnTO$  were similar to that induced by SG287/91 in caecal tonsils at 1 and 3 dpi and in spleens at 3 dpi. In contrast,  $SG\Delta ccmH$  trended to stimulate CXCLi2 and IL6 transcription in caecal tonsils at 1 dpi when compared to the negative, control group whereas SG287/91 tended to suppress it, but no statistical significance was found for such an observation. IFN $\gamma$  mRNA were augmented for all *S. Gallinarum* strains, mutant or not, but without statistical difference amongst them. These findings indicate that gene decay into *idnTO*, and at a lesser extent, into *ccmH* sequences might lead to the loss of fitness by *S. Gallinarum*, raising an explanation for their maintenance on this bacterium chromosome when the opposite happens to *S. Pullorum*. Studying the pathogenicity of a *S. Pullorum* strain possessing both the *idnTO* and *ccmH* genes in its genome could bring to light the reasons whereby such genes were negatively selected by this microorganism.

**Keywords:** Bacterial metabolism, bacterial virulence, fowl typhoid, host-pathogen interaction, pseudogenes, pullorum disease

## Listas de abreviaturas

- 1x: Um volume
- Antígeno H: Antígeno flagelar
- Antígeno O: Antígeno somático
- Antígeno Vi: Antígeno capsular ou de virulência
- APC: Células Apresentadoras de Antígeno
- atm: Atmosferas
- °C: Graus Célsius
- C1: Iniciador direto de verificação de inserção do cassete de cloranfenicol
- C2: Iniciador reverso de verificação de inserção do cassete de cloranfenicol
- CD4<sup>+</sup>: Linfócito T auxiliar
- CD8<sup>+</sup>: Linfócito T citotóxico
- CD28: Receptor de linfócito T para moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 nas APCs
- CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA
- cDNA: DNA complementar ao RNA mensageiro
- CDS: Sequência(s) codificante(s)
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- cm: Centímetro
- CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- CXCLi2: Quimiocina ligante CXC de número dois de galinhas
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfato
- dpi: Dias após a infecção ou dias após a inoculação
- DO: Densidade(s) óptica(s) ou absorbância(s)
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EUA: Estados Unidos da América
- FRT: Sítios de reconhecimento da enzima de restrição “flippase”
- g: Gramas

- x g: Gravidade
- GALT: Tecido Linfoide Associado ao Intestino
- G+C: Refere-se ao conteúdo de Guanina e Citosina
- gDNA: DNA genômico
- h: Horas
- H<sub>2</sub>S: Sulfeto de Hidrogênio
- IFN $\gamma$ : Interferon gama
- IgE: Imunoglobulina E
- IgG: Imunoglobulina G
- IL-1 $\beta$ : Interleucina um beta
- IL-4: Interleucina quatro
- IL-6: Interleucina seis
- IL-12 $\alpha$ : Interleucina doze alfa
- IL-13: Interleucina treze
- IL-18: Interleucina dezoito
- Indel(s): Inserção(ões) e deleção(ões)
- Iniciador(es): Oligonucleotídeo(s) iniciador(es)
  - K1: Iniciador direto de verificação de inserção do cassete de canamicina
  - K2: Iniciador reverso de verificação de inserção do cassete de canamicina
- Kb: Kilopares de bases
- KCl: Cloreto de Potássio
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de potássio
- kV: Kilovolts
- LA: Ágar de lisogenia
- LB: Caldo de lisogenia
- LEE: “Locus of Enterocyte Effacement”
- LPS: Lipopolissacarídeo
- M: Molar
- Mb: Megapares de bases
- MgCl: Cloreto de Magnésio

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| MHC:                               | Complexo Maior de Histocompatibilidade                      |
| MHC-II:                            | Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe dois       |
| mim:                               | Minutos   |
| mL:                                | Mililitros  |
| mm:                                | Milímetros  |
| mM:                                | Milimolar   |
| mRNA:                              | RNA mensageiro  |
| MSLT:                              | Tipificação por Sequenciamento de Múltiplos Loci            |
| m / v:                             | Massa em volume   |
| mΩ:                                | MilliOhms   |
| μF:                                | MicroFarads   |
| μg:                                | Microgramas   |
| μL:                                | Microlitros   |
| μm:                                | Micrômetros   |
| μM:                                | Micromolar  |
| NaCl:                              | Cloreto de Sódio  |
| NADPH:                             | Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Fosfato             |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : | Fosfato de sódio  |
| NaOH:                              | Hidróxido de sódio  |
| NF-κB:                             | Fator nuclear <i>kappa</i> B                                |
| ng:                                | Nanogramas  |
| nm:                                | Nanômetros  |
| nM:                                | Nanomolar   |
| NO:                                | Óxido Nítrico   |
| NTS:                               | “Non-typhoidal” <i>Salmonella</i> ou Salmonelas paratíficas |
| pb:                                | Pares de bases  |
| PBS:                               | Tampão fosfato-salino ou solução salina fosfatada tamponada |
| PCR:                               | Reação em Cadeia da Polimerase                              |
| pH:                                | Potencial de hidrogênio                                     |
| PNSA:                              | Plano Nacional de Sanidade Avícola                          |
| RNA:                               | Ácido ribonucleico  |
| rRNA:                              | RNA ribossômico   |

- rpm: Rotações por minutos
- RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa
- s: Segundos
- SCV: Vacúolo contendo *Salmonella*
- sepi: Semana pós-infecção
- SG287/91: *Salmonella* Gallinarum estirpe 287/91 (fenótipo selvagem)
- SG9R: Estirpe vacinal rugosa de *S. Gallinarum*
- SG $\Delta$ *ccmH*: Clone de SG287/91 com deleção nas CDS dos genes *ccmH*
- SG $\Delta$ *ccmH*-1: Clone de SG287/91 com deleção na CDS do gene *ccmH* próximo ao “operon” *tor*
- SG $\Delta$ *ccmH*-2: Clone de SG287/91 com deleção parcial do gene *ccmH* próximo ao “operon” *nap*
- SG $\Delta$ *idnTO*: Clone de SG287/91 com deleção parcial nas CDS dos genes *idnT* e *idnO*
- SG $\Delta$ *idnTOccmH*: Clone de SG287/91 acumulando as mutações nas CDS dos genes *ccmH* e *idnTO*
- SP449/87: *Salmonella* Pullorum estirpe 449/87 (fenótipo selvagem)
- SPI: Ilha de Patogenicidade de *Salmonella*
- spv: Plasmídio de Virulência de *Salmonella*
- sRNA: Moléculas curtas de RNA
- T3SS-1: Sistema de secreção do tipo três vinculado à SPI-1
- T3SS-2: Sistema de secreção do tipo três vinculado à ilha de SPI-2
- T CD4<sup>+</sup>: Linfócitos T auxiliares
- T CD8<sup>+</sup>: Linfócitos T citotóxicos
- Th1: Resposta imunológica mediada por linfócito T auxiliar do tipo 1
- Th2: Resposta imunológica mediada por linfócito T auxiliar do tipo 2
- TLG: Transferência Lateral de Genes
- TLR: Toll-like Receptor
- tRNA: RNA transportador
- U: Unidade(s) universal(sais)
- UAC: Último Ancestral em Comum

- UFC / g: Unidades formadoras de colônias por grama de tecido
- UFC / mL: Unidades formadoras de colônias por mililitro de caldo de lisogenia
- UFP / mL: Unidades formadoras de placas por mililitro de cultura infectada
- V: Volts
- v / v: Volume em volume
- VB: Ágar Verde Brilhante
- VB Nal: Ágar Verde Brilhante contendo 100 µg / mL de ácido nalidíxico
- Φ P22: Bacteriófago P22
- Φ P22': Bacteriófago P22 recuperado da estirpe doadora

## Lista de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Detalhes sobre as deleções efetuadas no genoma de SG287/91.....  | 26 |
| Tabela 2. Antibióticos utilizados para clonagem dos plasmídios de mutagênese. ....   | 27 |
| Tabela 3. Sequência dos iniciadores de mutagênese utilizados nesse estudo.....   | 30 |
| Tabela 4. Composição do tampão de lise utilizado na extração do DNA cromossômico neste experimento. ....   | 34 |
| Tabela 5. Sequência dos iniciadores utilizados nesse estudo para confirmação das mutações. ....  | 35 |
| Tabela 6. Combinação de iniciadores utilizados na PCR de verificação e tamanho molecular (pb) dos fragmentos esperados.....  | 36 |
| Tabela 7. Composição do meio mínimo M9 utilizado nesse estudo.....   | 41 |
| Tabela 8. Contagem de micro-organismos viáveis obtidos por diluição seriada da cultura (experimento 1). ....   | 44 |
| Tabela 9. Contagem de micro-organismos viáveis obtidos por diluição seriada da cultura no experimento 2. ....  | 45 |
| Tabela 10. Genes de referência testados e suas informações relevantes. ....  | 47 |
| Tabela 11. Genes de resposta imunológica avaliados e suas informações relevantes. ....   | 49 |
| Tabela 12. Mortalidade observada em pintainhas infectadas, por via oral, no 21 <sup>o</sup> dia de vida com as estirpes selvagens e mutantes alvos desse estudo.....                         | 56 |
| Tabela 13. Informações relevantes sobre as eficiências da amplificação via RT-qPCR obtidas nesse estudo, as quais foram utilizadas para analisar os dados de expressão gênica relativa. .... | 61 |

## Lista de Figuras

- Figura 1. Representação esquemática do processo de invasão por *Salmonella* spp. (A) Resumo do processo de invasão intestinal e propagação para o GALT; (B) Principais etapas do processo de invasão e sobrevivência nos macrófagos. Imagens retiradas dos textos escritos por Bäumler; Tsolis; Heffron (2000) (A) e Sterzenbach et al. (2013) (B). .....7
- Figura 2. Esquema representativo dos plasmídios pKD3 e pKD4, os quais conferem resistência ao cloranfenicol e à canamicina, respectivamente. Os iniciadores de mutagênese amplificaram toda a região entre os dois retângulos azuis (sítios FRT). A sequência alvo dos iniciadores de mutagênese no plasmídio pKD3 possui 1.014 pb, enquanto que a sua correspondente no plasmídio pKD4 contém 1.477 pb. Em vermelho estão as CDS dos genes de resistência aos antibióticos e em amarelo os sítios de pareamento dos iniciadores padrão de checagem. ....31
- Figura 3. Esquema ilustrativo das ampliações e suas combinações executadas nesse estudo. A Figura 3A demonstra a posição natural das CDS dos genes *idnTO* mapeadas no genomas de SG287/91 (AM933173.1). O produto amplificado na estirpe selvagem possui 1.223 pb. A Figura 3B ilustra a inserção do fragmento de mutagênese no cromossomo de SG287/91 (seta roxa) por meio do método do “Lambda-Red” (DATSENKO; WANNER, 2000). Esse fragmento contém os sítios FRT e o gene codificador de resistência a antibiótico. A combinação dos iniciadores de verificação com aqueles padronizados para o interior do gene codificador de resistência à canamicina (K1 e K2) geram “amplicons” extras que asseguram a correta inserção do fragmento de mutagênese. A direção da seta indica o sentido de transcrição do gene. Seta verde: CDS do gene *idnT*; Seta vermelha: CDS do gene *idnO*; Seta roxa: Sítios FRT + CDS de resistência à canamicina; Setas cinzas: CDS dos genes que flanqueiam os genes *idnTO*; Setas curtas azuis: Representam os iniciadores de verificação; Setas curtas amarelas: Representam os iniciadores internos padronizados por Datsenko e Wanner (2000), denominados de K1 e K2. ....37

- Figura 4. Eletroferograma em gel de agarose 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados a partir do DNA da estirpe *SG $\Delta$ ccmH*. A Figura 4A foi obtida a partir do DNA de *SG $\Delta$ ccmH-1*, enquanto que a Figura 4B a partir do DNA de *SG $\Delta$ ccmH-2*. M: Marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Colunas 1 e 6: DNA de SG287/91; colunas 2 e 7: DNA de *SG $\Delta$ ccmH* com a “marca” de antibiótico; colunas 3 e 8: DNA da *SG $\Delta$ ccmH* sem a “marca” de antibiótico; coluna 4: DNA de *SG $\Delta$ ccmH* combinando-se os iniciadores *ccmH(test1B)-F+C1*; coluna 5: DNA de *SG $\Delta$ ccmH* combinando-se os iniciadores *ccmH(test1B)-R+C2*; coluna 9: DNA de *SG $\Delta$ ccmH* combinando-se os iniciadores *ccmH(test2B)-F+K2*; coluna 10: DNA de *SG $\Delta$ ccmH* combinando-se os iniciadores *ccmH(test2B)-R+K1*. Tamanhos moleculares esperados na Tabela 6. ....52
- Figura 5. Eletroferograma em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificado a partir do DNA do clone *SG $\Delta$ idnTO*. M: Marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA); coluna 1: DNA de SG287/91; coluna 2: DNA de *SG $\Delta$ idnTO* com a “marca” de antibiótico; coluna 3: DNA de *SG $\Delta$ idnTO* sem a “marca” de antibiótico; coluna 4: DNA de *SG $\Delta$ idnTO* combinando-se os iniciadores *idnTOteste-F+K1*; coluna 5: DNA de *SG $\Delta$ idnTO* combinando-se os iniciadores *idnTOteste-R+K2*. Tamanhos moleculares esperados disponíveis na Tabela 6. ....53
- Figura 6. Curvas-consenso da multiplicação das bactérias testadas nesse estudo em meio mínimo M9 contendo ácido glucônico como única fonte de carbono e energia. Símbolos são representados pela média e desvio padrão. ....54
- Figura 7. Sinais clínicos mais evidentes entre os animais infectados com *S. Gallinarum* (estirpes mutantes e selvagem). A: Diarreia verde-amarelada; B: Ao fundo, próximo ao bebedouro, nota-se que as aves apresentavam aspecto “encorujado” e penas eriçadas, típicos de estado febril; C: Aves mortas pertencentes aos grupos infectados por via oral com as estirpes de *S. Gallinarum* alvo desse estudo. ....55
- Figura 8. Lesões macroscópicas identificadas em aves infectadas aos 21 dias de vida pelas estirpes testadas nesse estudo. Figuras 8A-8D ilustram as principais alterações encontradas nos órgãos de aves mortas pelo tido aviário, infectadas

*S. Gallinarum*, estirpes mutantes ou selvagem. Figuras 8E-8H ilustram as principais alterações encontradas nos tecidos de animais infectados por SP449/87. Figura 8A: Hepatomegalia: O órgão está aumentado de volume e pôde ser visto antes de acessar a cavidade celomática (círculo preto); Figura 8B: Hepatomegalia, pontos esbranquiçados difusos e região de descoloração indicada por seta preta; Figura 8C: Esplenomegalia e presença de pontos esbranquiçados difusos sobre o órgão; Figura 8D: Congestão hepática. O sangue pode ser visto no parênquima do órgão; Figura 8E: Fígado congesto com as bordas esverdeadas e presença de conteúdo fibrinoso sobre sua superfície; Figura 8F: Presença de nódulos caseosos multifocais no duodeno (setas pretas); Figura 8G: Nódulos esbranquiçados no duodeno visto a partir da superfície mucosa (área destacada); Figura 8H: Hidropericárdio (seta branca) e presença dos nódulos caseosos difusos sobre a superfície do miocárdio (seta preta). .....58

Figura 9. Estimativa média do número ( $\log_{10}$ ) de UFC / g de fígado e baço de pintinhas infectadas por via oral no 15° dia de vida. Letras diferentes entre colunas do mesmo gráfico indicam que houve diferença estatística significativa na contagem de UFC entre diferentes grupos de infecção ( $P < 0,05$ ). SP449/87: *S. Pullorum* estirpe 449/87; SG287/91: *S. Gallinarum* estirpe 287/91; SG $\Delta$ *ccmH*: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *ccmH*; SG $\Delta$ *ccmHidnTO*: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *ccmH* e *idnTO*; SG $\Delta$ *idnTO*: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *idnTO*. .....60

Figura 10. Expressão de citocinas pró-inflamatórias em tonsila cecal (TC) ou baço (BA) colhidos de pintainhas infectadas no 15° dia de vida pelas estirpes alvo desse estudo. Letras diferentes ente grupos no mesmo gráfico indica que a diferença observada tem suporte estatístico. Controle: Aves inoculadas com LB estéril a fim de compor o controle negativo; SP449/87: *S. Pullorum* estirpe 449/87; SG287/91: *S. Gallinarum* estirpe 287/91; SG $\Delta$ *ccmH*: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *ccmH*; SG $\Delta$ *ccmHidnTO*: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS

|   |    |
|---|----|
| dos genes <i>ccmH</i> e <i>idnTO</i> ; <i>SGΔidnTO</i> : <i>S. Gallinarum</i> estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes <i>idnTO</i> ..... | 64 |
|---|----|

## 1. INTRODUÇÃO

A presença de determinados sorotipos de *Salmonella* em lotes de aves tem repercussão negativa no mercado interno e pode impactar na exportação de produtos avícolas. A fim de proteger a indústria nacional, a Instrução Normativa (IN) 78 de 3/11/2003 do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) preconiza que todo lote de reprodutoras que for positivo nos testes laboratoriais para *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* deve ter seus animais sacrificados e todos os ovos provenientes do núcleo, incubados ou não, destruídos. Se forem positivos os lotes de matrizes, deve-se sacrificar as aves desses lotes e eliminar os ovos produzidos no caso de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, mas não no caso de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* para as quais se permite tratamento seguido de monitoria intensiva. No entanto, não existe legislação vigente que trate da positividade desses micro-organismos em lotes de aves comerciais ou do isolamento de outros sorotipos capazes de chegar ao homem por meio da ingestão de produtos avícolas.

*S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, em especial, não apresentam perigo iminente para a saúde pública, sendo importantes patógenos de aves nas quais causam o tifo aviário e a pulorose, respectivamente. Ambas as enfermidades são de notificação obrigatória e são frequentemente diagnosticadas nos plantéis avícolas dos países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), o tifo aviário no Brasil mantém o “status” de doença presente no país, tendo sido notificado 70 vezes de 2006 a 2016. A pulorose também mantém o “status” de presente no país, porém foi notificada somente 19 vezes no mesmo período.

A infecção de aves suscetíveis por *S. Gallinarum* leva ao desenvolvimento de sepsse, elevada mortalidade entre os animais infectados e refugagem dos sobreviventes. A bactéria se propaga por via horizontal e por isso, não tem epidemiologia ligada ao incubatório, mas às aves de vida longa. Já a pulorose é uma infecção principalmente de aves jovens. A bactéria é transmitida pelas vias vertical e horizontal e tem seu curso dependente da idade e do estado imunológico do indivíduo. Se infectar aves suscetíveis de poucos dias de vida ou imunossuprimidas,

desencadeia enfermidade com quadro de sepse e alta mortalidade, porém a relação com aves adultas imunocompetentes é mais branda do que a observada no tifo aviário, a infecção é frequentemente assintomática e o animal desenvolver o estado de portador, transmitindo a bactéria por via transovariana.

Pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares responsáveis por suas diferentes interações com o hospedeiro. Sabe-se que a resposta imune desencadeada contra o tifo aviário e a pulorose assume perfis diferentes, explicando parcialmente as diferentes enfermidades, porém nenhum fator inerente aos micro-organismos foi descrito até o momento. Estudos de comparação genômica revelaram processo de ruptura em gênica em progresso, em ambas as bactérias, com formação de pseudogenes conservados e específicos a uma ou a outra. Entre esses, os genes *citE2*, *torTRCA*, *idnTO* entre outros teriam tido ligação com o metabolismo de *S. Pullorum*. Atualmente, há várias evidências científicas que apontam para a conexão entre o metabolismo e a virulência de um patógeno. Em outras palavras, esses estudos demonstram como as exigências nutricionais de um micro-organismo interferem em sua forma de expressar os seus genes de virulência. No entanto ainda é escasso esse tipo de informação para os biotipos *Gallinarum* e *Pullorum*.

Sabe-se que *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* apresentam relação filogenética e alta semelhança do conteúdo gênico, porém desenvolvem diferentes interações com as aves. Assim, pressupõe-se que ambas as bactérias tenham sofrido inativação diferencial em genes ligados ao metabolismo como mecanismo para modular diferencialmente um conjunto de genes de virulência semelhante. Por isso, no presente estudo investigou-se o efeito de deleções parciais nas sequências codificantes dos genes *idnT*, *idnO* e *ccmH*, todos envolvidos no metabolismo bacteriano, sobre a patogenia do tifo aviário. As sequências nucleotídicas dos genes selecionados nesse estudo sofreram processo conservado de ruptura em *S. Pullorum*, mas não em *S. Gallinarum*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Gênero *Salmonella*: Características gerais e nomenclatura

O gênero *Salmonella* abrange conjunto de bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes, não esporuladas, anaeróbias facultativas, produtores de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e, em sua maioria, não fermentadoras de lactose (GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000). Faz parte da família Enterobacteriaceae, ao lado de micro-organismos dos gêneros *Proteus*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Escherichia*, entre outros (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Análises filogenéticas apontam que os primeiros organismos de gênero *Salmonella* teriam emergido entre 120-160 milhões de anos após divergirem do último ancestral em comum com micro-organismos do gênero *Escherichia* (OCHMAN; WILSON, 1987). Tal divergência teria se dado pela aquisição de mais de 600 famílias de genes, dentre os quais destacam-se aqueles contidos em ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (“*Salmonella* Pathogenicity Island” – SPI) que teriam habilitado o micro-organismo a sobreviver parasitando o hospedeiro (DESAI et al., 2013).

Atualmente, estão catalogados 2.659 sorotipos membros do gênero *Salmonella* (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014) e estes são identificados pela combinação de provas sorológicas e bioquímicas (GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000). A sorotipificação tem sido a base da identificação dos sorotipos de *Salmonella* visto que as propriedades bioquímicas caracterizam o gênero (GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000). Os anticorpos são produzidos para detectar os diferentes carboidratos terminais da cadeia lateral do antígeno “O”, parte essencial do lipopolissacarídeo (LPS) na parede celular bacteriana, e a porção variável do antígeno “H” ou flagelar (GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000). Em algumas ocasiões, o antígeno “Vi”, de virulência ou capsular também pode ser identificado em sorotipos específicos (GRIMONT; WEILL, 2007).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* sofreu várias modificações desde a publicação de seu primeiro isolado, *S. Choleraesuis*, por Salmon e Smith em 1886

(GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000). Análises de hibridização de ácido desoxirribonucleico (DNA) ajudaram a estabelecer a relação entre os sorotipos e a distinção das espécies e subespécies de *Salmonella* (GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000). A forma de denominação mais aceita e usada atualmente foi proposta em 1987 por Le Minor e Popoff e divide o gênero entre duas espécies, *enterica* e *bongori*. A espécie *enterica* por sua vez foi subdividida em seis subespécies denominadas *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (GRIMONT; WEILL, 2007). Os sorotipos são nomeados por sua fórmula antigênica (antígenos O : H), embora a nomenclatura antiga, a qual representa o local de isolamento (ex. *S. London*), a doença desencadeada no hospedeiro (ex. *S. Typhi*) ou o hospedeiro ao qual o sorotipo está relacionado (ex. *S. Gallinarum*), foi paralelamente mantida para alguns membros de *S. enterica* subsp. *enterica* (GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000). Portanto, ao se dizer ou ouvir o nome *Salmonella* Enteritidis, deve-se entender que a nomenclatura completa é *Salmonella enterica* subespécie (subsp.) *enterica* sorotipo Enteritidis (ou sorotipo 1,9,12:g,m:-).

A nomenclatura de *Salmonella* spp. ainda não é definitiva e pode sofrer modificações à medida que novas técnicas sejam aplicadas para esse propósito. A aplicação da sorotipificação na identificação dos sorotipos de *Salmonella* subsp. *enterica* foi questionada por Achtman et al. (2012), que propuseram a substituição do método clássico pela Tipificação por Sequenciamento de Múltiplos Loci (“Multilocus Sequence Typing” – MLST). Segundo esses autores, o MLST aumentaria a confiança na identificação dos sorotipos, pois essa os agruparia em nível de semelhança genética e, por isso, seria imune aos fatores que alteram os antígenos somáticos, como a fago-conversão do antígeno O, ou de alterações atípicas na expressão de flagelos, como ocorre em alguns isolados de *S. Typhimurium* que só expressam uma fase flagelar. Nesse novo sistema (“MLST scheme”) para tipagem de *Salmonella* subsp. *enterica*, os sorotipos não mais seriam identificados por seus nomes atuais, ou formulação antigênica, mas pelo grupo ao qual está inserido (eBurstGroups – eBG). O eBG ainda forneceria informação sobre o grau de semelhança entre os isolados de um mesmo tipo, dado esse valioso para fins epidemiológicos e que não é fornecido pela forma clássica de identificação.

Contudo, esse sistema ainda precisa ser validado pela comunidade científica antes de ser substituído para o método atual, o que pode levar anos de estudo.

## 2.2. Patogenia das salmoneloses

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* alberga mais de 50% dos sorotipos conhecidos (1.586 sorotipos) e também aqueles mais importantes em saúde humana e dos animais domésticos (CDC, 2012; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). De acordo com o relatório de vigilância em salmoneloses, publicado em 2012 pelo Centros de Controle e Prevenção de Doenças (“Centers for Disease Control and Prevention” – CDC) dos Estados Unidos da América (EUA), somente em torno de 100 sorotipos estiveram comumente envolvidos na rotina clínica humana e veterinária, naquele país, entre 2002 e 2012 (CDC, 2012), todos pertencentes à *Salmonella* subsp. *enterica*.

A manifestação clínica da infecção causada por *Salmonella* spp. em animais homeotérmicos, incluindo os seres humanos, é dependente do sorotipo envolvido (STERZENBACH et al., 2013). Em humanos, os sorotipos denominados de não tifoídes (“Non-Typhoidal *Salmonella*” – NTS) causam doença predominantemente gastrointestinal, com quadro de diarreia aquosa que tende a ser autolimitante em pacientes imunocompetentes, enquanto os sorotipos tifoídes, causadores de enfermidade chamada de febre tifoide, provocam quadro clínico severo com desenvolvimento de sepse, dispersão sistêmica do patógeno que se multiplica nos órgãos do sistema reticuloendotelial (fígado e baço), raro aparecimento de quadros diarreicos e, se não diagnosticada e tratada, pode levar o paciente a óbito (GALMOR; BOYLE; GRASSL, 2014; RYCHLIK; ELSHEIMER-MATULOVA; KYROVA, 2014; KEESTRA-GOUNDER; TSOLIS; BÄUMLER, 2015). Nos animais, as salmoneloses são causadas por NTS e essas são divididas em gastroenterite, com características semelhantes às causadas por NTS em humanos e enfermidade sistêmica ou extraintestinal, que provoca sepse e bacteremia nos animais acometidos (SANDERSON; NAIR, 2013).

Os sorotipos de *Salmonella* são também classificados de acordo com a diversidade de hospedeiros que podem infectar. São denominados de restritos ou de adaptados aqueles sorotipos cuja habilidade de infecção é restrita a única ou a pequeno número de espécies, respectivamente (STEVENS; HUMPHREY; MASKELL, 2009). Entre eles estão *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em algumas espécies de aves (SHIVAPRASAD; BARROW, 2013) e *S. Typhi* em humanos (GALMOR; BOYLE; GRASSL, 2014). Outros sorotipos não possuem restrição de hospedeiro (generalistas) e podem colonizar e invadir ampla variedade de espécies, sendo *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* os mais conhecidos (STEVENS; HUMPHREY; MASKELL, 2009). Via de regra, os sorotipos restritos ou adaptados causam predominantemente doença tifoide ou sistêmica, enquanto que os sorotipos generalistas, gastroenterite (SANDERSON; NAIR, 2013). Contudo, exceções a essa regra não são incomuns como, por exemplo, *S. Typhimurium* que causa gastroenterite autolimitante em seres humanos e na maioria dos animais imunocompetentes, bacteremia em seres humanos imunossuprimidos e doença sistêmica em camundongos (KEESTRA-GOUNDER; TSOLIS; BÄUMLER, 2015).

Muito do que se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade de *Salmonella* spp. é proveniente de estudos historicamente conduzidos com *S. Typhimurium* em camundongos (JANAKIRAMAN; SLAUCH, 2000; BAISÓN-OLMO; GALINDO-MORENO; REMOS-MORALES, 2015; GOLUBEVA et al., 2016). *Salmonella* spp. são patógenos intracelulares que invadem o hospedeiro por via oral, por meio da ingestão de produtos contaminados pelas bactérias (MARCUS et al., 2000). O micro-organismo atravessa o sistema gastrointestinal e expressa diferentes conjuntos de genes que auxiliam na sobrevivência frente às barreiras impostas pelo hospedeiro, tais como variação do pH, ação das enzimas digestivas e peristaltismo intestinal (BÄUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 2000; MARCUS et al., 2000).

Ao atingir o intestino, o patógeno invade células específicas, denominadas de células M (“microfold cells”), parte integrante das placas de Peyer, localizadas nos tecidos linfóides associados ao intestino (“Gut-Associated Lymphoid Tissue” – GALT), onde entra em contato com as células do sistema imunológico, especialmente aquelas do sistema mononuclear fagocítico, i.e., macrófagos e

células dendríticas (BÄUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 2000; MARCUS et al., 2000). No interior destas células, *Salmonella* spp. se instalam em estruturas especializadas denominadas de vacúolo contendo *Salmonella* (“*Salmonella*-containing vacuole” – SCV), as quais proporcionam ambiente conveniente para a sobrevivência e multiplicação do micro-organismo (BÄUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 2000; MARCUS et al., 2000). A Figura 1 resume didaticamente as etapas envolvidas na infecção por *Salmonella* spp. e apresenta alguns dos genes ativados no processo.

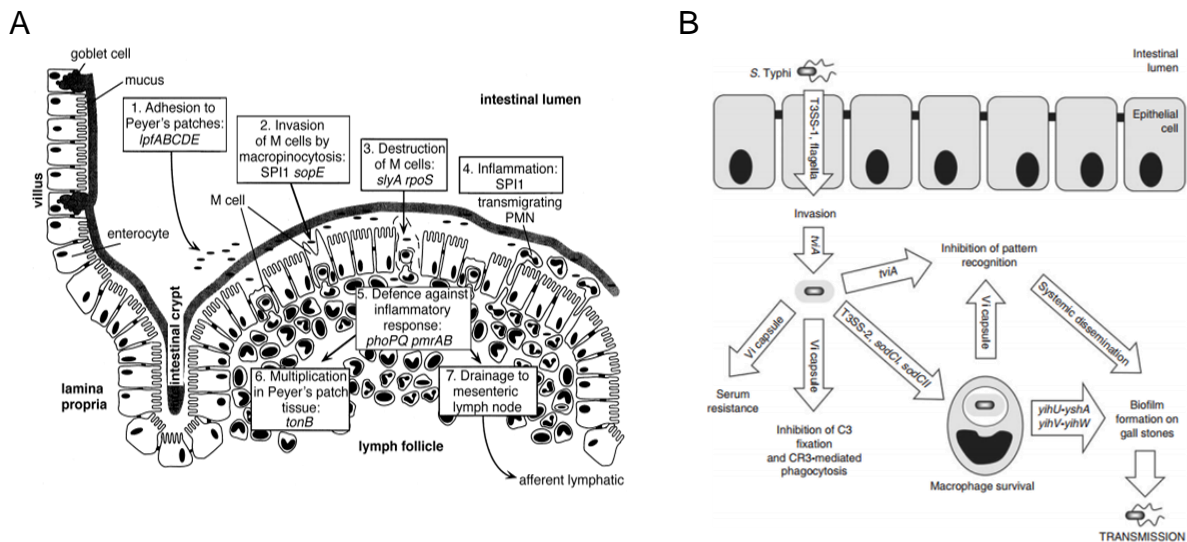


Figura 1. Representação esquemática do processo de invasão por *Salmonella* spp.

(A) Resumo do processo de invasão intestinal e propagação para o GALT; (B) Principais etapas do processo de invasão e sobrevivência nos macrófagos. Imagens retiradas dos textos escritos por Bäumlér; Tsolis; Heffron (2000) (A) e Sterzenbach et al. (2013) (B).

A progressão da infecção, com desenvolvimento de doença clínica, é estritamente dependente da capacidade de *Salmonella* spp. invadir as células epiteliais intestinais e de sobreviver no interior das células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro (FIELD et al., 1986; MARCUS et al., 2000). Estirpes mutantes prejudicadas em sua habilidade de sobreviver no interior dos macrófagos se tornaram atenuadas em diferentes modelos animais (FIELD et al., 1986; JONES et al., 2001; COBURN et al., 2005). Com o propósito de atender tais exigências, *Salmonella* expressa vários genes de virulência, alguns contidos no cromossomo

bacteriano, em ilhas e ilhotas de patogenicidade, outros situados em plasmídios de virulência (MARCUS et al., 2000; STERZENBACH et al., 2013). As SPI-1 e SPI-2 são as mais bem estudadas e caracterizadas, embora outras SPIs começaram a ter função elucidada em sorotipos específicos (MARCUS et al., 2000; RETAMAL; CASTILLO-RUIZ; MORA, 2009; BLONDEL et al., 2010; STERZENBACH et al., 2013).

A SPI-1 tem aproximadamente 40 kilopares de bases (Kb) e, de acordo com Desai et al. (2013), é uma das mais antigas aquisições genéticas, ao lado das SPI-4 e SPI-5, a possibilitar a emergência dos membros do gênero *Salmonella* como patógenos. A SPI-1 codifica o sistema de secreção do tipo três (“Type Three Secretion System – T3SS-1), uma estrutura especializada em forma de agulha que permite a injeção de proteínas bacterianas efetoras no citoplasma das células do hospedeiro com o propósito de manipular os sinais celulares levando, dessa forma, ao rearranjo do citoesqueleto e a captação do patógeno por micropinocitose (BÄUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 2000; MARCUS et al., 2000). Essas proteínas promovem a colonização e invasão das células epiteliais e a indução de inflamação nos intestinos do hospedeiro (BÄUMLER; TSOLIS; HEFFRON, 2000; HAPFELMEIER et al., 2005; RAFFATELLU et al., 2005; MÜLLER et al., 2009).

Mais tarde, ao longo de sua evolução, *Salmonella* incorporou em seu cromossomo outro pacote de genes compilados na denominada SPI-2 (DESAI et al., 2013). Esse conjunto gênico teria habilitado o micro-organismo a sobreviver e se replicar no interior das células fagocíticas do hospedeiro (MARCUS et al., 2000; WATERMAN; HOLDEN, 2003; BUCKNER et al., 2011; FIGUEIRA; HOLDEN, 2012). A SPI-2 é constituída por sistema regulatório de dois componentes (*phoPQ*), por T3SS (SST3-2) distinto do T3SS-1 e outras sequências gênicas (MARCUS et al., 2000) e a maioria das proteínas efetoras secretadas pelo T3SS-2 são codificadas por genes fora da SPI-2 (FIGUEIRA; HOLDEN, 2012). Ao ser internalizada, a bactéria se protege no interior do SCV e, por meio do T3SS-2, secreta proteínas efetoras para o citosol do macrófago, as quais inibem o tráfego da enzima NADPH oxidase (“Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate”) para o SCV, levando a redução da explosão oxidativa (“oxidative burst”) e dano celular (VAZQUEZ-TORRES et al., 2000), retardam a morte celular por apoptose, controlam o

posicionamento do SCV, controlam o citoesqueleto celular e modulam a resposta imunológica, entre outras (WATERMAN; HOLDEN, 2003; FIGUEIRA; HOLDEN, 2012).

A princípio, acreditava-se que ambas as SPIs tinham funções específicas e independentes. No entanto, há evidências de que os genes de virulência em ambas as ilhas trabalham em conjunto para permitir a invasão dos enterócitos e a inflamação dos intestinos, bem como para a propagação sistêmica e replicação do patógeno nos fagócitos. Dieye et al. (2009) demonstraram em modelo de salmonelose não tifoide que estirpe de *S. Typhimurium* sem a SPI-1 não era capaz de colonizar o baço de pintinhos eficientemente como o fez a estirpe selvagem. Buckner et al. (2011) estudaram a função de algumas proteínas secretadas pelo T3SS-2, em modelo de tifo em camundongos e constataram que estirpes de *S. Typhimurium* com deleção dos genes *spiC* e *spvB* foram prejudicadas em sua habilidade de colonizar o intestino grosso e o íleo de camundongos C57BL/6, enquanto que a deleção do gene *sseI* levou a pobre colonização do íleo. Hapfelmeier et al. (2005) demonstraram que estirpes mutantes de *S. Typhimurium* incapazes de secretarem proteínas efetoras pelo T3SS-1 e outras incapazes de o fazerem pelo T3SS-2, induziram colite em camundongos C57BL/6 pré-tratados com estreptomicina, porém as lesões histológicas observadas foram diferentes e se complementavam quando comparadas àquelas provocadas pela estirpe selvagem, demonstrando que ambas as ilhas precisam estar intactas para a completa expressão da patogenicidade.

Além dos genes de virulência presentes no cromossomo bacteriano, *Salmonella* spp. hospedam plasmídios de virulência ("*Salmonella* plasmid virulence" - spv) nos seus citoplasmas. O spv é encontrado na maioria das estirpes de *Salmonella* e contém genes de virulência agrupados no chamado "spv operon" (PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003), cuja função é essencial na patogenicidade bacteriana. Barrow et al. (1987) e Bakshi et al. (2003) demonstraram em modelo de infecção *in vivo* que a remoção do plasmídio de virulência do citoplasma bacteriano resulta em completa atenuação da bactéria. Por exemplo, as proteínas SpvB e SpvC, codificadas por genes do "spv operon", são secretadas pelo T3SS-2; a

primeira supostamente age sobre o citoesqueleto celular, enquanto a última interfere com os sinais celulares da resposta imune (FIGUEIRA; HOLDEN, 2012).

Foi descoberto recentemente sequência de ácido ribonucleico (RNA) regulador (“small RNA” - sRNA) no plasmídio de virulência de *S. Typhimurium*, denominado lesR-1 (“Intracellular-expressed-sRNA-1”), o qual regula a expressão do gene cromossômico PSLT047 que estaria supresso durante invasão de fibroblastos por *S. Typhimurium*, sugerindo possível mecanismo de persistência de *Salmonella* nos tecidos epiteliais do hospedeiro (GONZALO-ANSENSIO et al., 2013). Os plasmídios de *Salmonella* também podem conter sequências gênicas que conferem resistência aos antibióticos. Parkhill et al. (2001) relataram a presença de plasmídio em *S. Typhi* estirpe C18, denominado de pHCM1, que conferia resistência à múltiplos agentes antimicrobianos.

## 2.3. Tifo Aviário e Pulorose

### 2.3.1. Propriedades dos agentes etiológicos

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Gallinarum biotipo Gallinarum (*S. Gallinarum*) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Gallinarum biotipo Pullorum (*S. Pullorum*) são os respectivos agentes do tifo aviário e da pulorose (SHIVAPRASAD; BARROW, 2013). Essas bactérias compartilham muitas de suas características fenotípicas e genotípicas. Devido à diferenciação entre elas ser baseada principalmente em provas bioquímicas e as doenças apresentarem perfis distintos, Popoff e Le Ninor (2005) sugeriram que esses micro-organismos deixassem de ser tratados como diferentes sorotipos e fossem considerados biotipos do sorotipo Gallinarum. Essa nomenclatura, no entanto, não é universalmente aceita e alguns grupos de pesquisadores ainda tratam-nas como sorotipos distintos.

De acordo com o esquema White-Kauffmann-Le Minor de sorotipificação de *Salmonella* (GRIMONT; WEILL, 2007), os biotipos Gallinarum e Pullorum fazem

parte do sorogrupo D e compartilham a seguinte fórmula antigênica: 1,9,12:-:-. A natural incapacidade de expressar flagelos torna esses micro-organismos peculiares dentro do gênero, visto que são os únicos membros descritos até o momento que apresentam tal particularidade (GRIMONT; WEILL, 2007). Além disso, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são pobres produtoras de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (CHRISTENSEN et al., 1992) e essa característica pode ser utilizada para diferenciá-las de outros membros do gênero *Salmonella* que acometem comumente as aves (SHIVAPRASAD; BARROW, 2013).

*S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são micro-organismos auxotróficos (JONES; MCLAREN; WRAY, 2000; CHAPPELL et al., 2009), ou seja, necessitam da adição de fatores de crescimento em meios de cultivo para que se multipliquem. Suas habilidades bioquímicas são mais semelhantes que diferentes. Ambos são capazes de descarboxilar lisina, fermentar L(+)Arabinose, D(-)Ribose, D(-)Manitol, D(-)Frutose, D(+)Glicose, entre outros (CHRISTENSEN et al., 1992). Contudo, a capacidade de fermentar dulcitol, D(-)Sorbitol, Maltose e dextrina seria predominantemente observada em isolados do biotipo *Gallinarum*, enquanto que a habilidade de descarboxilar ornitina e produzir gás a partir da fermentação de glicose, dominantes em isolados do biotipo *Pullorum* (CHRISTENSEN et al., 1992). As provas de fermentação de dulcitol e descarboxilação de ornitina têm sido particularmente aplicadas no diagnóstico laboratorial diferencial desses biovars (SHIVAPRASAD; BARROW, 2013; OIE, 2012).

### 2.3.2. Salmonelas sistêmicas nas aves: O tifo aviário e a pulorose

O tifo aviário, causado por *Salmonella Gallinarum*, é uma infecção de galináceos com graves consequências na avicultura industrial, enquanto que a pulorose, provocada por *S. Pullorum*, ocorre nas aves de produção industrial (BARROW; FREITAS NETO, 2011; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009; SHIVAPRASAD; BARROW, 2013). Atualmente, ambas fazem parte da lista de

doenças de notificação obrigatória publicada pela Organização Mundial de Saúde Animal (“World Organisation for Animal Health” – OIE) (OIE, 2017).

O tifo aviário é uma enfermidade sistêmica de curso agudo ou crônico, com progressão para sepse, comprometimento dos órgãos sistêmicos e prognóstico reservado, pois frequentemente leva os animais acometidos a óbito (BARROW; FREITAS NETO, 2011). A enfermidade pode ser observada em aves de qualquer idade, apesar de ser nas adultas que esta se manifesta com maior frequência (OIE, 2012). A doença é transmitida por via horizontal, isto é, por meio do contato direto entre aves sadias e carcaças de aves mortas pela enfermidade (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009; BARROW; FREITAS NETO, 2011). A transmissão vertical não parece possível no tifo aviário, ou pelo menos não da forma que ocorre na pulorose (CELIS-ESTUPIÑAN et al., 2017). A morbidade e a mortalidade causadas por essa doença são dependentes de fatores tais como dose infectante, presença de doenças concomitantes no lote, estado nutricional das aves e composição genética da linhagem, entre outras, porém a mortalidade pode atingir de 40%-80% de um lote de aves suscetíveis (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Esta, contudo, ocorre de forma gradativa na granja (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A pulorose, por sua vez, é definida como enfermidade sistêmica aguda, predominante em animais jovens e que produz alta mortalidade nas primeiras semanas de vida (OIE, 2012). A doença é transmitida por via vertical ou transovariana, promovendo decréscimo da eclodibilidade e aumento da mortalidade nos incubatórios, ou por via horizontal por meio do contato de pintinhos sadios com animais mortos pela enfermidade ou restos de cascas de ovos contaminadas pelo patógeno, fundamentando a alta mortalidade nos primeiros 14 dias de vida (SHIVAPRASAD; BARROW, 2013). Galinhas adultas imunocompetentes geralmente não manifestam a forma clínica da doença, embora alterações patológicas possam ser encontradas na necropsia (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Uma parcela dos animais que se infectam nas primeiras semanas de vida, e sobrevivem a doença clínica, se torna portadora assintomática de *S. Pullorum*, que persiste nos macrófagos esplênicos (WIGLEY et al., 2001). No início do período de postura, geralmente entre 16 e 18 semanas de vida, a galinha sofre alterações hormonais

que levariam a imunossupressão temporária e propagação de *S. Pullorum* para os tecidos do trato reprodutivo, de onde o micro-organismo seria capaz de ser transmitido verticalmente para a progênie (WIGLEY et al., 2005a).

O tifo aviário e a pulorose não induzem o aparecimento de sinais clínicos específicos e lesões patognomônicas. Por isso, o diagnóstico das doenças se baseia na anamnese, achados clínicos, exames anatomopatológicos e diagnóstico laboratorial com isolamento e identificação das bactérias (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Os principais sinais clínicos observados e também comuns às doenças são sonolência, fraqueza, penas eriçadas, asas caídas, desidratação, anorexia, dificuldade respiratória, amontoamento das aves (animais jovens) e diarreia verde-amarelada no tifo aviário e branca na pulorose (SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD; BARROW, 2013). À necrópsia, observa-se evidente hepato e esplenomegalias e o fígado pode apresentar pequenos pontos esbranquiçados e dispersos em sua superfície no tifo aviário enquanto que esses sinais seriam de leve a moderado na pulorose (SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD; METHNER; BARROW, 2013). Ainda podem ser observados hidropericárdio, acúmulo de substância caseosa com aspecto tumoral no miocárdio e nos intestinos e pontos hemorrágicos no tecido adiposo aderido ao miocárdio na pulorose e hipertrofia renal no tifo aviário (SHIVAPRASAD, BARROW, 2013; SHIVAPRASAD; METHNER; BARROW, 2013).

A resistência ao tifo aviário e à pulorose é variável entre as linhagens de aves comerciais. De modo geral, as linhagens pesadas selecionadas para produção de carne (frango de corte) e semipesadas selecionadas para postura de ovos vermelhos são consideradas sensíveis, enquanto que as linhagens leves selecionadas de postura de ovos brancos são consideradas resistentes (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Oliveira, Berchieri Junior e Fernandes (2005) demonstraram que aves de linhagem leve, apesar de serem mais resistentes ao tifo aviário, ou seja, não apresentarem sinais clínicos evidentes com progressão para morte, tendem a albergar *S. Gallinarum* por mais tempo no organismo e poderiam servir como fontes de infecção dentro do lote. Os fatores relacionados à resistência às salmoneloses ainda não foram completamente compreendidos, porém alguns genes têm sido apontados como mediadores desse fenótipo. Entre eles destacam-

se os genes SLC11A1 (antigo NRAMP1), SAL1 envolvido no controle do patógeno no baço, o gene codificador do receptor do tipo “toll”-4 (“Toll-like receptor” 4 – TLR4) e os genes do complexo maior de histocompatibilidade (“Major Histocompatibility Complex” – MHC) (MARIANI et al., 2005; CALENGE et al., 2010).

O tifo aviário e a pulorose são enfermidades controladas em países desenvolvidos e é naqueles ainda em desenvolvimento, especialmente em regiões onde as medidas de controle não são eficientemente aplicadas ou a condição ambiental favorece a multiplicação e propagação dos patógenos, que as doenças são relevantes (SHIVAPRASAD; BARROW, 2013; BARROW; FREITAS NETO, 2011). O controle dessas doenças nos EUA e em países europeus se deve ao estabelecimento de programas de controle visando a identificação e abate dos animais positivos (SHIVAPRASAD; BARROW, 2013; SHIVAPRASAD; METHNER; BARROW, 2013). O desenvolvimento do teste de soroaglutinação rápida em 1931 e sua aplicação no monitoramento do lote de aves reprodutoras tem sido peça chave no controle da pulorose nas granjas (SHIVAPRASAD; BARROW, 2013; SHIVAPRASAD; METHNER; BARROW, 2013).

No Brasil existe um programa vigente desde 1994, denominado de Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que visa à eliminação de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* dos lotes de aves e a eliminação ou o controle de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (BRASIL, 2009). No que tange ao tifo aviário e à pulorose, as diretrizes do programa objetivam a identificação de aves reprodutoras portadoras pelos biotipos *Gallinarum* ou *Pullorum* e a eliminação dos animais e dos ovos provenientes desses núcleos. O diagnóstico laboratorial deve visar o isolamento e a identificação precisa das bactérias (SHIVAPRASAD; BARROW, 2013; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). A disponibilização de testes moleculares com o propósito de identificar e diferenciar os biotipo *Gallinarum* e *Pullorum* tem se tornado comum na literatura científica (KWON et al., 2000; SHAH et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009; KANG et al., 2012a; BATISTA et al., 2016). Tais testes trazem a vantagem de serem acurados (específicos e sensíveis) e rápidos, e poderiam no futuro fazer oficialmente parte da rotina laboratorial veterinária.

Em alguns dos países onde o tifo aviário e a pulorose são problemas recorrentes, o uso de vacinação é permitido. Dentre elas, a vacina 9R (SG9R) é a

mais comumente utilizada. Esta contém estirpe viva de *S. Gallinarum*, cujo LPS não se forma adequadamente tornando a bactéria rugosa e atenuada para aves, embora Kang et al. (2012b) afirmam que outras alterações em nível genético parecem somar para a atenuação de SG9R. Outras opções de vacinas a serem utilizadas principalmente no controle do tifo aviário estão surgindo e poderiam ser opções comerciais no futuro (PENHA FILHO et al., 2010; CHAUDHARI et al., 2012; MITRA et al., 2015). É importante salientar que a vacinação deve ser encarada como parte de um programa maior de biossegurança, no qual se considera o manejo dos resíduos, o controle de roedores e a completa desinfecção das granjas e incubatórios, entre outros, prioritários e indispensáveis no controle do tifo aviário e da pulorose (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

### 2.3.3. Imunobiologia do tifo aviário e da pulorose

A resistência aviária às salmoneloses depende da ação efetora das células do sistema imunológico inato, mediada principalmente pela ação dos macrófagos e heterófilos, com subsequente desenvolvimento da resposta imune adaptativa (WIGLEY et al., 2006). A cascata de eventos que ocorre desde a invasão bacteriana na mucosa intestinal até a ativação das células de defesa do hospedeiro é dirigida pela expressão e liberação de proteínas sinalizadoras denominadas de citocinas e quimiocinas, responsáveis por definir o curso da resposta imunológica (FOSTER; BERNDT, 2013).

Ainda não é completamente compreendida a interação ente *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e a ave durante o tifo aviário e a pulorose, respectivamente. A progressão dessas infecções foi didaticamente dividida por Chappell et al. (2009) em três fases: A primeira compreende os eventos desde a entrada bacteriana por via oral até a invasão das células intestinais; a segunda abrange a propagação dos micro-organismos para o fígado e baço com desenvolvimento das enfermidades sistêmicas; a terceira contempla o desfecho final da infecção, que pode ser a cura

completa, a morte do animal ou o desenvolvimento do estado de portador assintomático.

De acordo com Henderson, Bounous e Lee (1999), a interação inicial de *Salmonella* subsp. *enterica* com o hospedeiro influenciaria no curso do processo infeccioso. *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* não comprometem o trato gastrointestinal das aves como ocorre em infecções por salmonelas paratíficas; elas invadem o hospedeiro através do epitélio intestinal sem induzir elevada inflamação local (CHAPPELL et al., 2009). Em estudo *in vitro* utilizando células epiteliais de rins de galinha (“chick kidney cells” – CKC), Kaiser et al. (2000) demonstraram que *S. Gallinarum* suprimia a transcrição do RNA mensageiro (mRNA) codificador da IL1 $\beta$  e da IL6, sugerindo supressão da resposta pró-inflamatória no tecido epitelial. Esse mesmo padrão de resposta havia sido demonstrado por Henderson, Bounous e Lee (1999), que observaram a inabilidade de *S. Pullorum* em estimular resposta pró-inflamatória inicial local, caracterizada por baixa infiltração de heterófilos no tecido intestinal e desenvolvimento de lesões moderadas nesse tecido, além de pequeno número de micro-organismos internalizados nos enterócitos nos primeiros dois dias pós-infecção (dpi).

Estudo *in vivo* conduzido por Iqbal et al. (2005) revelou que estirpe mutante aflagelada de *S. Typhimurium* foi mais invasiva para pintinhas de um dia de vida e induzia menor expressão de citocinas pró-inflamatória nas tonsilas cecais nas primeiras 24 horas de infecção. A partir desse resultado, pressupôs-se que *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* passariam pelo epitélio intestinal sem desencadear reação inflamatória inicial. O flagelo bacteriano é reconhecido pelos TLR5, localizados nas superfícies basolaterais das células intestinais (GEWIRTZ et al., 2001) e sua falta nesses biotipos seria decorrente de uma vantagem adaptativa que permitiria a evasão do sistema imunológico na parede intestinal, favorecendo o desencadeamento de infecção sistêmica (CHAPPELL et al., 2009). Estudo recente publicado por Ramasamy, Verma e Reddy (2014) reforçou essa hipótese ao demonstrar que o nível de expressão do TLR5 no trato gastrointestinal de frangos não se alterou durante infecção experimental por *S. Pullorum*.

As aves desenvolvem respostas imunológicas distintas contra os agentes da pulorose e do tifo aviário (CHAPPELL et al., 2009). Na pulorose existe alta produção

de imunoglobulina G (IgG) responsiva aos antígenos de *S. Pullorum* desde a quinta semana pós-infecção (sepi), porém a bactéria não é completamente eliminada do organismo, persistindo no interior dos macrófagos do baço (WIGLEY et al., 2001). Esses autores também estimaram que em torno de 0.5% desses macrófagos ainda estariam infectados na 10<sup>a</sup> sepi e albergariam de uma a duas bactérias em vacúolos citoplasmáticos. Mais tarde, Wigley et al. (2005a) observaram em experimento independente do primeiro que por volta da 17<sup>a</sup> semana de vida, quando as aves convalescentes da pulorose iniciaram a postura, os linfócitos T presentes no baço deixavam de ser responsivos aos antígeno de *S. Pullorum*. Esse fenômeno denominado pelos autores de imunossupressão não específica da imunidade celular durou até a 22<sup>a</sup> semana de vida e coincidiu com o aumento de *S. Pullorum* no trato reprodutivo e nos ovos produzidos, apontando possível mecanismo permissivo de transmissão vertical na pulorose.

A resposta imunológica desencadeada contra o biotipo *Pullorum* é mediada por linfócitos T auxiliares do tipo 2 (“T-helper 2” – Th2) (CHAPPELL et al., 2009; TANG, 2016). O linfócito imaturo, denominado de Th0, é estimulado pela IL4 a se diferenciar em células Th2 (ABBAS et al., 2012). Em mamíferos, esses linfócitos secretam IL4, IL5 e IL13 e atuam diferenciando os linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE e ativando os macrófagos pela via alternativa (propriedades anti-inflamatórias), entre outras funções (ABBAS et al., 2012). A função dos linfócitos Th2 nas aves ainda está por ser elucidada, mas se sabe que essas não possuem eosinófilos funcionais, não produzem IgE e o gene codificante da IL5 é pseudogene (KAISER; STÄHELI, 2008). Setta et al. (2012a) observaram que no 4<sup>o</sup> dpi, a quantidade de linfócitos B em tonsilas cecais de aves de três semanas de vida infectadas por *S. Pullorum* era ligeiramente superior do naquelas das galinhas infectadas por *S. Gallinarum*, *S. Infantis* ou *S. Enteritidis*, embora tal diferença não tenha tido suporte estatístico. Ao infectar células HD11, que se assemelham aos macrófagos de aves, Setta et al. (2012b) demonstraram que *S. Pullorum* induziu a produção de óxido nítrico (“Nitrite oxide” – NO) e a transcrição de IL6 e CXCLi2, embora em menor quantidade do que o faz *S. Enteritidis*. Apesar disso, Setta et al. (2012a; 2012b) não observaram diferença significativa nos níveis de IL4 independente do sorotipo estudado ou do modelo aplicado.

Conjunto de experimentos conduzidos por Tang (2016) revelou que *S. Pullorum* seria capaz de induzir aumento discreto, porém significativo, de IL-4 e IL-13 nas tonsilas cecais e no baço de pintinhas infectadas aos dois dias de vida, ao passo que suprimia a expressão de IFN $\gamma$ , IL-12 $\alpha$  e IL18 em relação ao sorotipo Enteritidis. Além disso, houve menor proliferação de linfócitos T auxiliares (T CD4<sup>+</sup>) no baço dessas aves. Macrófagos primários infectados por *S. Pullorum* suprimiam a expressão das moléculas do MHC-II, das moléculas coestimulatórias CD40, CD80 e CD86 e levaram os linfócitos primários T CD4<sup>+</sup> cocultivados a suprimir a expressão do receptor CD28 (coestimulador de linfócito T) e a ativar a expressão do receptor CTLA-4 (coinibidor de linfócito T) (TANG, 2016). Juntos, esses dados indicam que *S. Pullorum* não suprime a resposta imune, mas leva ao desenvolvimento de resposta anti-inflamatória, mediada pela expressão de IL-4 e supressão de resposta imune celular mediada por macrófagos ativados por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (TANG, 2016).

O estudo *in vivo* da resposta imunológica desenvolvida contra *S. Gallinarum* é difícil devido à alta mortalidade causada por esse micro-organismo em aves suscetíveis. Wigley et al. (2005b) utilizaram SG9R em infecção de aves, pois essa é capaz de induzir moderada sintomatologia do tifo aviário, porém sem provocar mortalidade nos animais. A resposta imune humoral foi caracterizada pelo aumento de IgM com sete dpi e alto nível de IgG entre as terceira e quarta sepi. Após esse período, a quantidade de IgG decaiu até alcançar a homeostasia com seis sepi. A resposta imune celular, medida pela proliferação *in vitro* dos linfócitos T colhidos do baço, foi elevada entre as terceira e quarta semanas de vida, e coincidiu com o aumento do nível de IFN $\gamma$  no baço dos animais (WIGLEY et al., 2005b). Na segunda sepi, houve ligeiro, mas significativo, aumento na expressão de IL1 $\beta$ . Juntos, esses dados sugerem que o perfil de resposta imune adaptativa desencadeado contra o tifo aviário seria o Th1 (WIGLEY et al., 2005b). Nesse perfil da resposta imune adaptativa, o linfócito Th0 é diferenciado em Th1 principalmente por meio das IL12 e IL18 e se tornam secretores de IFN $\gamma$ , citocina pró-inflamatória que, dentre outras funções, ativa os macrófagos pela via clássica (fagócitos profissionais) levando a morte de organismos intracelulares (ABBAS et al., 2012).

Apesar da indução de resposta imune celular, como demonstrado por Wigley et al. (2005b), as lesões no tifo aviário são severas e a mortalidade é alta, indicando

que o hospedeiro não é capaz de se proteger contra a infecção. Em estudo recente, Lopes et al. (2016) abordaram o problema ao comparar a patogenia do tifo aviário provocado pela estirpe selvagem com a causada por estirpe geneticamente modificada capaz de produzir flagelos. A estirpe flagelada foi moderadamente atenuada para aves suscetíveis, pois induziu mortalidade reduzida e atraiu maior quantidade de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, no 6º dpi, para o fígado dos animais. A estirpe selvagem, por sua vez, recrutou maior proporção de linfócitos T citotóxicos (T CD8<sup>+</sup>) para o fígado de animais infectados já no 4º dpi. Diante desses resultados, Lopes et al. (2016) postularam que o aumento na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> poderia estar correlacionada com a agressividade do agente do tifo aviário em aves suscetíveis, onde as lesões foram severas e a mortalidade elevada.

#### 2.3.4. Genética dos biotipos Gallinarum e Pullorum: Evolução, restrição ao hospedeiro e patogenicidade

Pesquisas em filogenia, nas quais os polimorfismos em sequências de DNA e de proteínas entre isolados de diversos sorotipos foram comparados, apresentam evidências científicas sobre a origem evolutiva do sorotipo Gallinarum (biotipos Gallinarum e Pullorum). De acordo com Li et al. (1993), *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* teriam emergido de ancestral geneticamente semelhante a uma das linhagens de *S. Enteritidis* em processo de divergência que, mais tarde, Eswarappa et al. (2009) estimaram ter acontecido entre 28.000 e 42.000 anos atrás. Uma nova peça desse quebra-cabeça foi revelada por Langridge et al. (2015) ao demonstrarem que o último ancestral em comum (UAC) do sorotipo Gallinarum não teria relação filogenética com a linhagem clássica de *S. Enteritidis*, que está comumente envolvida em casos de enfermidade em seres humanos e animais, mas com linhagem denominada por esses autores de “second clade”, a qual compartilharia particularidades genéticas encontradas em *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, mas não em *S. Enteritidis* da linhagem clássica.

A análise conjunta dos resultados de eletroforese de isoenzimas (“Multilocus Enzyme Electrophoresis – MLEE”) e de polimorfismo nas sequências de nucleotídeos dos genes *fliC* (codifica a fase 1 da flagelina) e *gnd* (6-phosphogluconate dehydrogenase) indicou que o UAC do sorotipo Gallinarum teria dado origem primeiro ao biotipo Gallinarum, e que o biotipo Pullorum só teria emergido após seu ancestral ter sofrido acelerado processo evolutivo com acúmulo de mutações (LI et al., 1993). Modelo elucidativo desse evento foi proposto por esses mesmos autores; contudo, esse delineamento deve ser visto com cautela, pois desconsidera a possibilidade de recombinação ou transferência lateral de genes (TLG), que segundo Porwollik e McClelland (2003), seria a principal forma de evolução dos genomas de *Salmonella*. Por exemplo, Langridge et al. (2015) demonstraram por meio de genômica comparativa ter havido evento de TLG entre os biotipos Gallinarum e Pullorum responsável pela transferência de 180 Kb contendo 165 genes, entre eles quatro operons fimbriais (*saf*, *sti*, *stf*, and *stb*) e a SPI-6.

*S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são linhagens clonais e monofiléticas (LI et al., 1993; OLSEN et al., 1996). Os primeiros dados sobre a estrutura genômica desses micro-organismos foram gerados por meio de mapeamento cromossômico feitos por Wu et al. (2005) e Liu et al. (2002). Ao comparar esses dados com aqueles gerados em *S. Typhimurium*, Wu et al. (2005) relataram raros rearranjos gênicos nos biotipos Gallinarum e Pullorum que teriam reorganizado seus cromossomos entre os genes codificadores de RNA ribossomal (rRNA) 23S *rrnD* e *rrnE*. Esses autores acreditavam que rearranjo de tal proporção poderia estar relacionado à restrição de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* as aves. Além disso, Wu et al. (2005) foram capazes de mapear inserções e deleções (Indels), algumas delas biotipo-específicas, outras comuns a ambos os biotipos. Alguns meses depois, Porwollik et al. (2005) reforçaram esse achado ao relatarem a identificação de 19 deleções nos genomas de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em genes conservados entre os isolados testados de *S. Enteritidis* e *S. Dublin*.

A publicação dos genomas completos das estirpes 287/91 de *S. Gallinarum* (THOMSON et al., 2008) e RKS5078 / CDC1983-67 de *S. Pullorum* (FENG et al., 2012; FENG et al., 2013) permitiu a execução de estudos genômicos complexos e

de alta resolução. *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* possuem genomas com aproximadamente 4.6 mega pares de bases (Mb), conteúdo médio de guanina e citosina (C+G) de 52%, sete “operons” codificadores de rRNA, 75 RNAs transportadores (tRNA) e capacidade de codificar em torno de 4.000 proteínas (THOMSON et al., 2008; FENG et al., 2012; FENG et al., 2013). Além disso, esses micro-organismos possuem genomas similares e sintênicos a outros de *S. enterica* subsp. *enterica* (THOMSON et al., 2008; FENG et al., 2013; BATISTA et al., 2015).

Os genomas de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* apresentam alto grau de substituição de nucleotídeos e formação de indels resultando em elevado acúmulo de pseudogenes (THOMSON et al., 2008; FENG et al., 2013; BATISTA et al., 2015). Esses seriam produtos de mutações sem sentido que teriam gerado códons de parada no interior de sequência gênica ou por indels que ou alteraram o quadro de leitura do gene modificando a sequência do RNA mensageiro (mRNA), e conseqüentemente da proteína traduzida, ou alteraram fisicamente porção do gene levando a produção de proteína não funcional denominada de proteína truncada (THOMSON et al., 2008; BATISTA et al., 2015; LANGRIDGE et al., 2015).

*S. Pullorum* RKS5078 e CDC1983-67 albergam 263 e 240 pseudogenes em seus genomas, respectivamente (FENG et al., 2012; FENG et al., 2013), enquanto que *S. Gallinarum* 287/91 possui 309 (THOMSON et al., 2008). Para efeito de comparação, os sorotipos generalistas *S. Enteritidis* P125109 e *S. Typhimurium* LT2 contém 113 e 45 pseudogenes, respectivamente (MCCLELLAND et al., 2001; THOMSON et al., 2008). Langridge et al. (2015) notificaram a presença de 231 pseudogenes conservados entre oito isolados sequenciados de *S. Gallinarum* e 212 entre cinco isolados de *S. Pullorum*, porém somente 3 pseudogenes foram conservados entre as 32 estirpes de *S. Enteritidis* sequenciadas (LANGRIDGE et al., 2015).

O acúmulo de pseudogenes em genomas bacterianos, especialmente nos de *Salmonella* subsp. *enterica*, é frequentemente visto como mecanismo padrão de evolução associado à restrição ao hospedeiro (COLE et al., 2001; PARKHILL et al., 2001; PARKHILL et al., 2003; MCCLELLAND et al., 2004; THOMSON et al., 2008; HOLT et al., 2009; FENG et al., 2013). Dobrindt e Hacker (2001) e Lawrence e Hendrickson (2005) enfatizaram a tendência entre os patógenos intracelulares de

evoluírem por meio de redução da capacidade codificante do genoma, reconhecida pela inativação de genes (formação de pseudogenes) que, supostamente, não são essenciais à sobrevivência no nicho ocupado. Estima-se que *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* tenham perdido mais de 5% da sua capacidade de codificar proteínas funcionais (THOMSON et al., 2008; FENG et al., 2013). Tais proteínas pertencem a várias categorias funcionais, entre elas metabolismo, reduzindo o espectro de substratos que podem ser utilizados como fonte de carbono e energia, e virulência, supostamente adaptação ao ambiente sistêmico em vez do intestinal (THOMSON et al., 2008; BATISTA et al., 2015).

Os avanços nos estudos de genômica comparativa, no entanto, não foram ainda capazes de elucidar as razões pelas quais *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* causam doenças diferentes em aves que se infectam a partir da segunda semana de vida. Comparação feita entre os genomas de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* revelou que somente um pequeno número de sequências codificantes (“coding sequences” – CDS) seria biotipo específica e suas funções preditas não poderiam, por si só, gerar explicação plausível para as diferentes patogenidades dos biotipos *Gallinarum* e *Pullorum* (FENG et al., 2013; BATISTA et al., 2015). Esse achado sugere que a diferença na patobiologia dessas bactérias não seria, a princípio, consequência de conjunto gênico distinto, mas possivelmente na forma como esses patógenos regulam semelhante conjunto de genes de virulência durante o desenvolvimento do tifo aviário e da pulorose.

A análise comparativa conduzida por Batista et al. (2015) possibilitou a identificação de 40 CDS albergando mutações conservadas (indels) que tornariam o produto gênico putativamente ativo em somente um dos biotipos. Além disso, esses autores observaram que aquelas CDS ligadas ao metabolismo anaeróbio se apresentaram mais degradadas no biotipo *Pullorum*. Esses resultados sugerem a possibilidade de que sinais metabólicos sejam a chave da regulação diferencial dos genes de virulência durante o tifo aviário e a pulorose.

A relação entre metabolismo bacteriano e virulência já foi demonstrada para diversos micro-organismos. *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) expressam os genes contidos em ilha de patogenidade denominada “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE) segundo a disponibilidade de glicose no meio extracelular por

meio de um processo fortemente regulado pelas proteínas Cra e KdpE (NJORGE et al., 2012). Já Okon et al. (2017) demonstraram que a biossíntese defectiva de NAD por *Pseudomonas aeruginosa* levou a perda de “fitness” e a tornou atenuada em modelo de infecção da via respiratória inferior de camundongos. Ao estudar o efeito do metabolismo sobre a patogenicidade de *S. Typhimurium*, Bowden et al (2009) demonstraram que na incapacidade de captar glicose ou de metabolizá-la por meio da glicólise, a bactéria era atenuada a infecção de camundongos e incapaz de sobreviver abundantemente no interior dos macrófagos como o fez a estirpe selvagem.

Diante desses resultados, cria-se a hipótese no presente estudo de que os biotipos Gallinarum e Pullorum desencadeiam diferentes enfermidades, apesar das semelhanças fenotípicas e genéticas, por modularem diferentemente os seus genes de virulência de acordo com suas necessidades metabólicas e / ou suas habilidades de utilizar diferentes nutrientes durante a infecção.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito das deleções introduzida nas CDS dos genes *idnT*, *idnO* e *ccmH* sobre a patogenicidade de *S. Gallinarum* estirpe 287/91 (SG287/91) para aves susceptíveis.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- a) Construir estirpes mutantes de *S. Gallinarum* 287/91 (SG287/91) por meio de mutação sítio-dirigida com deleção nas sequências de nucleotídeos das CDS dos genes *idnT*, *idnO* e *ccmH*.
- b) Avaliar a habilidade dos clones mutantes de causar mortalidade em aves suscetíveis infectadas por via oral em comparação a SG287/91:
- c) Avaliar a habilidade dos clones mutantes de invadir o sistema de aves suscetíveis infectadas por via oral em comparação a SG287/91.
- d) Avaliar a resposta imune pró-inflamatória desencadeada pelos clones mutantes nas tonsilas cecais de aves suscetíveis infectadas por via oral nos primeiros dias de infecção e compará-la àquela desencadeada por SG287/91.
- e) Avaliar a resposta imune desencadeada pelos clones mutantes nos baços de aves suscetíveis infectadas por via oral e compará-la àquela desencadeada por SG287/91.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Informações gerais

Todas as etapas experimentais foram conduzidas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp), câmpus de Jaboticabal. A construção das estirpes mutantes foi aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) em 9 de Abril de 2015 (parecer técnico 4.429 / 2015). Os experimentos *in vivo* foram conduzidos nos infectórios anexos ao Laboratório de Ornitopatologia e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em 03 de Fevereiro de 2014 (processo 028358 / 13).

### 4.2. Estirpes utilizadas nesse estudo

As estirpes 287/91 de *S. Gallinarum* (SG287/91) e 449/87 de *S. Pullorum* (SP449/87) foram utilizadas como controles positivos de tifo aviário e pulorose, respectivamente. Ambos os isolados sofreram indução gradual *in vitro* para seleção de clones capazes de multiplicarem em meio de cultivo contendo 100 µg / mL de ácido nalidíxico (Safoni, BR - Wintomylon, comprimidos 500 mg). Esses clones foram escolhidos por possuírem genomas sequenciados e depositados no banco de dados do “GenBank” (SG287/91: AM933173.1 / SP449/87: NZ\_FJMV00000000.1) e patogenicidade definida em estudos prévios conduzidos no laboratório de Ornitopatologia dessa instituição (BERCHIERI JUNIOR et al., 2001; FREITAS NETO et al., 2013; LOPES et al., 2016). As estirpes mutantes foram construídas usando-se a constituição genética de SG287/91.

### 4.3. Construção das estirpes mutantes

#### 4.3.1. Informações sobre os genes alvo e comparações das sequências

As sequências cromossômicas foram visualizadas por meio do “software” Artemis versão 15.0.0 para Windows (CARVER et al., 2012). Setecentos e cinquenta e três pares de bases (pb), abrangendo a porção final da CDS do gene *idnO* e metade da CDS do gene *idnT*, foram excluídos do cromossomo de SG287/91. O segundo conjunto de deleções envolveu a exclusão de 568 pb do interior de ambas as CDS dos genes *ccmH*. Quando se fez necessário, sequências nucleotídicas foram alinhadas e comparadas por meio do “software” “CLC Sequence Viewer” versão 7.7 para Windows (CLC Bio). Detalhes adicionais sobre as mutações introduzidas em SG287/91 podem ser encontrados na Tabela 1.

Tabela 1. Detalhes sobre as deleções efetuadas no genoma de SG287/91.

| Nome do gene* | Posição da mutação** | Comprimento da deleção | Comentários   |
|---------------|----------------------|------------------------|---|
| <i>idnTO</i>  | 4539379..4540131     | 753 bp                 | Pequena deleção na extremidade 3' da CDS do gene <i>idnO</i> e grande deleção a partir da extremidade 5' da CDS do gene <i>idnT</i> . A região intergênica entre eles foi excluída no processo. |
| <i>ccmH-1</i> | 3811283..3811850     | 568 bp                 | Grande deleção no interior da CDS do gene <i>ccmH</i> . O gene <i>ccmH-2</i> está próximo ao “operon” <i>nap</i> enquanto que o gene <i>ccmH-1</i> está próximo do “operon” <i>tor</i> operon.  |
| <i>ccmH-2</i> | 2332418..2332985     | 568 bp                 |   |

\* *ccm*: “cytochrome c maturation”; *idn*: “L-idonate metabolism”;

\*\* As posições foram mapeadas no genoma de SG287/91 (GenBank: AM933173.1).

#### 4.3.2. Purificação dos plasmídios utilizados na mutagênese

Estirpes DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* contendo os plasmídios pKD46, pKD3, pKD4 e pCP20 estavam estocadas em “freezer” a -80 graus Celsius (°C) em meio crioprotetor composto de caldo de lisogenia (LB) (BD Difco™, EUA – código 240230) suplementado em 30% com glicerol (Merck, BR – H30402394 228). Com auxílio de alça bacteriológica estéril, a superfície congelada da cultura bacteriana foi gentilmente raspada e estriada sobre ágar de lisogenia (LA) (BD Difco™, EUA – código 240110), contendo antibiótico apropriado, a fim de obter colônias isoladas (Tabela 2). As placas foram levadas à incubadora (SOC. FABBE LTDA, BR) onde ficaram por 24 horas (h) a 28 °C. Após a incubação, uma colônia isolada foi suavemente tocada com alça bacteriológica estéril e inoculada em 10 mililitros (mL) de LB, contendo antibiótico apropriado. O meio líquido foi incubado a 28 °C por 16 h a 175 rotações por minuto (rpm) em estufa microbiológica automática (Cientec, BR – modelo CT-712).

Tabela 2. Antibióticos utilizados para clonagem dos plasmídios de mutagênese.

| <b>Plasmídio</b> | <b>Antibiótico</b> | <b>Concentração*</b> |
|------------------|--------------------|----------------------|
| pKD46            | Ampicilina         | 20 $\mu$ g / mL      |
| pKD3             | Cloranfenicol      | 20 $\mu$ g / mL      |
| pKD4             | Canamicina         | 20 $\mu$ g / mL      |
| pCP20            | Ampicilina         | 20 $\mu$ g / mL      |

\* Concentração utilizada para os meios de cultivo líquidos e sólidos nessa etapa.

No dia seguinte, 4,5 mL da cultura foram concentrados por centrifugação a 13.000 x g por 3 minutos (min) (Ultracentrífuga Sorvall® Legend Mach 1.6R) e o sedimento bacteriano resultante (*pellet*) submetido a cromatografia para purificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) plasmidial por meio do “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Qiagen, AL – código 27104) de acordo com as instruções do fabricante. A única modificação introduzida ao método descrito pelo fabricante foi na etapa de eluição: O DNA plasmidial foi eluído em 50  $\mu$ L de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA –

código W4502-1L) em vez de tampão EB. O material genético recuperado foi avaliado quando a qualidade (relações 260/280 e 260/230) e a quantidade (ng /  $\mu$ L) por espectrofotometria no DeNovix DS-11+ Spectrophotometer (DeNovix, EUA) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a).

#### 4.3.3. Inserção do plasmídio pKD46 em SG287/91

As estirpes mutantes foram construídas por meio da técnica denominada “Lambda-red”, desenvolvida por Datsenko e Wanner (2000). O plasmídio pKD46 foi inserido em SG287/91 por meio de eletroporação como se descreve. Uma colônia pura de SG287/91 sobre LA foi tocada com alça bacteriológica estéril e inoculada em 10 mL de LB, os quais foram incubados a 37 °C por 16 h sob agitação constante (175 rpm). Após incubação, 500  $\mu$ L dessa cultura foram transferidos para 20 mL de LB e a multiplicação bacteriana foi acompanhada por leitura em espectrofotômetro (Espectrofotômetro SP-22, Biospectro, BR) no comprimento de onda de 600 nanômetros (nm) até que esta atingisse absorvância (densidade óptica – DO) entre 0,5 e 0,8. A cultura foi então centrifugada a 1.100 x g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante descartado e o sedimento resuspendido em 20 mL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA). Esse procedimento foi repetido mais três vezes com a diferença que após a última centrifugação, o sedimento bacteriano foi resuspendido em 200  $\mu$ L de água ultrapura. A eletroporação foi conduzida em equipamento “Gene Pulser II Electroporation System” (Bio-Rad, EUA). Oitenta microlitros da cultura lavada foram misturados com 25  $\mu$ L de DNA plasmidial (pKD46) e tal mistura foi despejada no interior de cubetas de 2 mm (Bio-Rad, EUA – código #1652086). Os parâmetros utilizados no equipamento foram 2,5 kilovolts (kV) de voltagem, 25 microFarads ( $\mu$ F) de capacitância e 200 miliohms (m $\Omega$ ) de resistência. Após o disparo do pulso elétrico, a mistura no interior da cubeta foi aspirada por meio de pipetas Pasteur, inoculada em 1,5 mL de LB e incubada a 28 °C por 90 min a 150 rpm. Após a incubação, a cultura foi centrifugada a 1.100 x g por 3 min (Minicentrífuga MiniSpin<sup>®</sup>, Eppendorf, AL) e ressuspendida em 100  $\mu$ L de caldo LB.

Esse volume foi dividido em duas alíquotas, a saber 10 µL e 90 µL, as quais foram gotejadas sobre duas placas de LA contendo 100 µg / mL de ampicilina (EMS, BR – Ampicilina comprimidos 500 mg) e espalhadas por meio de alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 h antes da seleção dos supostos clones positivos.

#### 4.3.4. Teste de rugosidade

Os clones positivos foram semeados em LA e testados quanto à rugosidade. Trinta µL de tampão salino fosfatado (PBS, pH 7,4) foram gotejados sobre uma lâmina de microscopia e conjunto de colônias foi colhido do LA, por meio de alça bacteriológica estéril, e homogeneizado na gota de PBS. Então, 30 µL de acriflavina (Sigma-Aldrich, EUA – A-8126) diluída 1:500 foram adicionados a esta mistura e homogeneizados. Dentre os clones que não aglutinaram (lisos) um foi selecionado e estocado em “freezer” a -80 °C, como descrito no item 4.3.2. O PBS foi composto de 137 milimolar (mM) de cloreto de sódio (NaCl), 2,7 mM de cloreto de potássio (KCl), 10 mM de fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e 2 mM de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). O pH foi ajustado para 7,4 antes do tampão ser autoclavado a 121 °C sob 1 atmosfera (atm) de pressão por 15 minutos.

#### 4.3.5. Amplificação e purificação do fragmento de mutagênese

Pares de oligonucleotídeos iniciadores (iniciadores) híbridos, com tamanho molecular de 70 pb, foram construídos e utilizados na eliminação das sequências cromossômicas alvo (Tabela 3). Os últimos 20 pares de bases desses iniciadores (Tabela 3 – em negrito) foram utilizados para amplificar as sequências nucleotídicas nos plasmídios pKD3 e pKD4 (Figura 2), enquanto que os primeiros pares de bases

foram idênticos aos 50 pb que antecederam (iniciador direto) ou sucederam (iniciador reverso) a sequência cromossômica a ser alterada.

Tabela 3. Sequência dos iniciadores de mutagênese utilizados nesse estudo.

| <b>Identificação do iniciador</b> | <b>Sequência (5'→3')*</b>  |
|-----------------------------------|--|
| idnTO(50)-F                       | GTTTCTCTCGTCAAAAGCCTCCGACTTTGTTAACGGACATCTGCTGTTT <b>GT<br/>GTAGGCTGGAGCTGCTTC</b> |
| idnTO(50)-R                       | ATGGCCATCAGAATGACCGGGATCACGGCGGCAAAAATACTGTTCCAGAAC<br><b>ATATGAATATCCTCCTTAG</b>  |
| ccmH(50)-F                        | CGGGTGGATAATCGTTGCCCGCACGCGCCGGCGGGTGC GCCTGCGCCGG<br><b>GGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</b> |
| ccmH(50)-R                        | CGGATACTGCGCTCTATCACCGCCCGGGCGTACCCGCGGCAGCAG<br><b>TCATATGAATATCCTCCTTAG</b>      |

\* Sequências em negrito destacam os 20 pares de bases responsáveis pela amplificação da sequência codificante (CDS) do antibiótico nos respectivos plasmídios mais os sítios FRT.

O mutante *SGΔidnTO* foi construído utilizando-se os iniciadores idnTO(50)-F+R para amplificar a região entre os sítios FRT (“FLP recognition target”) do plasmídio pKD4 (Figura 2), o que inclui a CDS de resistência à canamicina. Os mutantes *SGΔccmH-1* e *SGΔccmH-2* foram construídos utilizando-se o mesmo par de iniciadores ccmH(50)-F+R, porém o primeiro foi construído a partir de amplificação de sequência alvo no plasmídio pKD3, que inclui sequência gênica cujo produto confere resistência ao cloranfenicol, e o último a partir de sequência alvo no plasmídio pKD4.

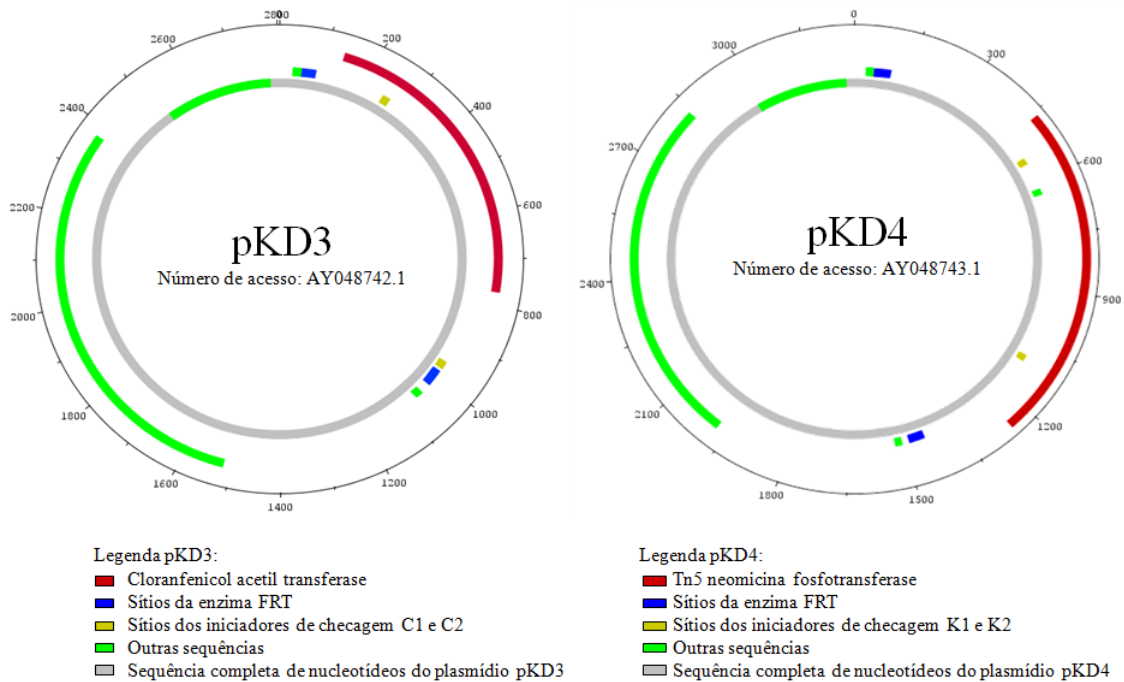


Figura 2. Esquema representativo dos plasmídios pKD3 e pKD4, os quais conferem resistência ao cloranfenicol e à canamicina, respectivamente. Os iniciadores de mutagênese amplificaram toda a região entre os dois retângulos azuis (sítios FRT). A sequência alvo dos iniciadores de mutagênese no plasmídeo pKD3 possui 1.014 pb, enquanto que a sua correspondente no plasmídeo pKD4 contém 1.477 pb. Em vermelho estão as CDS dos genes de resistência aos antibióticos e em amarelo os sítios de pareamento dos iniciadores padrão de checagem.

Preparou-se cinco Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) com volume final de 50  $\mu$ L cada. Cada reação consistiu de um volume (1x) de tampão de PCR contendo cloreto de potássio (KCl) (Invitrogen, EUA – código P/N y02028b), 200 micromolares ( $\mu$ M) de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP) (Invitrogen – EUA, código 10297-018), 1,5 mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) (Invitrogen – EUA), 200 nanomolares (nM) dos iniciadores direto e reverso (Sigma-Aldrich, EUA), 5 unidades universais (U) de Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas, LT), aproximadamente 0,02 nanogramas (ng) de DNA plasmidial (pKD3 ou pKD4) e volume de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA – código W4502-1L) para completar o volume final de 50  $\mu$ L. O equipamento de termociclagem (MyCycler – Bio-Rad,

EUA) foi configurado como se segue: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min seguida por 35 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 60 °C por 30 s e síntese a 72 °C por 90 s, mais síntese final a 72 °C por 5 min.

Os 250 µL de material amplificado foram juntados em microtubo de 1,5 mL e precipitados por meio do “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” (Fermentas, LT – código #K0513), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. O “amplicon” purificado foi ressuspenso em 10 µL de água ultrapura, os quais foram utilizados na mutagênese propriamente dita (item 4.3.6).

#### 4.3.6. Mutagênese propriamente dita

SG287/91 contendo o plasmídio pKD46 foi inoculada em 10 mL de LB ao qual 20 µg / mL de ampicilina foram previamente adicionados. O caldo foi incubado a 28 °C por 16 h sob agitação constante (175 rpm). No dia seguinte, 500 µL da cultura anterior foram transferidos para 20 mL de LB contendo 20 µg / mL de ampicilina e 5 mL de L-arabinose (Sigma-Aldrich, EUA) a 1 molar (M). Essa cultura foi incubada a 28 °C sob agitação constante (175 rpm). A multiplicação bacteriana foi monitorada por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm até atingir absorvância entre 0,5 e 0,8. Ao atingir a DO desejada, 5 mL de L-arabinose a 1 M (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados à cultura, e esta foi incubada por mais 20 minutos. A cultura foi então lavada em água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA) e levada para eletroporação como já descrito no item 4.3.3. Utilizou-se nessa etapa o DNA amplificado e precipitado descrito no item 4.3.5. A multiplicação e seleção das estirpes mutantes foram feitas em LA contendo cloranfenicol (Neo-Química, BR – Neo Fenicol comprimidos 500 mg) ou canamicina (Sigma-Aldrich, EUA – K4000-1G), na concentração de 20 µg / mL, após 24 h de incubação a 37 °C. Os clones sugestivos positivos foram novamente testados quanto à rugosidade como descrito no item 4.3.4.

#### 4.3.7. Confirmação da mutação por reação em cadeia da polimerase

##### 4.3.7.1. Extração do DNA cromossômico

Os clones objetos de teste foram cultivados em 10 mL de LB a 37 °C por 24 h sob agitação constante (150 rpm) e o DNA bacteriano foi extraído a partir dessa cultura segundo a metodologia descrita por Marmur (1961), com modificações. Um mililitro de LB cultivado foi aliquoteado em microtubo de dois mL e submetido à centrifugação por 3 min a 11.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi resuspenso em 700 µL de tampão de lise (Tabela 4) por meio de agitação mecânica em vórtex. O microtubo foi levado para termobloco (VHD, BR) e incubado a 65 °C por 1 h, tendo-se o cuidado de agitá-lo por inversão de duas a três vezes nesse período. Após a incubação, o microtubo foi deixado sobre a bancada por 20 min para que seu conteúdo atingisse a temperatura ambiente. Foi então que 350 µL de acetato de potássio (Synth, BR – A1012.01.A1) (5 M, pH 8,0) a 4 °C foram adicionados a mistura e esta foi agitada por inversão até que adquirisse aspecto de coágulo. O microtubo foi imerso em gelo por 30 min e seu conteúdo foi homogeneizado por inversão uma vez nesse período. Finalizada a incubação, 700 µL de solução composta por clorofórmio (Synth, BR – C1062.01.B3) e álcool isoamílico (Synth, BR – A1074.01.B3) (24:1), a 4 °C, foram acrescentados a mistura, a qual foi homogeneizada por inversão manual e contínua do microtubo por cinco minutos. O microtubo foi então submetido a centrifugação por 10 min a 9.650 x g em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a mistura se separou em três camadas e a fase superficial foi aspirada por pipetagem e transferida para novo microtubo estéril de 2 mL. Foi então que um mililitro de etanol absoluto (Synth, BR – 31380) a 4 °C foi adicionado a mistura, a qual foi agitada por inversão em torno de 10 vezes. O microtubo foi levado para “freezer” (-20 °C) onde permaneceu por um período entre duas e quatro horas. Passado esse período, o microtubo foi novamente agitado por inversão e submetido a centrifugação a 9.650 x g por 15 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 700 µL de etanol 70% (volume em

volume – v / v) foram adicionados. O microtubo foi imediatamente levado a minicentrífuga por 15 min a 9.650 x g. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o microtubo foi levado ao termobloco a 37 °C onde permaneceu por aproximadamente 30 min para secagem do sedimento e então 50 µL água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA) foram utilizados para resuspensão do DNA cromossômico purificado. Este foi avaliado quando a qualidade (relações 260/280 e 260/230) e a quantidade (ng / µL) por espectrofotometria no DeNovix DS-11+ Spectrophotometer (DeNovix, EUA) e gel de agarose a 1,5% (massa em volume – m / v) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a).

Tabela 4. Composição do tampão de lise utilizado na extração do DNA cromossômico neste experimento.

| <b>Reagente</b>   | <b>Concentração</b> | <b>Fabricante</b>                      |
|-------------------|---------------------|--|
| Tris-HCl (pH 8,0) | 100 mM              | Sigma-Aldrich, EUA – código T3253-250G |
| EDTA (pH 8,0)     | 50 mM               | Sigma-Aldrich, EUA – código E-5134     |
| NaCl              | 100 mM              | Sigma-Aldrich, EUA – código 59638-500G |
| SDS               | 0,5% (m / v)        | Sigma-Aldrich, EUA – código 436143-25G |

#### 4.3.7.2. PCR dos clones sugestivos positivos para confirmação da alteração genética

Os iniciadores para verificação das alterações genéticas introduzidas nesse estudo foram construídos por meio da plataforma *online* Primer-BLAST (YE et al., 2012) de modo a flanquearem as regiões geneticamente modificadas (Tabela 5). Além disso, os iniciadores construídos nesse estudo foram combinados aos “iniciadores internos” construídos por Datsenko e Wanner (2000) na PCR a fim de se amplificar parcialmente as CDS dos genes que conferem resistência ao cloranfenicol (C1 e C2) ou à canamicina (K1 e K2) (Tabela 5). A Figura 3 ilustra as reações de verificação e as suas combinações executadas nesse estudo.

Tabela 5. Sequência dos iniciadores utilizados nesse estudo para confirmação das mutações.

| <b>Identificação do iniciador</b> | <b>Sequência (5'→3')</b> |
|-----------------------------------|--------------------------|
| idnTOtest-F                       | ACGGAGATGACCAAAGCGCT     |
| idnTOtest-R                       | TATATTGGCCCACGCCGCTA     |
| ccmH(test1B)-R                    | ATCATACTGCACACGGGCTT     |
| ccmH(test1B)-F                    | GTACTIONATGAGGCGGAGGTGC  |
| ccmH(test2B)-F                    | ATAGCGATCCGGAAGTGCTG     |
| ccmH(test2B)-R                    | CTACGGCAACTTCGTACCT      |
| K1                                | CAGTCATAGCCGAATAGCCT     |
| K2                                | CGGTGCCCTGAATGAACTGC     |
| C1                                | TTATACGCAAGGCGACAAGG     |
| C2                                | GATCTTCCGTACAGGTAGG      |

A reação de PCR para verificação dos clones *SGΔidnTO* constituiu-se das seguintes substâncias: 1x de tampão de PCR contendo KCl, 160 μM de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 800 nM dos iniciadores direto e reverso (Sigma-Aldrich, EUA), 1,25 U de Taq DNA polimerase recombinante, aproximadamente 20 ng de DNA cromossômico e volume de água ultrapura para completar o volume final de 25 μL. Os microtubos foram levados para aparelho termociclador (MyCycler – Bio-Rad, EUA) o qual foi configurado como se segue: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min seguida por 35 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 65 °C por 30 s e síntese a 72 °C por 2 min, mais síntese final a 72 °C por 5 min. A reação finalizada foi mantida a 4 °C até corrida em gel de agarose.

A confirmação dos clones *SGΔccmH* foi feita em reação composta por 1x de tampão GC contendo cloreto de magnésio (New England Biolabs Inc, EUA - M0530S), 200 μM de dNTP, 1 μM dos iniciadores direto e reverso (Sigma-Aldrich, EUA), 1 U de Phusion DNA polimerase (New England Biolabs Inc, EUA - M0530S), aproximadamente 20 ng de DNA cromossomal e volume de água ultrapura para completar o volume final de 20 μL. O termociclador foi configurado segundo os parâmetros recomendados pelo fabricante da Phusion DNA polimerase (BioEngland Lab., RU) como se descreve: desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, seguidos por 35 ciclos compostos por temperaturas de desnaturação a 98 °C por 10 s, pareamento a 59 °C por 10 s e síntese a 72 °C por 90 s. Terminada a ciclagem, as amostras

passaram pela etapa de síntese final a 72 °C / 7 min e foram mantidas a 4 °C até serem retiradas para eletroforese.

Tabela 6. Combinação de iniciadores utilizados na PCR de verificação e tamanho molecular (pb) dos fragmentos esperados.

| Combinação de iniciadores | SG 287/91 | SG $\Delta$ <i>idnTO</i> com a CDS do antibiótico | SG $\Delta$ <i>idnTO</i> sem a CDS do antibiótico | SG $\Delta$ <i>ccmH</i> com a CDS do antibiótico | SG $\Delta$ <i>ccmH</i> sem a CDS do antibiótico |
|---------------------------|-----------|---|---|--|--|
| idnTOtest-F+R             | 1.223     | 1.947   | 470   | –  | –  |
| idnTOtest-F+K1            | –         | 659   | –   | –  | –  |
| idnTOtest-R+K2            | –         | 1.198   | –   | –  | –  |
| ccmH(test1B)-F+R          | 1.525     | –   | –   | 1.970  | 957  |
| ccmH(test1B)-F+C1         | –         | –   | –   | 1.011  | –  |
| ccmH(test1B)-R+C2         | –         | –   | –   | 251  | –  |
| ccmH(test2B)-F+R          | 1.147     | –   | –   | 2.055  | 579  |
| ccmH(test2B)-R+K1         | –         | –   | –   | 645  | –  |
| ccmH(test2B)-F+K2         | –         | –   | –   | 1.321  | –  |

Iniciadores K1 e K2: pareamento no interior da CDS amplificada a partir do pKD4 (canamicina); iniciadores C1 e C2: pareamento no interior da CDS amplificada a partir do pKD3 (cloranfenicol); ccmH(test1B): verificação da mutação na CDS do gene *ccmH* próximo ao “operon” *tor*; ccmH(test2B): verificação da mutação na CDS do gene *ccmH* próximo ao “operon” *nap*.

Os parâmetros da PCR que combinavam os iniciadores de verificação com os internos das CDS dos antibióticos diferiram apenas na temperatura de pareamento que foi de 58 °C tanto para os clones SG $\Delta$ *idnTO* quanto para os SG $\Delta$ *ccmH*. Todas as temperaturas de pareamento utilizadas foram definidas através de gradiente de temperatura. O tamanho molecular dos fragmentos esperados encontra-se disponíveis na Tabela 6.

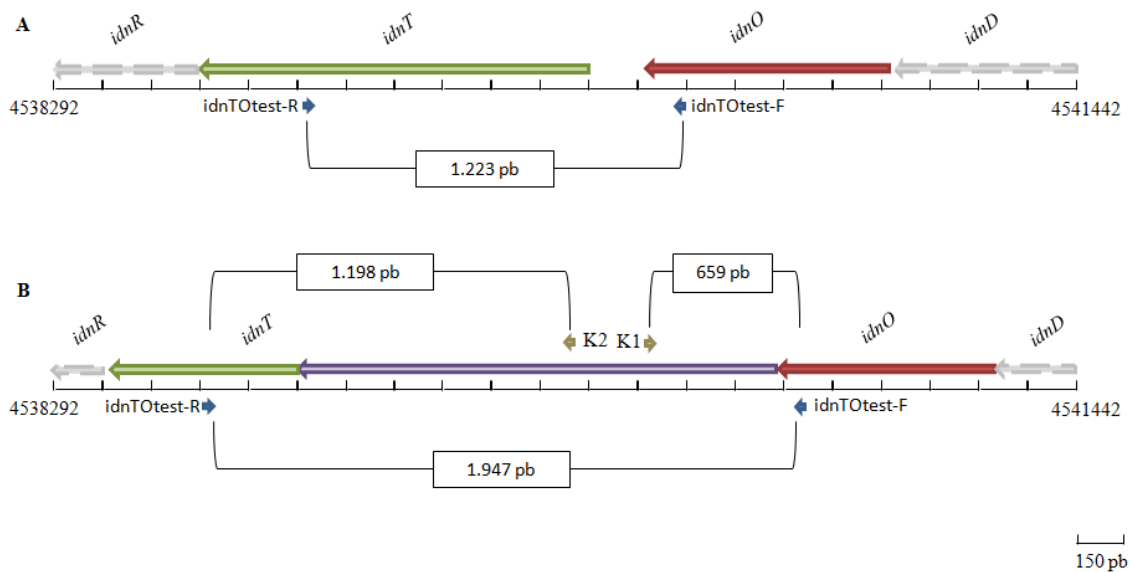


Figura 3. Esquema ilustrativo das amplificações e suas combinações executadas nesse estudo. A Figura 3A demonstra a posição natural das CDS dos genes *idnTO* mapeadas no genomas de SG287/91 (AM933173.1). O produto amplificado na estirpe selvagem possui 1.223 pb. A Figura 3B ilustra a inserção do fragmento de mutagênese no cromossomo de SG287/91 (seta roxa) por meio do método do “Lambda-Red” (DATSENKO; WANNER, 2000). Esse fragmento contém os sítios FRT e o gene codificador de resistência a antibiótico. A combinação dos iniciadores de verificação com aqueles padronizados para o interior do gene codificador de resistência à canamicina (K1 e K2) geram “amplicons” extras que asseguram a correta inserção do fragmento de mutagênese. A direção da seta indica o sentido de transcrição do gene. Seta verde: CDS do gene *idnT*; Seta vermelha: CDS do gene *idnO*; Seta roxa: Sítios FRT + CDS de resistência à canamicina; Setas cinzas: CDS dos genes que flanqueiam os genes *idnTO*; Setas curtas azuis: Representam os iniciadores de verificação; Setas curtas amarelas: Representam os iniciadores internos padronizados por Datsenko e Wanner (2000), denominados de K1 e K2.

#### 4.3.7.3. Visibilização dos produtos amplificados

Os produtos da amplificação por PCR foram visibilizados em gel de agarose a 1,5% (m / v). Cinco microlitros de cada amostra foram misturados a dois  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento (Fermentas, LT) e um  $\mu\text{L}$  de GelRed (Biotium, RU); esse, corante fluorescente de DNA preparado na diluição de 1:500. Essa mistura foi aplicada nos poços do gel de agarose e submetida à eletroforese a 4 V / cm por 1 h. As imagens foram digitalizadas em fotodocumentador Gel Doc EZ System (Bio-Rad, EUA) e editadas e analisadas no programa Image Lab versão 4.0.1.

#### 4.3.8. Transdução das estirpes mutantes

O procedimento aqui descrito foi aplicado para cada estirpe mutante estudada. Uma colônia da estirpe mutante, denominada nessa etapa de doadora, foi inoculada em 10 mL de LB, o qual foi incubado a 37 °C por 16 h sem agitação (dia 0). Após a incubação (dia 1), a cultura bacteriana foi submetida à contagem em ágar verde brilhante (VB) (Oxoid, RU – código CM0263) pelo método de diluição seriada, a qual consistiu em diluir um volume da solução alvo em nove volumes de tampão PBS. Seis diluições foram praticadas para o micro-organismo doador e 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram gotejados sobre VB. Em paralelo, 100  $\mu\text{L}$  de cada cultura bacteriana foram diluídos em 900  $\mu\text{L}$  de PBS. Essa solução foi homogeneizada e espalhada sobre o ágar LA para subsequente contagem do  $\Phi$  P22. Dez diluições foram efetuadas para a contagem do bacteriófago e 50  $\mu\text{L}$  de cada diluição gotejados sobre LA. As placas contendo VB (bactéria) e LA ( $\Phi$  P22) foram deixadas sobre a bancada até secagem completa quando foram então incubadas a 37 °C por aproximadamente 20 h e 8 h, respectivamente. A cultura bacteriana foi estocada a 4 °C até ser utilizada. Ao fim do dia 1, o número de unidades formadoras de placa por mL (UFP / mL) foi estimado para o  $\Phi$  P22 e a cultura bacteriana estocada foi

subcultivada adicionando-se volume em LB estéril correspondente a 1% do volume total (p.e. 100  $\mu$ L em 10 mL).

Na manhã do dia 2 estimou-se o número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC / mL) da cultura de bactéria doadora incubada no dia anterior (dia 1). A cultura fresca subcultivada foi estocada a 4 °C, onde permaneceu até o final do dia, quando o procedimento prosseguiu como se descreve: o  $\Phi$  P22 foi adicionado à cultura bacteriana na proporção de 0,03 de  $\Phi$  P22 por UFC. Essa cultura mista foi incubada a 37 °C por 16 horas em agitação (150 rpm). Em paralelo, uma colônia de SG287/91, essa denominada de bactéria receptora nessa etapa, foi inoculada em 10 mL de caldo LB e incubada a 37 °C por 16 h sob agitação constante (150 rpm).

No dia seguinte (dia 3), a cultura contendo a estirpe doadora infectada pelo  $\Phi$  P22 foi centrifugada a 1.100 x g por 20 min a 4°C (Ultracentrífuga Sorvall® Legend Mach 1.6R). Com o auxílio de seringa descartável de 10 mL (Becton, Dickinson e Companhia, BR) acoplada a filtro de 0,45  $\mu$ m (Macherey-Nagel, AL – código 729241), o sobrenadante foi recuperado e estocado a 4°C. O  $\Phi$  P22 recém-obtido da estirpe doadora ( $\Phi$  P22') foi submetido à contagem como descrito acima, porém utilizando-se diluição 1:10 da estirpe receptora (SG287/91) para “forrar” a placa. Paralelamente, a estirpe receptora foi contada em VB. O restante desta cultura foi mantido a 4 °C até o momento do subcultivo, que ocorreu ao final do dia 3. No dia seguinte (dia 4), foram obtidas as UFC / mL de SG287/91 e UFP / mL do  $\Phi$  P22'. A cultura fresca de SG287/91 foi retirada da incubadora e imediatamente concentrada 10x, por centrifugação a 1.100 x g por 20 min a 4°C, e resuspendida em 1 mL de LB. Conhecendo-se ambas as contagens, adicionou-se 0,8 de  $\Phi$  P22' por UFC de SG287/91 na cultura concentrada, a qual foi em seguida incubada a 37 °C por 30 min sem agitação. Três placas de ágar LA, contendo antibiótico apropriado (canamicina ou cloranfenicol a 20  $\mu$ g / mL), receberam 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L e 700  $\mu$ L da cultura, espalhados sobre o ágar por meio de alça de Drigasliki. Essas placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

No dia seguinte (dia 5), procedeu-se a seleção das colônias sugestivas positivas. Os clones escolhidos foram semeados sucessivamente de quatro a seis vezes em ágar LA para que se livrassem da infecção pelo  $\Phi$  P22'. Os clones puros foram verificados quanto à rugosidade e quanto à presença do gene mutante por

PCR (como descrito nos itens 4.3.4 e 4.3.7). Esse mesmo procedimento foi utilizado para transferir a mutação da estirpe *SGΔccmH-2* (doadora) para a estirpe *SGΔccmH-1* (receptora) gerando a estirpe *SGΔccmH* completa e da estirpe *SGΔidnTO* (doadora) para a estirpe *SGΔccmH* gerando o mutante duplo. Os clones positivos foram estocados em “freezer” a -80 °C em meio cuja composição foi descrita no item 4.3.2. O número de UFP / mL ou UFC / mL foi calculado segundo a fórmula abaixo:

$$\text{UFC (UFP)}/\text{mL} = \frac{\text{número de colônias (placas)} \times \text{fator de diluição}}{\text{diluição em que se contou as colônias (placas)}}$$

Onde o fator de diluição é igual a 1.000 (um mL) dividido pelo volume gotejado sobre o ágar, nesse estudo, 0,1 mL para a cultura bacteriana e 0,05 mL para o bacteriófago.

#### 4.3.9. Eliminação do marcador de resistência do cromossomo bacteriano

A retirada das CDS de resistência aos antibióticos foi feita com o auxílio do plasmídeo termossensível pCP20. O procedimento de eletroporação foi o mesmo descrito no item 4.3.3. Aproximadamente cinco clones lisos de cada mutante foram selecionados, inoculados em 10 mL de LB e incubados a 40 °C por 24 h sob constante agitação (175 rpm). Após a incubação, cada clone foi semeado por esgotamento sobre quatro placas de LA com as seguintes características: uma livre de antibióticos, uma contendo 100 µg / mL de ampicilina, uma contendo 20 µg / mL de cloranfenicol e uma contendo 20 µg / mL de canamicina. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e então uma colônia foi selecionada do LA sem antibiótico e inoculada em 10 mL de LB, o qual foi novamente incubado a 40 °C por 24 h sob constante agitação (175 rpm). O clone foi considerado pronto para os experimentos subsequentes somente quando esse só era capaz de se multiplicar em LA livre de antibióticos. As mutantes finais foram novamente verificadas por PCR

(4.3.7) e quanto a rugosidade (4.3.4). Os clones positivos foram estocados em “freezer” a -80 °C como descrito no item 4.3.3 até o momento do uso.

#### 4.4. Curvas de multiplicação bacteriana

SG287/91, *SG $\Delta$ idnTO*, *SG $\Delta$ ccmH* e *SG $\Delta$ ccmHidnTO* foram analisadas nesse experimento. As bactérias foram cultivadas em LB a partir de colônias isoladas retiradas da superfície do LA. Três colônias isoladas de cada clone foram separadamente inoculadas em 10 mL de LB os quais foram incubados a 37°C por 16 horas. As culturas foram lavadas por meio de centrifugação a 1.100 x g por cinco minutos por três vezes. Ao final de cada centrifugação, os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em PBS estéril com exceção da última ressuspensão que foi feita em um mL de meio mínimo M9 (1x) cuja composição está detalhada na Tabela 7.

Tabela 7. Composição do meio mínimo M9 utilizado nesse estudo.

| Reagentes para compor solução 5x*   | Concentração |
|---|--------------|
| Fosfato de sódio heptahidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) | 42,0 mM      |
| Fosfato de potássio dibásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                       | 22,0 mM      |
| Cloreto de sódio (NaCl)   | 8,5 mM       |
| Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl)  | 18,6 mM      |
| Sulfato de Magnésio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)             | 2,0 mM       |
| Cloreto de Cálcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)                  | 0,1 mM       |
| Ácido glucônico (Gluconato)   | 0,5%         |

\* A composição do meio mínimo foi obtida de Sambrook e Russel (2001b). O meio de cultura foi preparado conforme recomendação do “website Cold Spring Harbor Protocols (M9 recipe)” ([dx.doi.org/10.1101/pdb.rec8146](https://doi.org/10.1101/pdb.rec8146)).

As densidades ópticas (DO) foram aferidas no comprimento de onda de 595 nm, em espectrofotômetro (iMark Microplate Absorbance Reader, BioRad, EUA)

para leitura de microplacas e os valores obtidos utilizados para reajustar cada cultura para uma DO inicial próxima a 0.05 segundo a fórmula:

$$\text{Volume da cultura inicial} = \frac{\text{Valor da DO desejada} \times \text{Volume final da cultura}}{\text{Valor da DO da cultura inicial}}$$

Os volumes calculados foram adicionados a 20 mL de meio mínimo M9 (1x), os quais foram incubados a 37 °C sob agitação constante (175 rpm), em aerobiose. As DO foram aferidas a cada hora, começando logo após a inoculação dos microorganismos (tempo 0) e o experimento foi considerado finalizado quando as culturas atingiram a fase estacionária de multiplicação.

#### 4.5. Ensaio *in vivo*

##### 4.5.1. Experimento 1: Patogenicidade e virulência

Para esse estudo, 75 pintinhas semipesada de linhagem comercial de postura, com um dia de vida, suscetíveis ao tifo aviário e a pulorose, foram doadas por incubatório comercial. Na chegada foi feito suabe de caixa para excluir a possibilidade de infecção por *Salmonella* spp. Gazes estéreis foram friccionadas sobre o assoalho das caixas de transporte e inoculadas em 100 mL caldo selenito (Oxoid, RU – código CM0395) contendo 4 µg / mL de novobiocina (Merial, FR – lote 8041706). Essa cultura foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, o caldo cultivado foi homogeneizado, tocado com alça bacteriológica estéril e semeado sobre os meios sólidos McConkey (Oxoid, RU – código CM0115) e VB. As placas foram levadas a estufa onde permaneceram a 37 °C por 24 horas, antes de se avaliar as características das colônias obtidas.

Os animais foram criados de acordo com o manual da linhagem (Manual de Manejo para poedeiras comerciais de 2014). Esses permaneceram em sala limpa aclimatizada até o 20º dia de vida e receberam água e ração balanceada sem restrição e sem adição de promotores de crescimento ou anticoccidianos. No 21º dia

de vida, as aves foram transferidas para os infectórios, onde a temperatura também era controlada por meio de condicionadores de ar, e divididas em cinco grupos de quinze da seguinte forma: Grupo A, controle positivo de pulorose (SP449/87); grupo B, controle positivo de tifo aviário (SG287/91); grupo C, infecção por *SGΔccmH*; grupo D, infecção por *SGΔidnTOccmH* e grupo E, infecção por *SGΔidnTO*.

Dois dias antes da infecção (2 dai), preparou-se os pré-inóculos pela inoculação de uma colônia de bactéria em 10 mL de LB. Esse foi incubado a 37 °C por 24 horas sob agitação constante (150 rpm). No dia que precedeu a infecção (1 dai), estimou-se em cada cultura o número de UFC / mL pelo método de diluição seriada (Tabela 8) como descrito no item 4.3.8. As culturas foram vedadas com parafilme e mantidas a 4 °C até o fim do dia, quando foram utilizadas para preparação do inóculo. Duzentos µL da cultura do pré-inóculo foram inoculados 20 mL de LB estéril, o qual foi incubado a 37 °C por 16 horas sob agitação constante (150 rpm). Um mL do inóculo foi separado para contagem bacteriana e o restante foi levado para os infectórios, dentro de caixa de isopor contendo gelo. As pintainhas foram então infectadas no 21º dia de vida, por via oral, com um mililitro de cultura, diretamente no papo, por meio de cânula metálica polida estéril. A quantidade de UFC introduzida no sistema das pintainhas, para cada grupo de infecção, está disponível na Tabela 8. Ao longo do experimento, os animais foram observados diariamente quanto ao aparecimento de sinais clínicos de tifo aviário ou pulorose e quanto à mortalidade.

Os micro-organismos infectantes foram recuperados dos órgãos dos animais necropsiados como se descreve. Imediatamente após abrir a cavidade celomática das aves, e avaliar o estado geral dos órgãos expostos, um suabe foi introduzido no parênquima hepático e outro no parênquima esplênico. Esses suabes foram imersos em tubos de ensaio de vidro contendo 3 mL de caldo selenito mais 4 µg / mL de novobiocina. Esses foram homogeneizados e incubados a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, o conteúdo cultivado dos tubos foi novamente homogeneizado e, por meio de alça bacteriológica estéril, tocado e semeado sobre VB contendo 100 µg / mL de ácido nalidíxico (VB Nal). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias foram avaliadas quanto sua morfologia e uma delas foi testada por PCR

utilizando-se os iniciadores de verificação (itens 4.3.7.2 e 4.3.7.3) a fim de garantir que se tratava do clone inoculado.

Tabela 8. Contagem de micro-organismos viáveis obtidos por diluição seriada da cultura (experimento 1).

| <b>Micro-organismo (Grupo)</b>         | <b>Pré-inóculo (UFC / mL)</b> | <b>Inóculo (UFC / mL)*</b> |
|--|-------------------------------|----------------------------|
| SP 449/87 (Grupo A)                    | $6,2 \times 10^8$             | $8,9 \times 10^8$          |
| SG 287/91 (Grupo B)                    | $5,1 \times 10^8$             | $7,5 \times 10^8$          |
| SG $\Delta$ <i>ccmH</i> (Grupo C)      | $7,3 \times 10^8$             | $8,3 \times 10^8$          |
| SG $\Delta$ <i>idnTOccmH</i> (Grupo D) | $5,5 \times 10^8$             | $6,5 \times 10^8$          |
| SG $\Delta$ <i>idnTO</i> (Grupo E)     | $6,0 \times 10^8$             | $9,3 \times 10^8$          |

\* Uma vez que 1 mL de cultura foi administrado, por via oral, para cada ave, o valor da contagem do inóculo representa também a quantidade de UFCs inoculada.

#### 4.5.2. Experimento 2: Contagem bacteriana em órgãos e colheita de tecidos para RT-qPCR

Para esse estudo, os animais foram adquiridos e criados sob as mesmas condições descritas no item 4.4.1, e os inóculos preparados também como já descrito, portanto somente informações essenciais serão acrescentadas. Noventa pintinhas semipesada de linhagem comercial de postura com um dia de vida, suscetíveis ao tifo aviário e a pulorose, foram doadas por incubatório comercial e testadas, na chegada, para descartar possível pré-infecção por *Salmonella* spp. Os animais foram criados em sala limpa climatizada, recebendo água e ração *ad libitum* até o 14º dia de vida. No 15º dia de vida, 75 aves foram transferidas para o infectório e divididas em cinco grupos de quinze da seguinte forma: Grupo A, controle positivo de pulorose (SP449/87); grupo B, controle positivo de tifo aviário (SG287/91); grupo C, infecção por SG $\Delta$ *ccmH*; grupo D, infecção por SG $\Delta$ *idnTOccmH* e grupo E, infecção por SG $\Delta$ *idnTO*. O sexto grupo, denominado de grupo F, foi composto por 15 aves não infectadas que foram mantidas na sala inicial limpa e aclimatizada como controle negativo.

No 15º dia de vida, 1 mL de cultura foi administrado individualmente no papo dos animais, por meio de cânula metálica polida estéril. A quantidade de UFC introduzida no sistema das pintainhas, para cada grupo de infecção, está disponível na Tabela 9. Os animais do controle negativo (grupo F) foram inoculados por via oral com 1 mL de caldo LB estéril. Nos 1º, 3º e 5º dpi, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados, por deslocamento cervical, para colheita de fragmento de fígado e baço, de onde se estimou a quantidade de UFC por grama (g) de tecido por meio do método de diluição seriada na base 10. Os tubos foram pesados antes das necrópsias e depois de conter os órgãos colhidos, de modo que foi possível calcular a quantidade de PBS a ser adicionado para se obter a primeira diluição da série (m / v). O órgão foi macerado por meio de pistilos para tubos de 2 mL, homogeneizado e serialmente diluído até a diluição  $10^{-4}$  (v / v). Cem  $\mu$ L de cada diluição foram gotejados sobre VB contendo 100  $\mu$ g / mL de ácido nalidíxico (VB Nal), o qual foi incubado a 37 °C por 24 horas. Imediatamente após a contagem na placa, adicionou-se 500  $\mu$ L de caldo selenito concentrado (2x) naqueles microtubos que continham a primeira diluição (amostra macerada), e estes foram também incubados a 37 °C por 24 h. As amostras que não apresentaram UFC em VB Nal após incubação foram semeadas sobre novo VB Nal estéril, pelo método de esgotamento, a partir das amostras enriquecidas, e novamente incubadas a 37 °C por 24 h. Àquelas positivas após o enriquecimento, atribuiu-se o valor de  $10^2$  UCF / g de tecido para os cálculos estatísticos.

Tabela 9. Contagem de micro-organismos viáveis obtidos por diluição seriada da cultura no experimento 2.

| <b>Micro-organismo (Grupo)</b>         | <b>Pré-inóculo (UFC / mL)</b> | <b>Inóculo (UFC / mL)*</b> |
|--|-------------------------------|----------------------------|
| SP 449/87 (Grupo A)                    | $8,9 \times 10^8$             | $8,8 \times 10^8$          |
| SG 287/91 (Grupo B)                    | $1,27 \times 10^9$            | $8,7 \times 10^8$          |
| SG $\Delta$ <i>ccmH</i> (Grupo C)      | $6,3 \times 10^8$             | $8,7 \times 10^8$          |
| SG $\Delta$ <i>idnTOccmH</i> (Grupo D) | $7,9 \times 10^8$             | $1,06 \times 10^9$         |
| SG $\Delta$ <i>idnTO</i> (Grupo E)     | $7,4 \times 10^8$             | $9,8 \times 10^8$          |

\* Uma vez que 1 mL de cultura foi administrado, por via oral, para cada ave, o valor da contagem do inóculo representa também a quantidade de UFCs inoculada.

Além de material para estimativa do número de micro-organismos viáveis em órgãos, colheu-se fragmentos de tonsila cecal (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> dpi) e de baço (3<sup>o</sup> e 5 dpi), de três das cinco pintinhas sacrificadas de cada grupo, para avaliação da expressão de genes. Os fragmentos foram postos em criotubos identificados, os quais foram rapidamente imergidos em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em “freezer” a -80°C até o momento da extração do material genético. No total foram colhidos 72 fragmentos de tecido, sendo 36 de tonsila cecal e 36 de baço.

#### 4.6. Expressão relativa de genes por RT-qPCR

##### 4.6.1. Purificação de RNA total e transformação em cDNA

Todo material utilizado na purificação do RNA total, bem como a estação de trabalho (bancada), foram previamente tratados contra as enzimas que degradam RNA (RNAses). As vidrarias foram queimadas em forno a 200 °C por 4 h e o material plástico tratado com solução 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH) (Synth, BR – código 36420) + 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, EUA – código E-5134). A água foi purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Merck MilliPore, EUA), adicionada de 0,1% de dicarbonato de dietila (DPEC), homogeneizada, incubada em temperatura ambiente por 16 h e autoclavada a 121°C sob 1 atm por 20 minutos antes de ser utilizada. As ponteiras e os microtubos foram adquiridos livres de DNAses e RNAses. A todo o momento foram utilizadas luvas sem talco, tendo-se o cuidado de trocá-las frequentemente durante o procedimento.

Três amostras de tonsila cecal ou baço, por vez, foram submetidas à purificação de RNA total por meio do RNeasyMini Kit (Qiagen, AL – catálogo 74106) segundo as instruções do fabricante. O material genético recém-purificado foi quantificado em equipamento DeNovix (DeNovix, EUA) e qualificado observando-se as relações 260/280 e 260/230 (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). Amostras que não

tiveram valor em torno de 2 foram repurificadas. O RNA total foi mantido em “freezer” a -80 °C até o uso.

A partir do RNA total, sintetizou-se as moléculas de DNA complementares (cDNA) aos mRNA por meio do “QuantiTect® Reverse Transcription kit” (Qiagen, AL – código 205311). Os RNAs totais foram diluídos até atingirem concentração de 300 ng / µL e dois microlitros (600 ng) de RNA total utilizados para obtenção dos cDNAs segundo as instruções do fabricante. Ao final da transformação, o material foi novamente avaliado quanto a sua qualidade por espectrofotometria (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a).

#### 4.6.2. Seleção dos genes de referência

Quatro genes de referência, com sequência de nucleotídeos definidas e disponíveis na literatura científica, foram testados nas amostras desse estudo, sendo eles codificadores das enzimas hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HPRT) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), da proteína de estrutura celular Beta-actina ( $\beta$ -actin) e da subunidade 28S do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA 28S). As informações relevantes sobre os iniciadores utilizados se encontram na Tabela 10.

Tabela 10. Genes de referência testados e suas informações relevantes.

| <b>Gene</b> | <b>Sequência (5'-&gt;3')</b> | <b>“Amplicon” (pb)</b> | <b>Referência</b>       |
|-------------|------------------------------|------------------------|-------------------------|
| GAPDH       | F: GGCACGCCATCACTATC         | 61                     | De Boever et al. (2008) |
|             | R: CCTGCATCTGCCCATTT         |                        |                         |
| HPRT        | F: CCCAAACATTATGCAGACGA      | 66                     | De Boever et al. (2008) |
|             | R: TGTCCTGTCCATGATGAGC       |                        |                         |
| B-actin     | F: CACAGATCATGTTTGAGACCTT    | 101                    | De Boever et al. (2008) |
|             | R: CATCACAATACCAGTGGTACG     |                        |                         |
| rRNA 28S    | F: GGCGAAGCCAGAGGAAACT       | 62                     | Setta et al. (2012a)    |
|             | R: GACGACCGATTTGCACGTC       |                        |                         |

Doze amostras representativas dos grupos experimentais, dos tecidos alvos e dos dias de colheita foram aleatoriamente escolhidas e testadas a fim de permitir seleção dos dois genes de referência mais concisos como normalizadores para este estudo. A RT-qPCR foi executada utilizando-se 600 nM de oligonucleotídeo iniciador (Sigma-Aldrich, EUA ou Invitrogen Corp, EUA), 6,25 µL do “Master Mix” SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich, EUA), o qual continha dNTPs e MgCl<sub>2</sub> em concentrações otimizadas, 50 ng de cDNA e água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA) para completar o volume de 12,5 µL. As condições de ciclagem da RT-qPCR foram desnaturamento inicial a 94 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de duas etapas compostos por desnaturamento a 94 °C por 15 s e pareamento e síntese a 58 °C por 30 s. O termociclador (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System) foi configurado para fazer a leitura do sinal emitido pela SYBR Green após a síntese dos novos fragmentos em cada ciclo. Terminado o processo de amplificação, gerou-se a curva de “melting” para cada amostra. Para tanto, a temperatura variou de 65 °C a 95 °C e a leitura do sinal foi feita a cada 0,5 °C de acréscimo de temperatura.

Ao final das ciclagens, os arquivos digitais gerados pelo equipamento foram analisados por meio do “software Bio-Rad CFX Manager” versão 3.1.1517.0823 para Windows. As amostras foram testadas em duplicatas e os ciclos de quantificação (Cq) foram conferidos, de forma que somente as duplicatas que não apresentaram variação do Cq maior do que 0,5 foram aceitas. Aquelas que não respeitavam essa condição foram repetidas. As curvas de eficiência foram obtidas utilizando-se de cinco a sete diluições na base dois (1:2) de “mix” contendo dois µL de cada amostra, incluindo-se os controles negativos. Essas amostras foram testadas em triplicatas.

As eficiências foram calculadas por meio da fórmula:  $E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{Slope}}\right)}$ ; onde o “slope” foi automaticamente gerado pelo “software” do equipamento. A análise para seleção dos genes endógenos foi conduzida nos “softwares” GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) e NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004).

#### 4.6.3. Expressão gênica das citocinas alvo deste estudo

A expressão relativa dos transcritos das citocinas pró-inflamatórias CXCLi2 e interleucina (IL) 6 e do interferon gama (IFN $\gamma$ ) foram avaliados por RT-qPCR. As informações sobre as sequências dos iniciadores utilizados estão disponíveis na Tabela 11. Os reagentes utilizados e os parâmetros de ciclagem foram os mesmos descritos no item 4.5.2, com exceção da temperatura de pareamento e síntese que foi de 64°C para a CXCLi2 e IL6 e 58°C para o IFN $\gamma$ .

Tabela 11. Genes de resposta imunológica avaliados e suas informações relevantes.

| Gene         | Sequência (5'->3')            | "Amplicon"<br>(pb) | Referência           |
|--------------|-------------------------------|--------------------|----------------------|
| CXCLi2       | F: GCCCTCCTCCTGGTTTCAG        | 74                 | Setta et al. (2012a) |
|              | R: TGGCACCGCAGCTCATT          |                    |                      |
| IL6          | F: GCTCGCCGGCTTCGA            | 71                 | Setta et al. (2012a) |
|              | R: GGTAGGTCTGAAAGGCGAACAG     |                    |                      |
| IFN $\gamma$ | F: GTGAAGAAGGTGAAAGATATCATGGA | 71                 | Setta et al. (2012a) |
|              | R: GCTTTGCGCTGGATTCTCA        |                    |                      |

#### 4.7. Análise dos resultados

Para análise das curvas de multiplicação bacteriana *in vitro*, identificou-se a fase exponencial de cada curva e determinou-se a equação de regressão para cada gráfico. Os coeficientes angulares das três equações das retas para cada bactéria testada foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação múltipla das médias (DANIEL; CROSS, 2013). Os dados de mortalidade foram analisados por meio do teste não paramétrico Qui-quadrado com correção de Yates (GREENWOOD; NIKULIN, 1996). As médias das UFC em órgãos, por dia de colheita, foram submetidas à análise de variância seguida por teste comparativo de médias de Bonferroni (DANIEL; CROSS, 2013). A expressão relativa dos genes-alvo

foi obtida por meio do método descrito por Kogut et al. (2008), após normalização desses pela expressão dos genes de referência. A expressão gênica normalizada foi submetida à análise de variância seguida de teste comparativo de médias de Tukey (DANIEL; CROSS, 2013). Os testes foram executados com auxílio do programa Prism GraphPad versão 6.07 para Windows e o nível de significância dos mesmos foi de 5% ( $P < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Construção das estirpes mutantes

A utilização do método Lambda-Red para mutagênese permitiu a obtenção dos três clones mutantes, gerados a partir da estirpe 287/91 de *S. Gallinarum* (SG287/91), que continham deleções nas sequências codificantes (CDS) dos genes *ccmH* e / ou *idnTO*. Quinhentos e sessenta e oito pares de bases foram excluídos do interior das CDS dos genes *ccmH* (Tabela 1). As deleções não ocorreram simultaneamente em ambos os parálogos apesar da alta similaridade entre os genes *ccmH* (Figura A1), de forma que SG $\Delta$ *ccmH*-1 foi o primeiro mutante obtido. A Figura 4A apresenta o resultado de amplificação no genoma de SG $\Delta$ *ccmH*-1 por meio dos iniciadores *ccmH*(test1B)-F+R e demonstra que o fragmento heterólogo de 1.114 pb, amplificado a partir do plasmídio pKD3, substituiu adequadamente os 568 pb alvo de deleção, rendendo “amplicon” (coluna 2) de maior tamanho molecular que a da estirpe selvagem (coluna 1). Adicionalmente, conduziu-se PCR na qual os iniciadores de verificação foram combinados àqueles que se pareavam no interior da CDS do gene de resistência (detalhes na Tabela 6), o que gerou produtos na PCR que confirmaram que o fragmento heterólogo foi inserido no sentido planejado (Figura 4 A – colunas 4 e 5).

Após nova rodada de eletroporação, inseriu-se no cromossomo de SG $\Delta$ *ccmH*-2 fragmento heterólogo de 1.577 pb amplificado a partir do plasmídio pKD4. Como esperado, a PCR executada com os iniciadores *ccmH*(test2B)-F+R produziu no clone mutante “amplicon” de maior tamanho molecular que o produzido na estirpe selvagem (Figura 4B – colunas 6 e 7), consistente com o predito *in silico* (Tabela 6). A combinação dos iniciadores *ccmH*(test2B)F+R com aqueles para o interior do gene de resistência a canamicina (K1 e K2) demonstrou que o fragmento heterólogo foi inserido na posição esperada (Figura 4B – colunas 9 e 10).

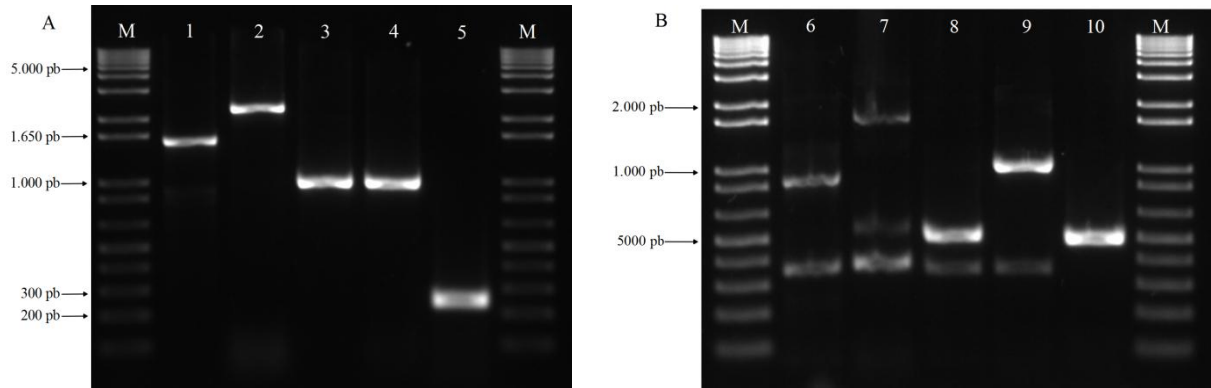


Figura 4. Eletroferograma em gel de agarose 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados a partir do DNA da estirpe *SGΔccmH*. A Figura 4A foi obtida a partir do DNA de *SGΔccmH-1*, enquanto que a Figura 4B a partir do DNA de *SGΔccmH-2*. M: Marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Colunas 1 e 6: DNA de SG287/91; colunas 2 e 7: DNA de *SGΔccmH* com a “marca” de antibiótico; colunas 3 e 8: DNA da *SGΔccmH* sem a “marca” de antibiótico; coluna 4: DNA de *SGΔccmH* combinando-se os iniciadores *ccmH(test1B)-F+C1*; coluna 5: DNA de *SGΔccmH* combinando-se os iniciadores *ccmH(test1B)-R+C2*; coluna 9: DNA de *SGΔccmH* combinando-se os iniciadores *ccmH(test2B)-F+K2*; coluna 10: DNA de *SGΔccmH* combinando-se os iniciadores *ccmH(test2B)-R+K1*. Tamanhos moleculares esperados na Tabela 6.

A deleção de 753 pb introduzida nas CDS dos genes *idnTO* foi resultado da substituição da sequência alvo por fragmento heterólogo de 1.577 pb amplificado a partir do plasmídio pKD4. Na Figura 5 demonstra-se que a PCR por meio dos iniciadores *idnTOtest-F+R* produziu “amplicon” de maior tamanho molecular em *SGΔidnTO* do que na estirpe selvagem (colunas 1 e 2), mostrando que o processo de mutagênese ocorreu como desejado. Quando se combinou os iniciadores internos para o marcador molecular de resistência com os de verificação, a PCR produziu fragmentos de tamanho molecular esperado (Tabela 6) garantindo que a sequência heteróloga foi inserida na posição correta como planejado (Figura 5 – colunas 4 e 5).

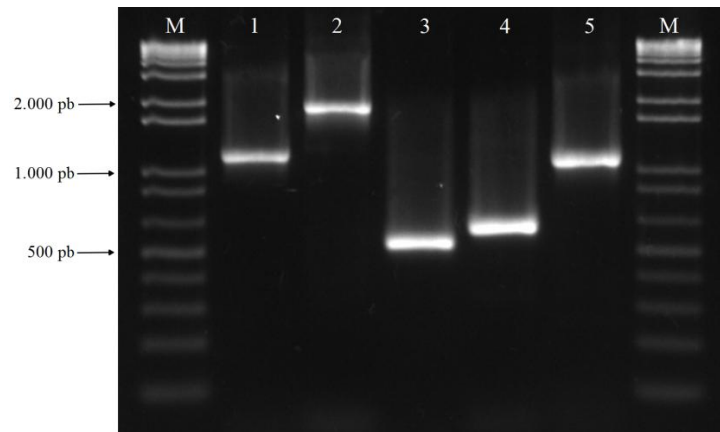


Figura 5. Eletroferograma em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificado a partir do DNA do clone *SG $\Delta$ idnTO*. M: Marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA); coluna 1: DNA de SG287/91; coluna 2: DNA de *SG $\Delta$ idnTO* com a “marca” de antibiótico; coluna 3: DNA de *SG $\Delta$ idnTO* sem a “marca” de antibiótico; coluna 4: DNA de *SG $\Delta$ idnTO* combinando-se os iniciadores idnTOteste-F+K1; coluna 5: DNA de *SG $\Delta$ idnTO* combinando-se os iniciadores idnTOteste-R+K2. Tamanhos moleculares esperados disponíveis na Tabela 6.

As CDS conferindo resistência à canamicina ou ao cloranfenicol, utilizadas para se selecionar os clones mutantes, foram removidas dos cromossomos por meio de introdução do plasmídeo pCP20 no citoplasma bacteriano. As PCR conduzidas utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores *ccmH(test1B)-F+R*, *ccmH(test2B)-F+R* e *idnTOtest-F+R* desmontaram que os genes de resistência foram completamente removidos dos clones *SG $\Delta$ ccmH-1*, *SG $\Delta$ ccmH-2* e *SG $\Delta$ idnTO*, respectivamente. À PCR, esses clones produziram “amplicons” menores que aqueles obtidos em SG287/91 (Figura 4A – coluna 3 / Figura 4B – coluna 8 / Figura 5 – coluna 3). O fenótipo de sensibilidade aos agentes antimicrobianos utilizados no processo também foi confirmado em meios sólidos contendo as substâncias mencionadas.

A transdução de material genético mediada pelo bacteriófago P22( $\Phi$  P22) permitiu que se obtivesse as estirpes *SG $\Delta$ ccmH* completa e *SG $\Delta$ ccmHidnTO*. A primeira foi construída pela transferência da mutação *ccmH-1* para a estirpe *SG $\Delta$ ccmH-2*; enquanto a segunda, pela transferência da mutação *idnTO* para a estirpe *SG $\Delta$ ccmH* completa. Os clones positivos foram selecionados em LA

contendo antibiótico apropriado e por PCR. Os marcadores de resistência foram excluídos dos cromossomos com sucesso antes do estudo *in vivo*.

## 5.2. Curvas de multiplicação bacteriana

Os dados gerados nesse estudo demonstraram que o perfil de multiplicação das estirpes testadas foi semelhante na presença de ácido glucônico, em aerobiose. A fase lenta de multiplicação (fase “lag”) durou duas horas desde a incubação e então as bactérias entraram na fase exponencial de multiplicação (fase “log”). Essa fase se prolongou por quatro horas quando então, às 6 horas após a inoculação, os micro-organismos entraram na fase estacionária de multiplicação apresentando DO que variaram de 0.273 até 0.296. A análise estatística dos coeficientes angulares, obtidos como demonstrado na Figura B1, demonstrou que não houve diferença entre as taxas de multiplicação bacteriana apesar das alterações introduzidas em seus cromossomos.

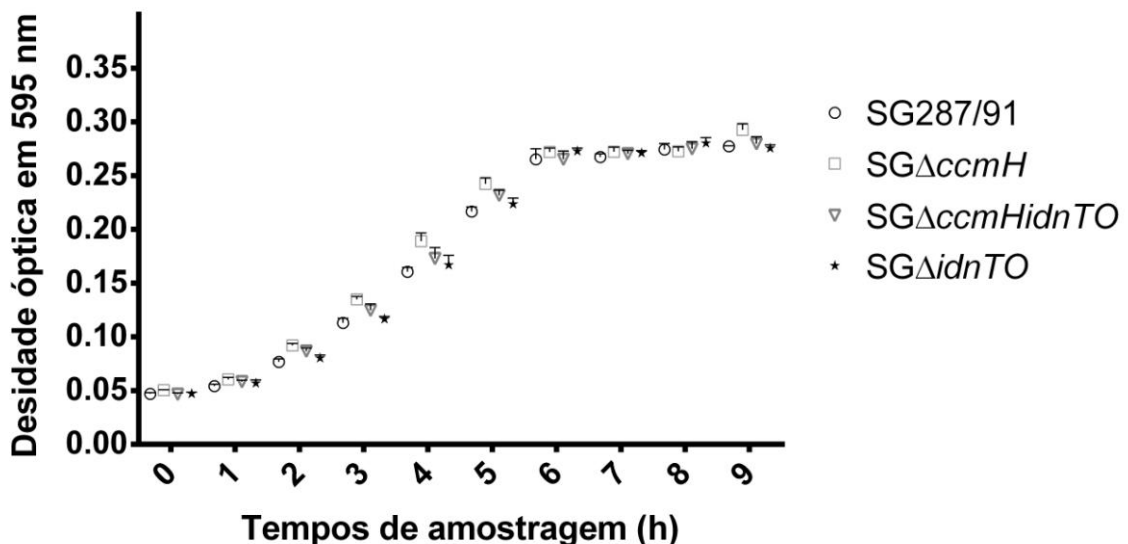


Figura 6. Curvas-consenso da multiplicação das bactérias testadas nesse estudo em meio mínimo M9 contendo ácido glucônico como única fonte de carbono e energia. Símbolos são representados pela média e desvio padrão.

### 5.3. Experimentação *in vivo*

#### 5.3.1. Experimento 1: Sinais clínicos, mortalidade e achados macroscópicos

Nos primeiros dois dias após a infecção das aves, não se observou sinais clínicos indicativos de tifo aviário ou pulorose. Alguns poucos animais infectados com *S. Pullorum* estirpe 449/87 (SP449/87) apresentaram leves alterações no comportamento no 3º dpi, tais como apatia e “encorujamento”, porém todas as aves estavam visualmente saudáveis do 5º dpi em diante. Ao longo dos 17 dias de experimento não houve óbito entre os animais infectados com SP449/87 (Tabela 12).

Os primeiros sinais de infecção entre os animais infectados com *S. Gallinarum*, estirpes mutantes ou não, apareceram no 4º dpi, quando algumas das aves apresentaram aspecto “encorujado”, penas eriçadas, falta de apetite e diarreia verde-amarelada (Figuras 7A e 7B). Desse dia em diante, os sinais se tornaram mais severos e comuns, até que no 6º dpi registrou-se início de mortalidade em aves dos grupos infectados com *S. Gallinarum* (Figura 7C; Tabela 12). Apesar de generalizada, a mortalidade no 6º dpi foi mais intensa no grupo cujos animais receberam *SGΔidnTO* por via oral.

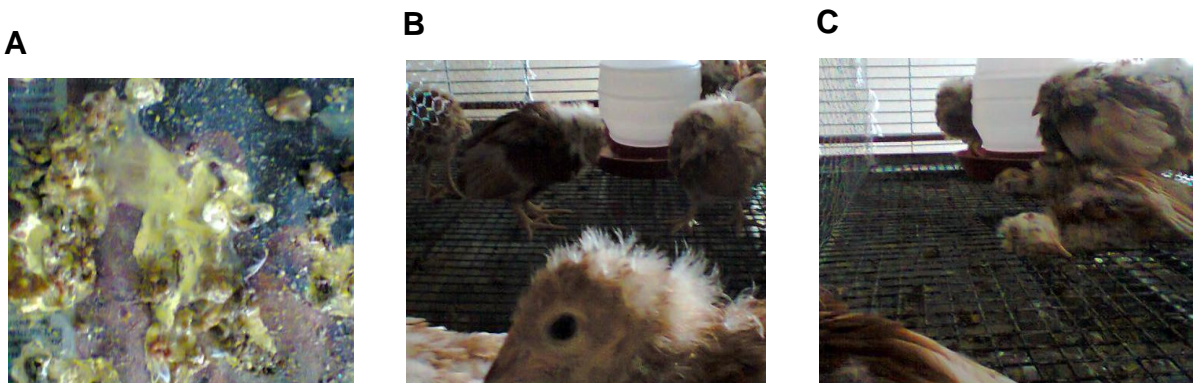


Figura 7. Sinais clínicos mais evidentes entre os animais infectados com *S. Gallinarum* (estirpes mutantes e selvagem). A: Diarreia verde-amarelada; B: Ao fundo, próximo ao bebedouro, nota-se que as aves apresentavam

aspecto “encorujado” e penas eriçadas, típicos de estado febril; C: Aves mortas pertencentes aos grupos infectados por via oral com as estirpes de *S. Gallinarum* alvo desse estudo.

A mortalidade persistiu por seis dias e o último animal veio a óbito no 12º dpi. Esse pertencia ao grupo cujas aves foram infectadas por SG287/91. Todos os animais infectados com *S. Gallinarum*, estirpe mutante ou não, vieram a óbito, de forma que não houve diferença significativa para a mortalidade entre esses grupos (Tabela 12). A diferença existiu entre a taxa de mortalidade do grupo cujos animais foram infectados com SP449/87 em relação aos demais. Apesar de não haver significância estatística, existiu aparente tendência dos clones *SGΔidnTO* e, em menor extensão, *SGΔccmHidnTO* em induzir curso mais agudo de infecção com mortalidade concentrada entre os 6º e 8º dpi, enquanto que o clone *SGΔccmH* o fez com 10 dpi e SG287/91 com 12 dpi.

Tabela 12. Mortalidade observada em pintainhas infectadas, por via oral, no 21º dia de vida com as estirpes selvagens e mutantes alvos desse estudo.

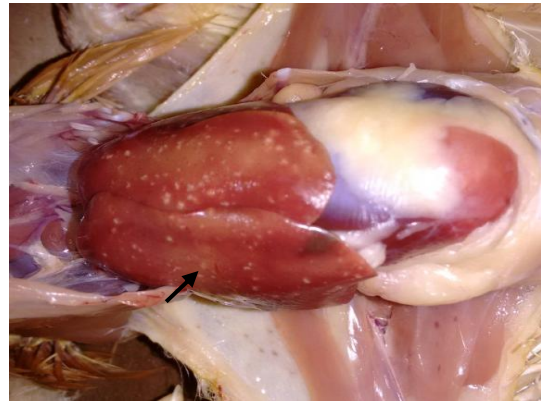
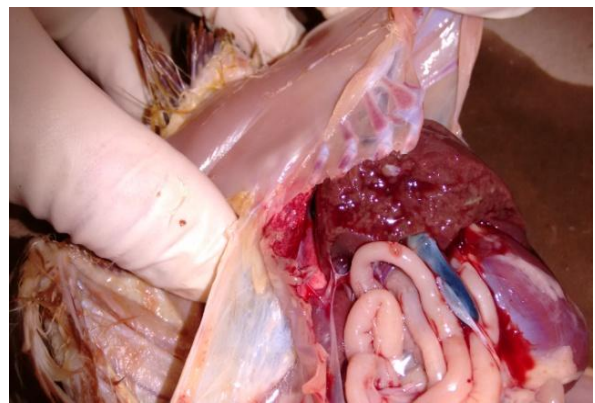
| Bactéria            | Dias pós-infecção (dpi) |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    | Total*            |
|---------------------|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------------|
|                     | 1                       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |                   |
| SP449/87            | 0                       | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0% <sup>a</sup>   |
| SG287/91            | 0                       | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 7 | 1 | 2 | 0  | 0  | 1  | -  | -  | -  | -  | -  | 100% <sup>b</sup> |
| <i>SGΔccmH</i>      | 0                       | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 3 | 1 | 1  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 100% <sup>b</sup> |
| <i>SGΔidnTOccmH</i> | 0                       | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | 7 | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 100% <sup>b</sup> |
| <i>SGΔidnTO</i>     | 0                       | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 4 | 4 | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 100% <sup>b</sup> |

\* Valores seguidos de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

Todas as aves que vieram a óbito foram examinadas à necropsia. As lesões macroscópicas foram semelhantes entre animais dos diferentes grupos de infecção e os principais achados foram hepatoesplenomegalia (Figura 8A), presença de pontos esbranquiçados e difusos sobre a superfície do fígado e do baço (Figuras 8B e 8C), congestão hepática (Figura 8D) e regiões de descoloração na superfície do fígado. No 18º dpi, as aves do grupo que recebeu SP449/87 oralmente foram

sacrificadas e também analisadas. Apesar de não manifestarem qualquer sinal clínico de pulorose, os animais continham várias alterações nos órgãos, entre eles o fígado apresentava-se congesto, com bordas esverdeadas e deposição de fibrina (Figura 8E), o duodeno exibia substância caseosa com aspecto tumoral (Figuras 8F e 8G), o coração continha líquido amarelado e cristalino entre o miocárdio e a membrana pericárdica (hidropericárdio) e desenvolvimento de substâncias caseosas, com aspecto tumoral, aderidas ao miocárdio (Figura 8H).

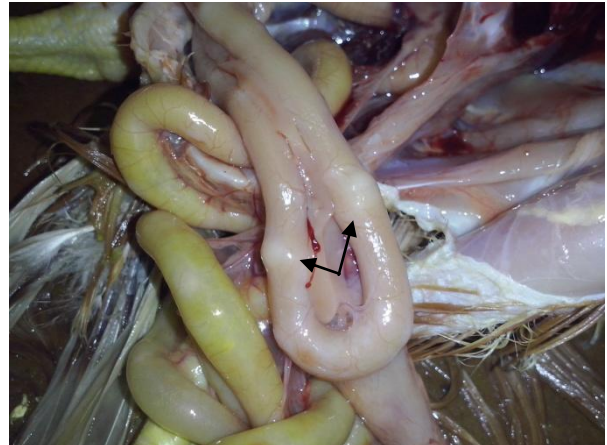
Os micro-organismos utilizados nas infecções foram reisolados do fígado, do baço ou de ambos os órgãos dos animais examinados.

**A****B****C****D**

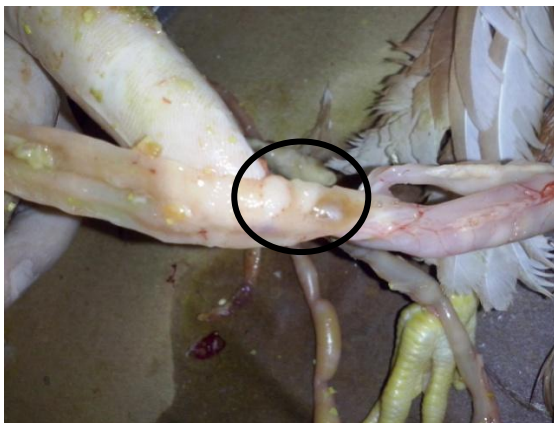
E



F



G



H



Figura 8. Lesões macroscópicas identificadas em aves infectadas aos 21 dias de vida pelas estirpes testadas nesse estudo. Figuras 8A-8D ilustram as principais alterações encontradas nos órgãos de aves mortas pelo tido aviário, infectadas *S. Gallinarum*, estirpes mutantes ou selvagem. Figuras 8E-8H ilustram as principais alterações encontradas nos tecidos de animais infectados por SP449/87. Figura 8A: Hepatomegalia: O órgão está aumentado de volume e pôde ser visto antes de acessar a cavidade celomática (círculo preto); Figura 8B: Hepatomegalia, pontos esbranquiçados difusos e região de descoloração indicada por seta preta; Figura 8C: Esplenomegalia e presença de pontos esbranquiçados difusos sobre o órgão; Figura 8D: Congestão hepática. O sangue pode ser visto no parênquima do órgão; Figura 8E: Fígado congesto com as bordas esverdeadas e presença de conteúdo fibrinoso sobre sua superfície; Figura 8F: Presença de nódulos caseosos multifocais no duodeno (setas pretas);

Figura 8G: Nódulos esbranquiçados no duodeno visto a partir da superfície mucosa (área destacada); Figura 8H: Hidropericárdio (seta branca) e presença dos nódulos caseosos difusos sobre a superfície do miocárdio (seta preta).

### 5.3.2. Experimento 2: Contagem bacteriana em órgãos

A contagem dos micro-organismos estudados, em fígado e em baço, está demonstrada em gráficos disponíveis na Figura 9. Não houve detecção de UFC / g em fígado ou em baço no 1º dpi, exceto por uma amostra de fígado, de pintinha infectada pelo clone *SG $\Delta$ idnTO*, que foi positiva após semeadura de amostra enriquecida; a esta foi atribuído o valor de  $10^2$  UFC/g de órgão. No 3º dpi, todos os micro-organismos inoculados foram recuperados dos fígados e baços analisados, porém sem diferença estatística significativa entre os valores obtidos de aves infectadas por *S. Gallinarum* seja pela estirpe selvagem ou pelos clones mutantes. Já SP449/87 foi recuperada em menor quantidade que *SG287/91*, *SG $\Delta$ ccmHidnTO* e *SG $\Delta$ idnTO* em fígado e que *SG $\Delta$ ccmH*, *SG $\Delta$ ccmHidnTO* e *SG $\Delta$ idnTO* em baço nesse dia. A quantidade de UFC / g de órgão foi de 10 a 100 vezes maior no fígado do que no baço no 3º dpi.

A diferença nas quantidades de bactérias recuperadas de órgãos ficou mais evidente no 5º dpi. SP449/87 foi recuperada em quantidade menor que os clones mutantes e a estirpe selvagem, com significância estatística. Já ao comparar as contagens dos clones mutantes com as de *SG287/91*, observou-se que aqueles albergando a mutação *idnTO* foram mais hábeis em se multiplicar sistemicamente. *SG $\Delta$ idnTO* foi recuperada em maior número nos fígados e baços analisados do que a estirpe selvagem. *SG $\Delta$ ccmHidnTO* também se multiplicou em maior quantidade que *SG287/91* no fígado no 5º dpi e, embora tal tendência também tenha sido notada para o baço, não houve suporte estatístico para essa diferença. *SG $\Delta$ ccmH* se comportou como a estirpe selvagem ao longo dos cinco dias de experimentação.

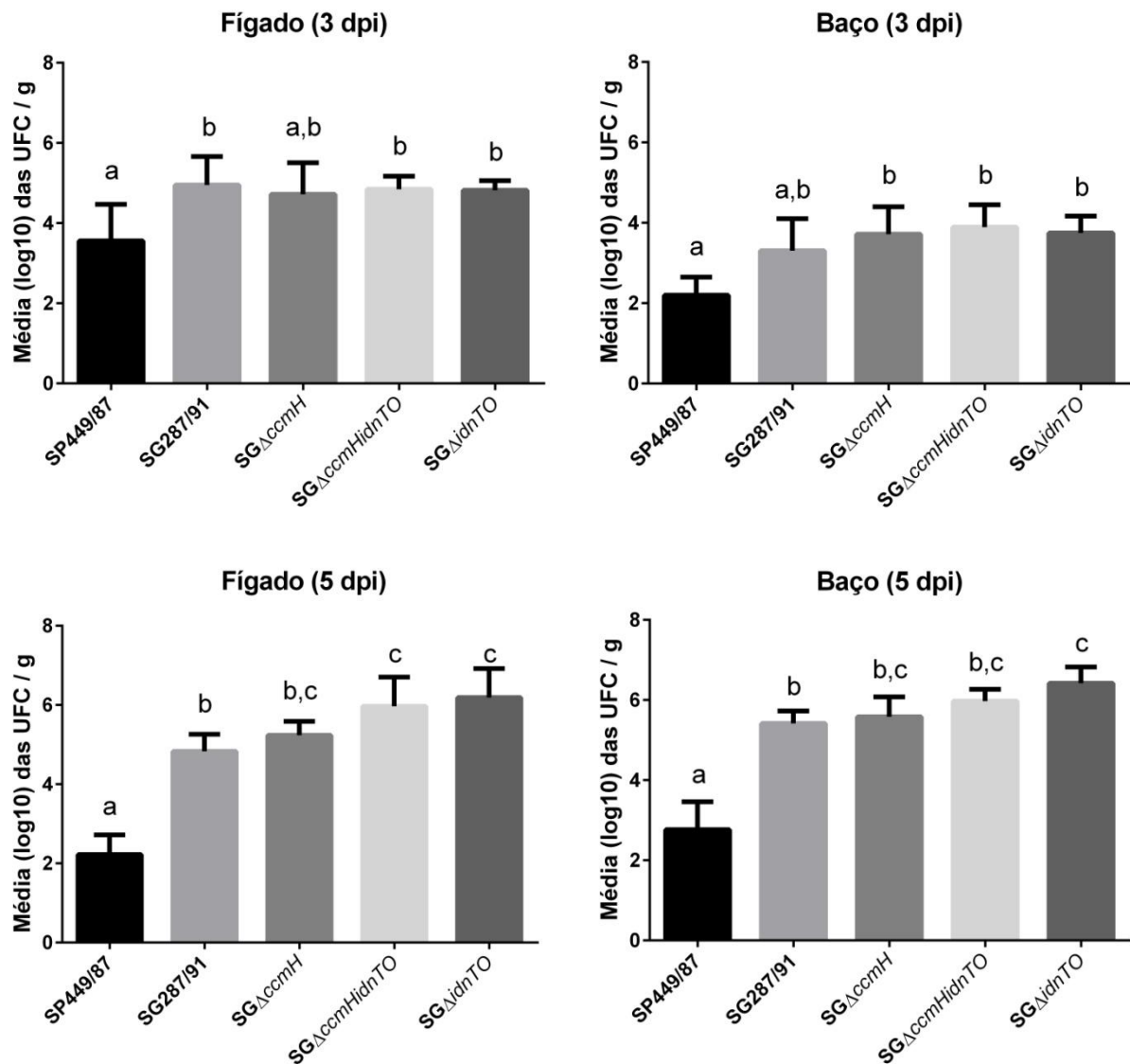


Figura 9. Estimativa média do número ( $\log_{10}$ ) de UFC / g de fígado e baço de pintinhas infectadas por via oral no 15º dia de vida. Letras diferentes entre colunas do mesmo gráfico indicam que houve diferença estatística significativa na contagem de UFC entre diferentes grupos de infecção ( $P < 0,05$ ). SP449/87: *S. Pullorum* estirpe 449/87; SG287/91: *S. Gallinarum* estirpe 287/91; SG $\Delta$ ccmH: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *ccmH*; SG $\Delta$ ccmHidnTO: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *ccmH* e *idnTO*; SG $\Delta$ idnTO: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *idnTO*.

#### 5.4. Expressão de citocinas em tonsila cecal e em baço

Os dados da expressão relativa dos genes aqui estudados, cujos produtos são as citocinas pró-inflamatórias CXCLi2 e IL6 e o INF $\gamma$ , estão disponíveis na Figura 10. Dos quatro genes de referência testados, o HPRT foi selecionado como o mais estável pelo GeNorm e pelo NormFinder, enquanto que o 28S foi selecionado pelo BestKeeper. Apesar dessa discordância, todos os softwares aqui utilizados indicaram a combinação HPRT e GAPDH como a melhor opção para normalização dos dados de expressão gênica desse estudo. Por isso, a quantificação relativa dos transcritos CXCLi2, IL6 e INF $\gamma$  foi normalizada pela expressão dos genes HPRT e GAPDH. As eficiências de cada corrida estão detalhadas na Tabela 13.

Tabela 13. Informações relevantes sobre as eficiências da amplificação via RT-qPCR obtidas nesse estudo, as quais foram utilizadas para analisar os dados de expressão gênica relativa.

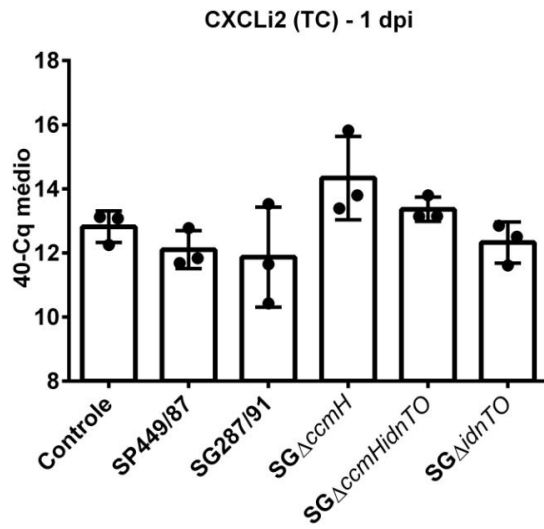
| <b>Gene alvo</b> | <b>Órgão</b>       | <b>Eficiência (E)</b> | <b>Coefficiente de correlação (R<sup>2</sup>)</b> |
|------------------|--------------------|-----------------------|---|
| HPRT             | Tonsila cecal (TC) | 98,80%                | 0,991   |
|                  | Baço (BA)          | 94,88%                | 0,986   |
| GAPDH            | Tonsila cecal (TC) | 96,72%                | 0,941   |
|                  | Baço (BA)          | 104,39%               | 0,987   |
| CXCLi2           | Tonsila cecal (TC) | 102,13%               | 0,991   |
|                  | Baço (BA)          | 100,33%               | 0,995   |
| IL6              | Tonsila cecal (TC) | 103,27%               | 0,989   |
|                  | Baço (BA)          | 101,14%               | 0,983   |
| $\beta$ -actina  | —*                 | 94,66%                | 0,998   |
| 28S              | —*                 | 64,20%                | 0,998   |
| INF $\gamma$     | Baço (BA)          | 99,54%                | 0,983   |

\* Transcritos avaliados somente durante a etapa de seleção dos genes de referência.

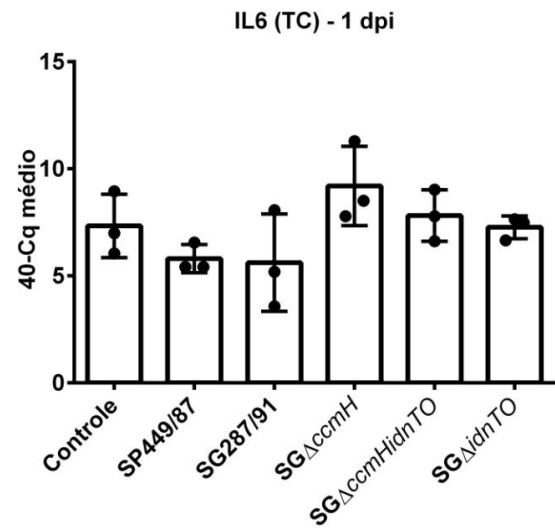
As citocinas pró-inflamatórias CXCLi2 e IL6 expressas nas tonsilas cecais apresentaram perfis de transcrição semelhantes para o modelo desse estudo (Figuras 10A, 10B, 10C e 10D). Quando comparados ao controle negativo, SP449/87 e SG287/91 suprimiram a transcrição de ambos os genes, enquanto que os clones *SG $\Delta$ ccmH* e *SG $\Delta$ ccmHidnTO* a estimularam no 1º dpi (Figura 10A e 10B). Contudo, essas diferenças absolutas entre os níveis de transcrição observados, tanto para CXCLi2 quanto para IL6, não tiveram suporte estatístico. No 3º dpi, a variação nos níveis de transcrição de CXCLi2 e IL6 nos grupos infectados não diferiu estatisticamente do grupo não infectado (Figuras 10C e 10D). Ao comparar a expressão de tais genes entre os grupos infectados por *S. Gallinarum* observa-se que não houve diferença estatística para as variações obtidas. Só houve suporte estatístico para as variações entre as quantidades de mRNA transcritos por animais infectados por SP449/87 em relação àqueles infectados por *SG $\Delta$ idnTO*.

Ao avaliar a quantidade de transcritos CXCLi2 e IL6 em fragmentos de baço colhidos no 3º dpi, observa-se que a suposta supressão de CXCLi2 induzida por todos os micro-organismos infectantes não teve suporte da estatística (Figura 10E). Em contrapartida, as estirpes infectantes foram capazes de induzir aumento na transcrição de IL6 em relação ao grupo não infectado e com significância estatística (Figura 10F). Contudo, não houve diferença entre os níveis de mRNA de IL6 entre os órgãos de aves infectadas. Quanto ao número de transcritos IFN $\gamma$  presentes nos fragmentos de baço colhidos no 5º dpi, observa-se que SP449/87 induziu leve aumento de transcrição, mas não houve significância estatística quando comparada ao controle negativo (Figura 10G). Todos os baços colhidos das aves infectadas por *S. Gallinarum* apresentaram elevada quantidade de mRNA de IFN $\gamma$  em relação ao grupo controle. Além disso, com as exceções de *SG $\Delta$ ccmH* e *SG $\Delta$ idnTO*, SG287/91 e *SG $\Delta$ ccmHidnTO* também induziram maior expressão de IFN $\gamma$  que SP449/87. Vale salientar que embora não tenha existido significância estatística para os níveis de transcritos de IFN $\gamma$  induzidos por *SG $\Delta$ ccmH* e *SG $\Delta$ idnTO*, em relação a SP449/87, houve tendência de que isso acontecesse, visto que os valores de *P* da comparação foram 0,095 e 0,065, respectivamente.

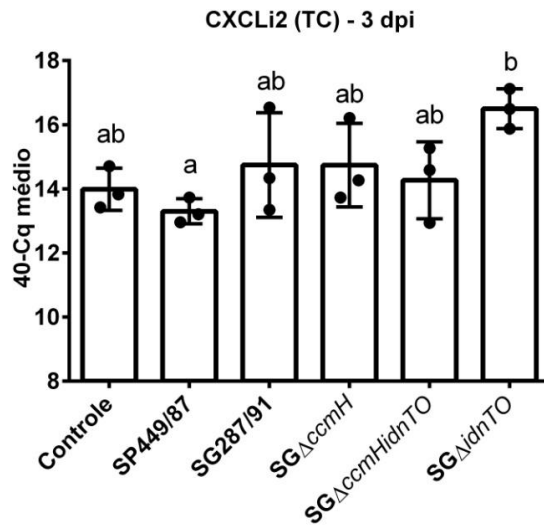
A



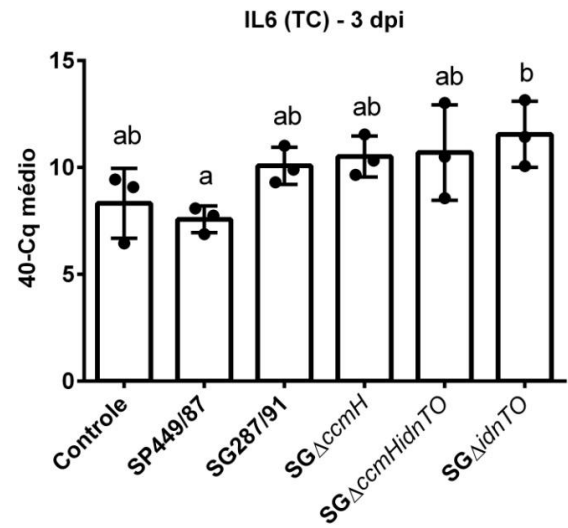
B



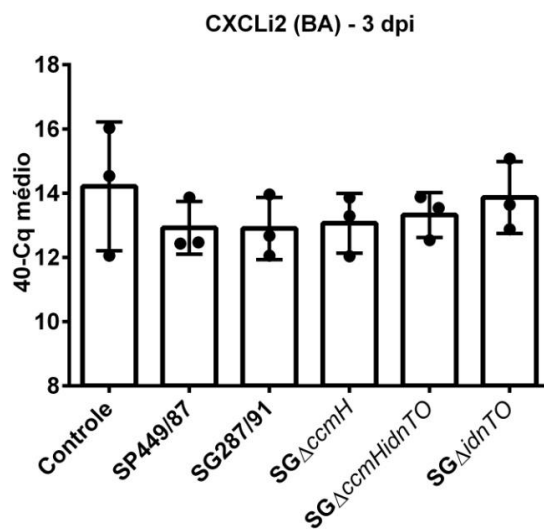
C



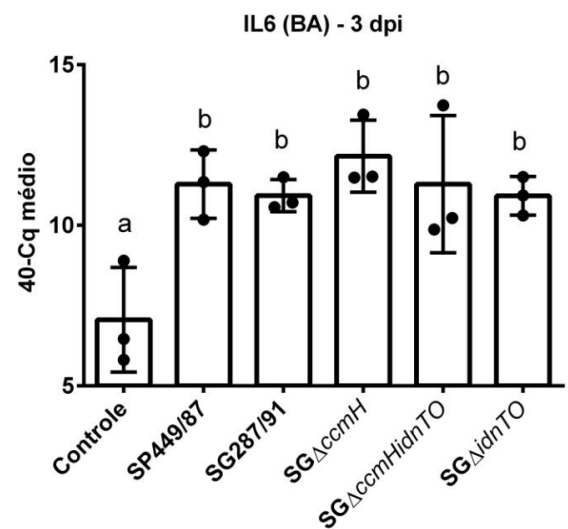
D



E



F



G

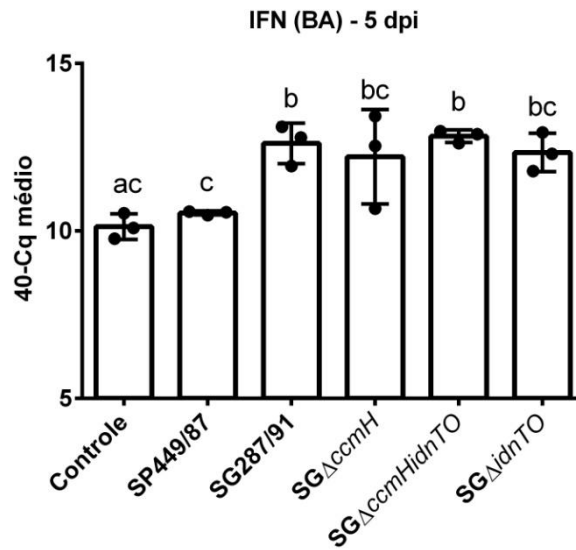


Figura 10. Expressão de citocinas pró-inflamatórias em tonsila cecal (TC) ou baço (BA) colhidos de pintainhas infectadas no 15º dia de vida pelas estirpes alvo desse estudo. Letras diferentes entre grupos no mesmo gráfico indica que a diferença observada tem suporte estatístico. Controle: Aves inoculadas com LB estéril a fim de compor o controle negativo; SP449/87: *S. Pullorum* estirpe 449/87; SG287/91: *S. Gallinarum* estirpe 287/91; SG $\Delta$ ccmH: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *ccmH*; SG $\Delta$ ccmHidnTO: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *ccmH* e *idnTO*; SG $\Delta$ idnTO: *S. Gallinarum* estirpe 287/91 com deleção em ambas as CDS dos genes *idnTO*.

## 6. DISCUSSÃO

O tifo aviário, causado por *Salmonella Gallinarum*, é uma infecção de galináceos com elevada importância econômica na avicultura industrial (BARROW; FREITAS NETO, 2011; SHIVAPRASAD; BARROW, 2013). Ao contrário do agente da pulrose, *S. Pullorum*, que infecta as aves de produção industrial e com as quais desenvolve uma relação patógeno-hospedeiro mais branda (menos virulenta), *S. Gallinarum* leva ao desenvolvimento de doença sistêmica severa provocando alta mortalidade em aves de qualquer idade, sendo mais comum nas adultas (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Até o momento, ainda é escasso o conhecimento sobre os mecanismos moleculares que sustentam essas diferentes interações com o hospedeiro. Batista et al. (2015) compararam os genomas de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* disponíveis até a data da publicação do artigo e observaram a presença de pseudogenes biotipo-específicos conservados, entre eles os genes *idnT*, *idnO* (*idnTO*) e *ccmH*, cujo estudo poderia agregar conhecimentos referentes à patogenia do tifo aviário e da pulrose. Assim, no presente estudo avaliou-se o efeito de mutação nos genes acima mencionados sobre a patobiologia de *S. Gallinarum*.

Os genes selecionados nesse estudo são pseudogenes no biotipo *Pullorum* (BATISTA et al., 2015) e seus produtos proteicos estão envolvidos no metabolismo bacteriano (BAUSCH et al., 1998; TANAPONGIIPAT et al., 1998). Essa tendência foi relatada por Nuccio e Bäumlér (2014) que compararam os genomas de alguns sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e identificaram 469 sequências codificantes (CDS), das quais 169 estariam envolvidas no metabolismo bacteriano anaeróbico, que eram pseudogenes somente nos sorotipos restritos ou adaptados ao seu hospedeiro, chamados por esses autores de patotipos extraintestinais. Os biotipos *Gallinarum* e *Pullorum*, adaptados às aves, são classificados como patotipos extraintestinais, mas as CDS dos genes *idnTO* e *ccmH* de *S. Gallinarum* não sofreram ruptura como as de *S. Pullorum* (BATISTA et al., 2015). Por isso, esses genes se tornaram importantes alvos para o estudo molecular da relação patógeno-hospedeiro entre essas bactérias e as aves.

Os resultados do presente estudo sugerem que a ruptura introduzida nas CDS dos genes *idnTO* interfere na virulência de *S. Gallinarum* 287/91 (SG287/91), mas não a introduzida na CDS do gene *ccmH*. As estirpe  $SG\Delta idnTO$  e  $SG\Delta ccmHidnTO$  apresentaram aumento de virulência para aves suscetíveis, quando inoculadas pela via oral, ao se multiplicarem mais, no 5º dpi, nos fígados e/ou baços do que SG287/91. Além disso, observou-se uma tendência entre as estirpes com mutação nos genes *idnTO* de provocarem forma mais aguda do tifo aviário, com os animais morrendo mais precocemente do que aqueles infectados pela estirpe selvagem. Já  $SG\Delta ccmH$  não foi mais virulenta do que SG287/91, indicando que os genes *ccmH* não interferem na patogenia geral do tifo aviário.

Os genes *idnT* e *idnO* codificam o transportador de L-idonato e a enzima 5-ceto-D-gluconato 5-redutase, respectivamente e ambas compõem o sistema secundário de metabolismo do gluconado a partir do L-idonato, denominado GntII (BAUSCH et al., 1998). Em *Escherichia coli*, o L-idonato é transportado para o citoplasma bacteriano por meio do transportador IdnT. A molécula é oxidada a 5-cetogluconato e em seguida reduzida a D-gluconato por meio das enzimas IdnD e IdnO, respectivamente. O D-gluconato é fosforilado pela enzima IdnK para formar 6-fosfogluconato que será metabolizado na via Entner-Doudoroff (BAUSCH et al. 1998). Adicionalmente, o transportador IdnT também é capaz de carrear com alta afinidade o D-gluconato para o citoplasma celular (PEEKHAUS et al., 1997). Juntos esses estudos esclarecem as funções dos genes *idn* na provisão de D-gluconato para ser utilizado pela célula bacteriana.

O estudo publicado por Eriksson et al. (2003) aponta o D-gluconato como importante fonte de carbono e energia que favorece a sobrevivência de *Salmonella* spp. *in vitro*. Nesse estudo, os autores observaram que a transcrição do principal transportador conhecido de D-gluconato, o gene *gntT*, estava aumentada em macrófagos J744-A.1 infectados por *S. Typhimurium* SL1344, sugerindo que o gluconato e outros carboidratos semelhantes seriam ativamente utilizados por *Salmonella* spp. durante a sua multiplicação intracelular. Os genes *gnt* estão intactos nos genomas de  $SG\Delta idnTO$  e  $SG\Delta ccmHidnTO$ , portanto espera-se que essas estirpes ainda sejam capazes de carrear e metabolizar o D-gluconato apesar das mutações nos genes *idn*. Ainda assim, essas mutantes apresentaram aumento de

virulência *in vivo*. Do ponto de vista dos patógenos, os organismos vivos são excelentes fontes de nutrientes e as bactérias, por sua vez, desenvolveram mecanismos específicos para extrair essas substâncias dos seus hospedeiros (ROHMER; HOCQUET; MELLER, 2011). Assim, postula-se que a restrição metabólica imposta na biossíntese de D-gluconato obrigou *S. Gallinarum* a subtrair mais nutrientes do ambiente intracelular, alterando sua relação com o hospedeiro, a tornando mais virulenta.

O segundo gene avaliado nesse estudo faz parte do “cluster” *ccm* (“cytochrome c maturation”), o qual está duplicado nos genomas dos biotipos *Gallinarum* e *Pullorum*, mas somente nesse último apresenta ruptura em suas sequências de nucleotídeos (BATISTA et al., 2015). Oito genes fazem parte da família *ccm* e todos precisam ter suas sequências de nucleotídeos intactas para que à tradução produzam proteínas capazes de maturar citocromos do tipo “c” em *E. coli* (TANAPONGPIPAT et al., 1998). Estudos prévios revelaram que a anaerobiose seria a condição necessária para que esses genes fossem expressos (TANAPONGPIPAT et al., 1998; GROVE et al., 1996). Adicionalmente, Grove et al. (1996) observaram que o gene *ccmH*, conhecido até aquela época como *yejP*, é essencial para o correto funcionamento do “operon”, pois a sua deleção parcial impediu a maturação de citocromo “c” por *E. coli*.

Os dados do presente estudo sugerem que a alteração introduzida na CDS do gene *ccmH*, com a consequente perda da sua função, não alterou a patogenicidade de *S. Gallinarum* para aves suscetíveis. O grupo de aves infectadas por *SGΔccmH* apresentou perfil de mortalidade semelhante ao do grupo infectado por *SG287/91* e foi reisolada de fígado e baço de aves infectadas em quantidades que não diferiram estatisticamente dos valores obtidos com a estirpe selvagem. Contudo, notou-se a tendência entre os clones *SGΔccmH* e *SGΔccmHidnTO* de aumentar a transcrição das citocinas CXCLi2 e IL6, em tonsilas cecais, no 1º dpi, enquanto que *SP449/87* e *SG287/91* as suprimiu. Como já mencionado, os genes *ccm* parecem ser requeridos em condições de anaerobiose (GROOVE et al., 1996) predominante no lúmen intestinal (HE et al., 1999). Portanto, os dados aqui apresentados sugerem que a inativação do gene *ccmH* não teria impacto sobre a patogenicidade de *S. Gallinarum*, porém poderia alterar levemente a patogenia do tifo aviário ao tornar a

bactéria “mais visível” para o sistema imunológico no local da invasão. A aparente desvantagem adaptativa gerada pela inativação dos genes *ccmH* em *S. Gallinarum* poderia explicar a sua manutenção nesse biotipo, apesar de ser essa uma tendência contrária à relatada por Nuccio e Bäumler (2014) para patotipos extraintestinais.

Foi postulado por Nuccio e Bäumler (2014) que alguns pseudogenes presentes nos genomas dos patotipos extraintestinais, tais como *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, seriam relíquias de genes cujos produtos teriam sido utilizados por seus ancestrais para sobreviver no trato gastrointestinal do hospedeiro. A pesquisa conduzida por Thomson et al. (2008) corroborou com essa teoria quando demonstrou que alguns dos genes *ttr* de *S. Gallinarum* teriam sofrido ruptura, tornando-se inativados. Esses genes codificam enzimas do complexo tetrionato redutase, provedor de acceptor final de elétrons alternativo que permite a multiplicação de *Salmonella* spp. no intestino inflamado do hospedeiro (WINTER et al., 2010), nicho esse não mais ocupado por *S. Gallinarum* que sobrevive parasitando as células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro (CHAPPELL et al., 2009). Os dados do presente estudo, porém, sugerem que possíveis rupturas nas CDS dos genes *idnTO* e *ccmH* teriam impacto sobre o “fitness” de *S. Gallinarum*, que poderia se tornar mais virulenta para aves suscetíveis ou mais reconhecida pelo sistema de vigilância do hospedeiro nos intestinos, justificando assim suas sequências intactas nesse biotipo.

Acontece que em alguns casos, as rupturas gênicas nos genomas de bactérias patogênicas parecem ter o efeito de aumentar a eficiência do micro-organismo em causar infecção em seu hospedeiro; em outras palavras, essas mutações visariam o aumento do “fitness” bacteriano. Esse processo, denominado de efeito patoadaptativo, é bastante estudado no patógeno intracelular de humanos *Shigella* sp. e foi definido por Prosseda et al. (2012) como o conjunto de modificações nas sequências nucleotídicas que silenciam vias e processos que interferem com fatores necessários para a sobrevivência intracelular desse patógeno. Por exemplo, a ausência do gene *ompT*, o qual codifica uma protease de membrana externa, dos genomas de *Shigella flexneri* permite que esse micro-organismo se propague pelas células epiteliais já que a proteína OmpT degradaria a proteína VirG, necessária para a disseminação bacteriana sobre células epiteliais

(NAKATA et al., 1993). O efeito patoadaptativo foi observado em *Salmonella* por Retamal et al. (2010), os quais substituíram a SPI-3 de *S. Typhi*, que contém alguns pseudogenes, pela SPI-3 de *S. Typhimurium* e relataram que o mutante foi prejudicado na sua sobrevivência dentro dos monócitos humanos U937. Esse fenótipo foi atribuído a reconstituição do “operon” marT-fidL que em *S. Typhi* é naturalmente inativo, mas não em *S. Typhimurium*. Os genes *idnTO* e *ccmH* sofrem processo de seleção negativa nos genomas de *S. Pullorum* de modo que um futuro estudo no qual esses genes fossem reconstituídos e caracterizados por meio de infecções de células e de aves suscetíveis certamente demonstraria como suas funções alterariam o “fitness” bacteriano, esclarecendo assim o processo de eliminação gênica em andamento.

A infecção das aves por SG287/91 e por seus mutantes derivados induziram respostas imunológicas semelhantes. O aumento da transcrição de IL6, no baço, no 3º dpi, é consistente com a função dessa citocina em promover resposta imune de fase aguda e recrutamento e diferenciação de linfócitos, funcionando como ponto de comunicação entre as resposta imunes inata e adaptativa (SCHELLER et al., 2011). O aumento na transcrição do IFN $\gamma$  nos baços das aves infectadas pelas estirpes de *S. Gallinarum*, no 5º dpi, indica que a resposta imunológica desencadeada contra esse patógeno pode ser do tipo Th1 com alta produção de IFN $\gamma$  no baço, como postulado por Wigley et al. (2005b). Já o biotipo *Pullorum* provoca infecção com baixos níveis de IFN $\gamma$  no baço (TANG, 2016), como observado no presente estudo. Investigações mais profundas dos pseudogenes conservados e específicos a um biotipo poderiam aumentar o nosso conhecimento sobre o tifo aviário bem como auxiliar na compreensão das diferentes relações com o hospedeiro desencadeadas por *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em aves suscetíveis.

## 7. CONCLUSÕES

Conclui-se nas condições em que o estudo foi conduzido que:

A deleção introduzida nas CDS dos genes *idnTO* alteram o “fitness” de *S. Gallinarum* a tornando mais virulenta para aves, mas não a introduzida na CDS do gene *ccmH*.

Nenhum clone mutante teve sua patogenicidade alterada em relação a SG287/91, porém aqueles contendo a mutação *idnTO* apresentaram aparente aumento de virulência para aves suscetíveis infectadas por via oral.

Todos os clones mutantes foram capazes de invadir o sistema das aves a partir do intestino, mas somente aqueles contendo a mutação *idnTO* foram recuperados em maior quantidade nos fígados e baços no 5 dpi em relação a SG287/91.

A resposta imune pró-inflamatória desencadeada nas tonsilas cecais nos 1º e 3º dpi, mensurada pelo nível de transcrição das citocinas CXCLi2 e IL6, foi semelhante contra as infecções causadas pelos clones contendo a mutação *idnTO* e SG287/91. No entanto, *SGΔccmH* demonstrou ter a tendência de estimular essas citocinas no 1º dpi.

A resposta imune desencadeada nos baços 3º e 5º dpi, mensurada pelo nível de transcrição da citocina IL6 e do IFN $\gamma$ , foi semelhante contra as infecções causadas pelos clones mutantes e SG287/91.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Mecanismos Efetores da Imunidade Mediada por Células. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 225-242.

ACHTMAN, M.; WAIN, J.; WEILL, F. X.; NAIR, S.; ZHOU, Z.; SANGAL, V.; KRAULAND, M. G.; HALE, J. L.; HARBOTTLE, H.; UESBECK, A.; DOUGAN, G.; HARRISON, L. H.; BRISSE, S.; *S. enterica* MLST Study Group. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS pathogens**, São Francisco, v. 8, n. 6, 2012. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776)>.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, Baltimore, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

BAISÓN-OLMO, F.; GALINDO-MORENO, M.; RAMOS-MORALES, F. Host cell type-dependent translocation and PhoP-mediated positive regulation of the effector SseK1 of *Salmonella enterica*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 396, 2015. Disponível em: <[dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00396](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00396)>.

BAKSHI, C. S.; SINGH, V. P.; MALIK, M.; SINGH, R. K.; SHARMA, B. 55 kb plasmid and virulence-associated genes are positively correlated with *Salmonella* Enteritidis pathogenicity in mice and chickens. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 27, n. 6, p. 425-432, 2003.

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, Londres, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2011.

BARROW, P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A.; BINNS, M. M. Contribution of *Salmonella* Gallinarum Large Plasmid toward Virulence in Fowl Typhoid. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 2, p. 388-392, 1987.

BATISTA, D. F. A.; FREITAS NETO, O. C.; BARROW, P. A.; OLIVEIRA, M. T.; ALMEIDA, A. M.; FERRAUDO, A. S.; BERCHIERI JUNIOR, A. Identification and characterization of regions of difference between the *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum and the *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum genomes. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 30, n. 10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.007>>.

BATISTA, D. F. A.; FREITAS NETO, O. C.; DE ALMEIDA, A. M.; BARROW, P. A.; BARBOSA, F. O.; BERCHIERI JUNIOR, A. Molecular identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by a duplex polymerase chain reaction assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 28, n. 4, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1040638716651466>>.

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Virulence Mechanisms of *Salmonella* and their Genetic Basis. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). **Salmonella in Domestic Animals**. 1. ed. Oxon: CABI Publishing, 2000. cap. 4, p. 57-72.

BAUSCH, C.; PEEKHAUS, N.; UTZ, C.; BLAIS, T.; MURRAY, E.; LOWARY, T.; CONWAY, T. Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-idonic acid catabolism in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 14, p. 3704-3710, 1998.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. 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**, London, v. 30, n. 3, p. 221-231, 2001.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses Aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doença das Aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. cap. 4.1, p. 1-17.

BLONDEL, C. J.; YANG, H. J.; CASTRO, B.; CHIANG, S.; TORO, C. S.; ZALDÍVAR, M.; CONTRERAS, I.; ANDREWS-POLYMENIS, H. L.; SANTIVIAGO, C. A. Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella enterica* serotypes Gallinarum and Enteritidis. **PloS one**, São Francisco, v. 5, n. 7, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011724>>.

BOWDEN, S. D.; ROWLEY, G.; HINTON, J. C.; THOMPSON, A. Glucose and glycolysis are required for the successful infection of macrophages and mice by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, Washington, v. 77, n. 7, p. 3117-3126, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Animal. Departamento de Saúde Animal. **Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil, Programa Nacional de Sanidade Avícola**: Manual de Legislação. Brasília. 2009. 440 p.

BUCKNER, M. M.; CROXEN, M. A.; ARENA, E. T.; FINLAY, B. B. A comprehensive study of the contribution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SPI2 effectors to bacterial colonization, survival, and replication in typhoid fever, macrophage, and epithelial cell infection models. **Virulence**, Filadélfia, v. 2, n. 3, p. 208-216, 2011.

CALENGE, F.; KAISER, P.; VIGNAL, A.; BEAUMONT, C. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. **Genetics, selection and evolution**, Paris, v. 42, n. 11, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1297-9686-42-11>>.

CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J.; MCQUILLAN, J. A. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2012. Atlanta, 2012. 63 p.

CELIS-ESTUPIÑAN A. L., BATISTA, D. F. A., CARDOZO, M. V., SECUNDO DE SOUZA, A. I., RODRIGUES ALVES, L. B., ALMEIDA, A. M., BARROW, P. A., BERCHIERI JUNIOR, A., FREITAS NETO, O. C. Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil. **Avian Pathology**, Londres, v. 46, n. 3, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2017.1299922>>.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 53-59, 2009.

CHAUDHARI, A.A.; JAWALE, C. V.; KIM, S. W.; LEE, J. H. Construction of a *Salmonella* Gallinarum ghost as a novel inactivated vaccine candidate and its protective efficacy against fowl typhoid in chickens. **Veterinary Research**, London, v. 43, n. 44, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-43-44>>.

CHRISTENSEN, J. P.; OLSEN, J. E.; HANSEN, H. C.; BISGAARD, M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by plasmid profiling and biochemical analysis. **Avian Pathology**, London, 21, n. 3, p. 461-470, 1992.

CLC Bio. **CLC Sequence Viewer version 7.7**. Disponível em: <<https://www.qiagenbioinformatics.com/>>.

COBURN, B.; LI, Y.; OWEN, D.; VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 6, p. 3219-3227, 2005.

COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P. R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; BARRELL, B. G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, London, v. 409, n. 6823, p. 1007-1011, 2001.

DANIEL, W. W.; CROSS, C. L. **Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences**, 10th Edition. New York: John Wiley & Sons, 2013. p. 960.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 12, p. 6640-6645, 2000.

DE BOEVER, S.; VANGESTEL, C.; DE BACKER, P.; CROUBELS, S.; SYS, S. U. Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 122, n. 3-4, p. 312-317, 2008.

DESAI, P. T.; PORWOLLIK, S.; LONG, F.; CHENG, P.; WOLLAM, A.; BHONAGIRI-PALSIKAR, V.; HALLSWORTH-PEPIN, K.; CLIFTON, S. W.; WEINSTOCK, G. M.; MCCLELLAND, M. Evolutionary Genomics of *Salmonella enterica* Subspecies. **mBio**, Washington, v. 4, n. 2, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00579-12>>.

DIEYE, Y.; AMEISS, K.; MELLATA, M.; CURTISS 3RD, R. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **BMC microbiology**, Londres, v. 9, n. 3, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-3>>.

DOBRINDT, U.; HACKER, J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, n. 5, p. 550-557, 2000.

ERIKSSON, S.; LUCCHINI, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M.; HINTON, J. C. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 103-118, 2003.

ESWARAPPA, S. M.; JANICE, J.; BALASUNDARAM, S. V.; DIXIT, N. M.; CHAKRAVORTTY, D. Host-specificity of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: insights from comparative genomics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, 2009. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.004)>.

FENG, Y.; XU, H. F.; LI, Q. H.; ZHANG, S. Y.; WANG, C. X.; ZHU, D. L.; CAO, F. L.; LI, Y. G.; JOHNSTON, R. N.; ZHOU, J.; LIU, G. R.; LIU, S. L. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar pullorum RKS5078. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n. 3, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.06507-11>>.

FENG, Y.; JOHNSTON, R. N.; LIU, G. R.; LIU, S. L. Genomic comparison between *Salmonella* Gallinarum and Pullorum: differential pseudogene formation under common host restriction. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 3, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059427>>.

FIELDS, P. I.; SWANSON, R. V.; HAIDARIS, C. G.; HEFFRON, F. Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 83, n. 14, p. 5189-5193, 1986.

FIGUEIRA, R.; HOLDEN, D. W. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. **Microbiology**, Reading, v. 158, n. 5, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.058115-0>>.

FOSTER, N.; BERNDT, A. Immunity to *Salmonella* in Farm Animals and Murine Models of Disease. In: BARROW, P. A.; METHNER, U. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. 2. ed. Oxfordshire: CAB International, 2013. cap. 8, p. 136-161.

FREITAS NETO, O. C.; SETTA, A.; IMRE, A.; BUKOVINSKI, A.; ELAZOMI, A.; KAISER, P.; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P.; JONES, M. A flagellated motile *Salmonella* Gallinarum mutant (SG Fla+) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 165, n. 3-4, p. 425-433, 2013.

GAL-MOR, O.; BOYLE, E. C.; GRASSL, G. A. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 391, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>>.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition (Release 5.0)**. Springer: New York, 2004. p. 114-124. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>>.

GEWIRTZ, A. T.; NAVAS, T. A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P. J.; MADARA, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 167, n. 4, p. 1882-1885, 2001.

GOLUBEVA, Y. A.; ELLERMEIER, J. R.; CHUBIZ, J. E. C.; SLAUCH, J. M. Intestinal Long-Chain Fatty Acids Act as a Direct Signal To Modulate Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System. **mBio**, Washington, v. 7, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02170-15>>.

GONZALO-ASENSIO, J.; ORTEGA, A. D.; RICO-PÉREZ, G.; PUCCIARELLI, M. G.; GARCÍA-DEL PORTILLO, F. A novel antisense RNA from the *Salmonella* virulence plasmid pSLT expressed by non-growing bacteria inside eukaryotic cells. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 10, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077939>>.

GREENWOOD, P.E.; NIKULIN, M.S. **A Guide to Chi-Squared Testing**. New York: John Wiley & Sons, 1996, p. 280.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). ***Salmonella in Domestic Animals***. 1. ed. Oxon: CABI Publishing, 2000. cap. 1, p. 1-17.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars." **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**, Institut Pasteur, Paris, France, 2007.

GROVE, J.; TANAPONGPIPAT, S.; THOMAS, G.; GRIFFITHS, L.; CROOKE, H.; COLE, J. *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of c-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 367-381, 1996.

HAPFELMEIER, S.; STECHER, B.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; MÜLLER, A. J.; HEIKENWALDER, M.; STALLMACH, T.; HENSEL, M.; PFEFFER, K.; AKIRA, S.; HARDT, W. D. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 174, n. 3, p. 1675-1685, 2005.

HE, G.; SHANKAR, R. A.; CHZHAN, M.; SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J. L. Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 8, p. 4586-4591, 1999.

HENDERSON, S. C.; BOUNOUS, D. I.; LEE, M. D. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 7, p. 3580-3586, 1999.

HOLT, K. E.; THOMSON, N. R.; WAIN, J.; LANGRIDGE, G. C.; HASAN, R.; BHUTTA, Z. A.; QUAIL, M. A.; NORBERTCZAK, H.; WALKER, D.; SIMMONDS, M.; WHITE, B.; BASON, N.; MUNGALL, K.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J. Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 36, 2009. Disponível em: <dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-36>.

IQBAL, M.; PHILBIN, V. J.; WITHANAGE, G. S.; WIGLEY, P.; BEAL, R. K.; GOODCHILD, M. J.; BARROW, P.; MCCONNELL, I.; MASKELL, D. J.; YOUNG, J.; BUMSTEAD, N.; BOYD, Y.; SMITH, A. L. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 4, p. 2344-2350, 2005.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014.

JANAKIRAMAN, A.; SLAUCH, J. M. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 1146-1155, 2000.

JONES, M. A.; WIGLEY, P.; PAGE, K. L.; HULME, S. D.; BARROW, P. A. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5471-5476, 2001.

JONES, Y. E.; MCLAREN, I. M.; WRAY, C. Laboratory Aspects of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). **Salmonella in Domestic Animals**. 1. ed. Oxon: CABI Publishing, 2000. cap. 23, p. 393-405.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology**, Reading, v. 146, p. 3217–3226, 2000.

KAISER, P.; STÄHELI, P. Avian cytokines and Chemokines. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian Immunology**. 1. ed. Londres: Academic Press, 2008. cap. 10, p. 203-222.

KANG, M. S.; KWON, Y. K.; KIM, H. R.; OH, J. Y.; KIM, M. J.; AN, B. K.; SHIN, E. G.; KWON, J. H.; PARK, C. K. Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 160, n. 3-4, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.041>>.

KANG, M. S.; KWON, Y. K.; KIM, H. R.; OH, J. Y.; KIM, M. J.; AN, B. K.; SHIN, E. G.; KWON, J. H.; PARK, C. K. Comparative proteome and transcriptome analyses of wild-type and live vaccine strains of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Vaccine**, Amsterdam, v. 30, n. 45, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.048>>.

KEESTRA-GOUNDER, A. M.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. Now you see me, now you don't: the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. **Nature reviews – Microbiology**, London, v. 13, n. 4, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3428>>.

KOGUT, M. H.; GENOVESE, K. J.; HE, H.; KAISER, P. Flagellin and lipopolysaccharide up-regulation of IL-6 and CXCLi2 gene expression in chicken heterophils is mediated by ERK1/2-dependent activation of AP-1 and NF-kappaB signaling pathways. **Innate immunity**, Los Angeles, v. 14, n. 4, p. 213-222, 2008.

KWON, H. J.; PARK, K. Y.; YOO, H. S.; PARK, J. Y.; PARK, Y. H.; KIM, S. J. Differentiation of *Salmonella enterica* serotype gallinarum biotype pullorum from biotype gallinarum by analysis of phase 1 flagellin C gene (fliC). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 33-38, 2000.

LANGRIDGE, G. C.; FOOKES, M.; CONNOR, T. R.; FELTWELL, T.; FEASEY, N.; PARSONS, B. N.; SETH-SMITH, H. M.; BARQUIST, L.; STEDMAN, A.; HUMPHREY, T.; WIGLEY, P.; PETERS, S. E.; MASKELL, D. J.; CORANDER, J.; CHABALGOITY, J. A.; BARROW, P.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; THOMSON, N. R. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 112, n. 3, 2015. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1073/pnas.1416707112](http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1416707112)>.

LAWRENCE, J. G.; HENDRICKSON, H. Genome evolution in bacteria: order beneath chaos. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 8, n. 5, p. 572-578, 2005.

LI, J.; SMITH, N. H.; NELSON, K.; CRICHTON, P. B.; OLD, D. C.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 38, n. 2, p. 129-139, 1993.

LIU, G. R.; RAHN, A.; LIU, W. Q.; SANDERSON, K. E.; JOHNSTON, R. N.; LIU, S. L. The evolving genome of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 10, p. 2626-2633, 2002.

LOPES, P. D.; FREITAS NETO, O. C.; BATISTA, D. F. A.; DENADAI, J.; ALARCON, M. F. F.; ALMEIDA, A. M.; VASCONCELOS, R. O.; SETTA, A.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JUNIOR, A. Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. **Veterinary Journal**, Londres, v. 214, 2016. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.05.006](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.05.006)>.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 2, p. 145-156, 2000.

MARIANI, P.; BARROW, P. A.; CHENG, H. H.; GROENEN, M. M.; NEGRINI, R.; BUMSTEAD, N. Localization to chicken chromosome 5 of a novel locus determining salmonellosis resistance. **Immunogenetics**, Nova York, v. 53, n. 9, p. 786-791, 2001.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S. W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SUN, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R. K. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, London, v. 413, n. 6858, p. 852-856, 2001.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; CLIFTON, S. W.; LATREILLE, P.; PORWOLLIK, S.; SABO, A.; MEYER, R.; BIERI, T.; OZERSKY, P.; MCLELLAN, M.; HARKINS, C. R.; WANG, C.; NGUYEN, C.; BERGHOFF, A.; ELLIOTT, G.; KOHLBERG, S.; STRONG, C.; DU, F.; CARTER, J.; KREMIZKI, C.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; SUN, H.; FULTON, L.; NASH, W.; MINER, T.; MINX, P.; DELEHAUNTY, K.; FRONICK, C.; MAGRINI, V.; NHAN, M.; WARREN, W.; FLOREA, L.; SPIETH, J.; WILSON, R. K. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. **Nature Genetics**, New York, v. 36, n. 21, p. 1268-1274, 2004.

MITRA, A.; ŁANIEWSKI, P.; CURTISS 3<sup>rd</sup>, R.; ROLAND, K. L. A Live Oral Fowl Typhoid Vaccine with Reversible O-Antigen Production. **Avian Disease**, Kennett Square Pa, v. 59, n. 1, p. 52-56, 2015.

MÜLLER, A. J.; HOFFMANN, C.; GALLE, M.; VAN DEN BROEKE, A.; HEIKENWALDER, M.; FALTER, L.; MISSELWITZ, B.; KREMER, M.; BEYAERT, R.; HARDT, W. D. The *S. Typhimurium* effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. **Cell host and microbe**, Cambridge, v. 6, n. 2, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.07.007>>.

- NAKATA, N.; TOBE, T.; FUKUDA, I.; SUZUKI, T.; KOMATSU, K.; YOSHIKAWA, M.; SASAKAWA, C. The absence of a surface protease, OmpT, determines the intercellular spreading ability of *Shigella*: the relationship between the *ompT* and *kcpA* loci. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 459-468, 1993.
- NJOROGE, J. W.; NGUYEN, Y.; CURTIS, M. M.; MOREIRA, C. G.; SPERANDIO, V. Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **mBio**, Washington, v. 3, n. 5, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00280-12>>.
- NUCCIO, S. P.; BÄUMLER, A. J. Comparative analysis of *Salmonella* genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut. **mBio**, Washington, v. 5, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00929-14>>.
- OCHMAN, H.; WILSON, A. C. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 26, n. 1-2, p. 74-86, 1987.
- OKON, E.; DETHLEFSEN, S.; PELNIKEVICH, A.; BARNEVELD, A. V.; MUNDER, A.; TÜMMLER, B. Key role of an ADP - ribose - dependent transcriptional regulator of NAD metabolism for fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of medical microbiology**, Jena, v. 307, n. 1, p. 83-94, 2017.
- OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, A. C. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 51-56, 2005.
- OLSEN, J. E.; SKOV, M. N.; CHRISTENSEN, J. P.; BISGAARD, M. Genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 45, n. 6, p. 413-418, 1996.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). Fowl typhoid and Pullorum disease. In: OIE (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 7. ed. Paris: OIE, 2012. cap. 2.3.11, p. 538-548.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2017. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K. L.; BENTLEY, S. D.; HOLDEN, M. T.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R. M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T. T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T. S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; O'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. **Nature**, London, v. 413, n. 6858, p. 848-852, 2001.

PARKHILL, J.; SEBAIHIA, M.; PRESTON, A.; MURPHY, L. D.; THOMSON, N.; HARRIS, D. E.; HOLDEN, M. T.; CHURCHER, C. M.; BENTLEY, S. D.; MUNGALL, K. L.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; TEMPLE, L.; JAMES, K.; HARRIS, B.; QUAIL, M. A.; ACHTMAN, M.; ATKIN, R.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BASON, N.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DOGGETT, J.; FELTWELL, T.; GOBLE, A.; HAMLIN, N.; HAUSER, H.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; LEATHER, S.; MOULE, S.; NORBERCZAK, H.; O'NEIL, S.; ORMOND, D.; PRICE, C.; RABBINOWITSCH, E.; RUTTER, S.; SANDERS, M.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; UNWIN, L.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G.; MASKELL, D. J. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Nature Genetics**, New York, v. 35, n. 1, p. 32-40, 2003.

PEEKHAUS, N.; TONG, S.; REIZER, J.; SAIER JUNIOR, M. H.; MURRAY, E.; CONWAY, T. Characterization of a novel transporter family that includes multiple *Escherichia coli* gluconate transporters and their homologues. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 147, n. 2, p. 233-238, 1997.

PENHA FILHO, R. A.; DE PAIVA, J. B.; DA SILVA, M. D.; DE ALMEIDA, A. M.; BERCHIERI JR, A. Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. **Vaccine**, Amsterdam, v. 28, n. 16, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.058>>.

PFÄFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR; L. E. Genus XXIII. *Salmonella* Lignères 1900, 389AL. In: GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York, 2005, p. 764-799.

PORWOLLIK, S.; MCCLELLAND, M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 11, p. 977-989, 2003.

PORWOLLIK, S.; SANTIVIAGO, C. A.; CHENG, P.; FLOREA, L.; JACKSON, S.; MCCLELLAND, M. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 18, p. 6545-6555, 2005.

PROSEDA, G.; DI MARTINO, M. L.; CAMPILONGO, R.; FIORAVANTI, R.; MICHELI, G.; CASALINO, M.; COLONNA, B. Shedding of genes that interfere with the pathogenic lifestyle: the *Shigella* model. **Research in Microbiology**, Paris, v. 163, n. 6-7, p. 399-406, 2012.

RAFFATELLU, M.; WILSON, R. P.; CHESSA, D.; ANDREWS-POLYMERIS, H.; TRAN, Q. T.; LAWHON, S.; KHARE, S.; ADAMS, L. G.; BÄUMLER, A. J. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 1, p. 146-154, 2005.

RAMASAMY, K. T.; VERMA, P.; REDDY, M. R. Toll-like receptors gene expression in the gastrointestinal tract of *Salmonella* serovar Pullorum-infected broiler chicken. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 173, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-0864-8>>.

RETAMAL, P.; CASTILLO-RUIZ, M.; VILLAGRA, N. A.; MORGADO, J.; MORA, G. C. Modified intracellular-associated phenotypes in a recombinant *Salmonella* Typhi expressing *S. Typhimurium* SPI-3 sequences. **PLoS One**, São Francisco, v. 5, n. 2, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009394>>.

RETAMAL, P.; CASTILLO-RUIZ, M.; MORA, G. C. Characterization of MgtC, a Virulence Factor of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. **PLoS one**, São Francisco, v. 4, n. 5, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005551>>.

RIBEIRO, S. A. M.; DE PAIVA, J. B.; ZOTESSO, F.; LEMOS, M. V. F.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 184-188, 2009.

ROHMER, L.; HOCQUET, D.; MILLER, S. I. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. **Trends in microbiology**, Cambridge, v. 19, n. 7, p. 341-348, 2011.

RYCHLIK, I.; ELSHEIMER-MATULOVA, M.; KYROVA, K. Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. **Veterinary Research**, London, v. 45, n. 119, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0119-2>>.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001a. Cap. 6, p. 6.1-6.62.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001b. p. A2.2.

SANDERSON, K. E.; NAIR, S. Taxonomy and Species Concepts in the Genus *Salmonella*. In: BARROW, P. A.; METHNER, U. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. 2. ed. Oxfordshire: CAB International, 2013. cap. 1, p. 1-19.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1813, n. 5, p. 878-888, 2011.

SETTA, A. M.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Exeter, v. 35, n. 5, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.03.004>>.

SETTA, A.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars; bacterial invasion and persistence, nitric oxide and oxygen production, differential host gene expression, NF-κB signalling and cell cytotoxicity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 146, n. 3-4, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.03.008>>.

SHAH, D. H.; PARK, J. H.; CHO, M. R.; KIM, M. C.; CHAE, J. S. Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing *Salmonella* Gallinarum from *Salmonella* Pullorum: serotype-specific *rfbS* sequence polymorphism. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 169-177, 2005.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Pullorum Disease and Fowl Typhoid. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. I.; NAIR, V. L. (Eds.). **Disease of Poultry**. 13. ed. Ames: Wiley-Blackwell Publishing, 2013. cap. 16, p. 678-693.

SIVAPRASAD, H. L.; METHNER, U.; BARROW, P. A. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: BARROW, P. A.; METHNER, U. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. 2. ed. Oxfordshire: CAB International, 2013. cap. 9, p. 162-192.

STERZENBACH, T.; CRAWFORD, R. W.; WINTER, S. E.; BAÜMLER, A. J. *Salmonella* Virulence Mechanisms and their Genetic Basis. In: BARROW, P. A.; METHNER, U. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. 2. ed. Oxfordshire: CAB International, 2013. cap. 5, p. 80-103.

STEVENS, M. P.; HUMPHREY, T. J.; MASKELL, D. J. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, Londres, v. 364, n. 1530, 2009. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1098/rstb.2009.0094](https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0094)>.

TANAPONGPIPAT, S.; REID, E.; COLE, J. A.; CROOKE, H. Transcriptional control and essential roles of the *Escherichia coli* *ccm* gene products in formate-dependent nitrite reduction and cytochrome c synthesis. **The Biochemical Journal**, Londres, v. 334, n. 2, p. 355-365, 1998.

TANG, Y. **Immune modulation of *Salmonella enterica* serotype Pullorum in the chicken**. 2016. 249 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). – School of Veterinary Medicine and Science, Sutton Bonington, 2016.

THOMSON, N. R.; CLAYTON, D. J.; WINDHORST, D.; VERNIKOS, G.; DAVIDSON, S.; CHURCHER, C.; QUAIL, M. A.; STEVENS, M.; JONES, M. A.; WATSON, M.; BARRON, A.; LAYTON, A.; PICKARD, D.; KINGSLEY, R. A.; BIGNELL, A.; CLARK, L.; HARRIS, B.; ORMOND, D.; ABDELLAH, Z.; BROOKS, K.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; WOODWARD, J.; NORBERCZAK, H.; LORD, A.; ARROWSMITH, C.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; SANDERS, M.; WHITEHEAD, S.; CHABALGOITY, J. A.; MASKELL, D.; HUMPHREY, T.; ROBERTS, M.; BARROW, P. A.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome Research**, New York, v. 18, n. 10, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gr.077404.108>>.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, London, v. 3, n. 7, 2002. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1>>.

VAZQUEZ-TORRES, A.; XU, Y.; JONES-CARSON, J.; HOLDEN, D. W.; LUCIA, S. M.; DINAUER, M. C.; MASTROENI, P.; FANG, F. C. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. **Science**, New York, v. 287, n. 5458, p. 1655-1658, 2000.

WATERMAN, S. R.; HOLDEN, D. W. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 8, p. 501-511, 2003.

WIGLEY, P.; BERCHIERI JUNIOR, A.; PAGE, K. L.; SMITH, A. L.; BARROW, P. A. *Salmonella enterica* serovar Pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7873-7879, 2001.

WIGLEY, P.; HULME, S. D.; POWERS, C.; BEAL, R. K.; BERCHIERI JR, A. SMITH, A.; BARROW, P. Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar Pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 5, p. 2986-2990, 2005a.

WIGLEY, P.; HULME, S.; POWERS, C.; BEAL, R.; SMITH, A.; BARROW, P. Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. **BMC Veterinary Research**, Londres, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2005b.

WIGLEY, P.; HULME, S.; ROTHWELL, L.; BUMSTEAD, N.; KAISER, P.; BARROW, P. Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 2, p. 1425-1430, 2006.

WINTER, S. E.; THIENNIMITR, P.; WINTER, M. G.; BUTLER, B. P.; HUSEBY, D. L.; CRAWFORD, R. W.; RUSSELL, J. M.; BEVINS, C. L.; ADAMS, L. G.; TSOLIS, R. M.; ROTH, J. R.; BÄUMLER, A. J. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature**, Londres, v. 467, n. 7314, p. 426-429, 2010.

WU, K. Y.; LIU, G. R.; LIU, W. Q.; WANG, A. Q.; ZHAN, S.; SANDERSON, K. E.; JOHNSTON, R. N.; LIU, S. L. The genome of *Salmonella enterica* serovar gallinarum: distinct insertions/deletions and rare rearrangements. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 14, p. 4720-4727, 2005.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 13, n. 134, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>>.

## APÊNDICES

Apêndice A: Alinhamento das sequências de nucleotídeos das CDS dos genes *ccmH* no cromossomo de SG287/91.

```

ccmH(1) ATGAGACTGTTACCGGGCATGGTGATGCTGATGCTGGTGTCTGGTTATCTCCGGGTGACGCGGG 64
ccmH(2) ATGAGACTGTTACCGGGCATGGTGATGCTGATGCTGGTGTCTGGTTATCTCCGGGTGACGCGGG 64
ccmH(1) CGACCACCGACGTGATGCCGTTTTAAAGATGAAGCGCAGGAGCAGCAGTTCCGCCAGCTCACGGA 128
ccmH(2) CGACCACCGACGTGATGCCGTTTTAAAGATGAAGCGCAGGAGCAGCAGTTCCGCCAGCTCACGGA 128
ccmH(1) GCAGCTGCGCTGCCCGAAAATGCCAGAACAACAGCATTGCGGACTCGAACGCGATGATAGCCACC 192
ccmH(2) GCAGCTGCGCTGCCCGAAAATGCCAGAACAACAGCATTGCGGACTCGAACGCGATGATAGCCACC 192
ccmH(1) GACATGCGCCGCAGGGTGTATGACCTGATGTCAGGAGGGGAAGAGCCGCCAGGAAATCATCGATT 256
ccmH(2) GACATGCGCCGCAGGGTGTATGACCTGATGTCAGGAGGGGAAGAGCCGCCAGGAAATCATCGATT 256
ccmH(1) ACATGGTGGCGCGCTACGGCAACTTCGTACCTACGACCCGCGCTGACCCCGCTGACCCCGCT 320
ccmH(2) ACATGGTGGCGCGCTACGGCAACTTCGTACCTACGACCCGCGCTGACCCCGCTGACCCCGCT 320
ccmH(1) GACGGTGTCTGTGTGGGTGCTGCCGCTGGCCGCCATCGTGGCGGGCGGGTGGATAATCGTTGCC 384
ccmH(2) GACGGTGTCTGTGTGGGTGCTGCCGCTGGCCGCCATCGTGGCGGGCGGGTGGATAATCGTTGCC 384
ccmH(1) CGCACGCGCCGGCGGGTGC GCCTGCGCCGGGAGCCGCTGCCGGCGGACACCCCGGTTTGCGGGC 448
ccmH(2) CGCACGCGCCGGCGGGTGC GCCTGCGCCGGGAGCCGCTGCCGGCGGACACCCCGGTTTGCGGGC 448
ccmH(1) CGCGCGCCGGGTGGGGCGTTTTACGTGCCGGGGGCCGTCATTGCGCTGGCGGTGCGCGCCGGCAG 512
ccmH(2) CGCGCGCCGGGTGGGGCGTTTTACGTGCCGGGGGCCGTCATTGCGCTGGCGGTGCGCGCCGGCAG 512
ccmH(1) CTACGCCCTGACCGGCAGCTATCAGCAGGTCAGGGCCTGGCAGCAGGCAACGGCGCAGACGCC 576
ccmH(2) CTACGCCCTGACCGGCAGCTATCAGCAGGTCAGGGCCTGGCAGCAGGCAACGGCGCAGACGCC 576
ccmH(1) GGGCTGTCTGGCGCGGGCGCTGGACCCGGCGGCGCAGCCGCTGAATGAAGAGGAGATGGCGCGGC 640
ccmH(2) GGGCTGTCTGGCGCGGGCGCTGGACCCGGCGGCGCAGCCGCTGAATGAAGAGGAGATGGCGCGGC 640
ccmH(1) TGGCGCTGGGGCTGCGCACCCGCTGCAGAATGATGCCGGCAATGTTGAGGGCTGGCTCATGCT 704
ccmH(2) TGGCGCTGGGGCTGCGCACCCGCTGCAGAATGATGCCGGCAATGTTGAGGGCTGGCTCATGCT 704
ccmH(1) GGGGCGCACCGGTATGGTACTGGGTAA TGCCGGTACCGCCACCGGGCCTATGCGAACGCCTAC 768
ccmH(2) GGGGCGCACCGGTATGGTACTGGGTAA TGCCGGTACCGCCACCGGGCCTATGCGAACGCCTAC 768
ccmH(1) CGCCTGGACCCGAAAAACAGCGATGCGGCGCTGGGCTACGCGGAGGCGCTGACGCGCTCGTCCG 832
ccmH(2) CGCCTGGACCCGAAAAACAGCGATGCGGCGCTGGGCTACGCGGAGGCGCTGACGCGCTCGTCCG 832
ccmH(1) ACCCGGAGGATAACCGCGGCGGCGGGGAGCTGCTGCGTCAGCTGGTGAGAAGTGACCACACGGA 896
ccmH(2) ACCCGGAGGATAACCGCGGCGGCGGGGAGCTGCTGCGTCAGCTGGTGAGAAGTGACCACACGGA 896
ccmH(1) TATCCGGGTGTTAAGCCTGTATGCGTTCAGCGCCTTTGAGCAGCAGCGTTTTGGCGAGGCGGTG 960
ccmH(2) TATCCGGGTGTTAAGCCTGTATGCGTTCAGCGCCTTTGAGCAGCAGCGTTTTGGCGAGGCGGTG 960
ccmH(1) GCGGCCTGGGAGATGATGCTGAAACTGCTGCCGGCGGGTGACGCCCGGCGGGCGGTGATAGAGC 1024
ccmH(2) GCGGCCTGGGAGATGATGCTGAAACTGCTGCCGGCGGGTGACGCCCGGCGGGCGGTGATAGAGC 1024
ccmH(1) GCAGTATCCGGCTGGCGCAGGAGAAATAA 1053
ccmH(2) GCAGTATCCGGCTGGCGCAGGAGAAATAA 1053

```

Figura A1. Alinhamento de ambas as CDS dos genes *ccmH* (*ccmH*(1) e *ccmH*(2)) presentes no cromossomo de SG287/91. A similaridade das sequências é de 100%.

Apêndice B: Detalhamento do método utilizado nesse estudo para a análise das curvas de multiplicação bacteriana.

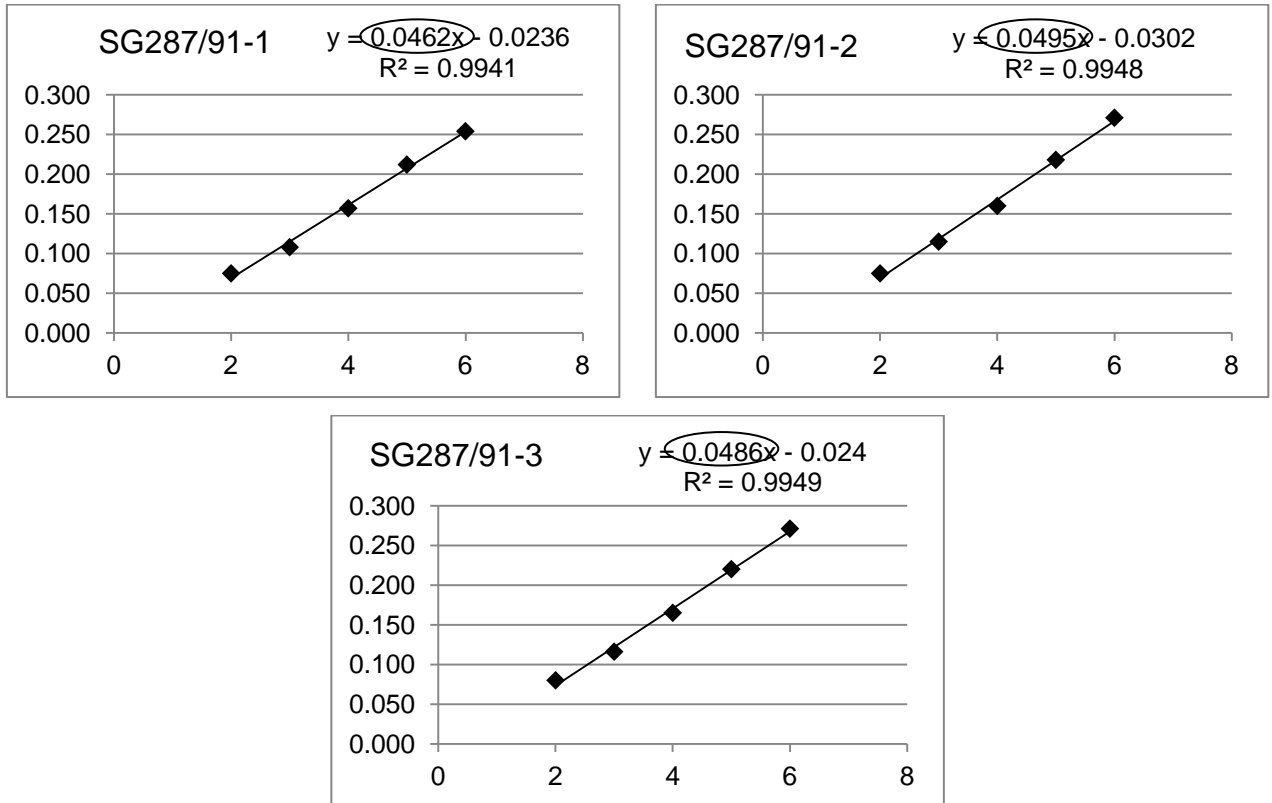


Figura B1. A figura acima mostra as fases exponenciais de multiplicação obtidas em três culturas independentes de SG287/91. Os coeficientes angulares destacados pelo círculo preto. Esses foram os valores utilizados na análise estatística.