

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da invasão celular, sobrevivência em macrófagos,
motilidade e prevalência dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2* em
linhagens de *Salmonella* Dublin isoladas no Brasil**

Felipe Pinheiro Vilela

**Ribeirão Preto
2018**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da invasão celular, sobrevivência em macrófagos,
motilidade e prevalência dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2* em
linhagens de *Salmonella* Dublin isoladas no Brasil**

Trabalho de Conclusão de Curso

Área: Microbiologia

Orientado: Felipe Pinheiro Vilela

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

**Ribeirão Preto
2018**

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.”

(John F. Kennedy)

Agradecimentos

À Deus pela proteção, força e amparo espiritual no decorrer de toda minha vida e principalmente durante todo o decorrer do curso.

À minha mãe Adriana, meu pai Sandro, minha irmã Flávia, minhas avós Darci e Jeannette e minha tia Débora, pela criação, pelo carinho, pela compreensão nos momentos de dificuldade e de ausência, pelos momentos de oração durante toda a minha vida e em especial durante a graduação, e principalmente por terem sempre acreditado em mim e nas minhas escolhas. Eu amo vocês.

Ao meu avô José e minha bisavó Nair, cujo sonho era me verem nesta Universidade e presenciar minha graduação. Hoje sei que de outro lugar vocês verão isso, comemorarão comigo e sempre me protegerão. Meu amor eterno a vocês.

À Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão por ter me proporcionado estes anos de experiência e aprendizado em seu laboratório, pela formação científica e profissional, e pelo carinho, paciência, confiança e amizade durante as minhas Iniciações Científicas. Muito obrigado.

Ao Dr. Fábio Campioni, meu primeiro orientador, pela paciência, orientação, instrução e ensinamentos ao longo dos meus projetos, e pelo carinho e amizade ao longo desses anos. Muito obrigado.

À Carolina Nogueira Gomes, pela parceria, pela participação e ajuda na cultura de células deste projeto, e pela amizade, paciência e companheirismo desde a disciplina de Microbiologia.

À Jaqueline Passaglia pelo apoio técnico, auxílio durante meus dois projetos e pela grande amizade durante meu período no laboratório;

Aos amigos e colegas do laboratório Amanda, Beatriz, Júlia, Miliane e Priscilla pelo pela amizade, pelos bons momentos e companheirismo ao longo dos anos;

À Vânia Cláudia de Albuquerque pelos auxílios e pela amizade durante todo esse período;

À Sueli Aparecida Fernandes e Monique Tiba Casas, pesquisadoras do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, e à Dália dos Prazeres Rodrigues e Renata Garcia Costa, pesquisadoras da Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro, por terem cedido as linhagens de *Salmonella* Dublin isoladas de humanos e animais utilizadas nesse estudo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas de Iniciação Científica (Proc. 2015/10818-6 e Proc. 2017/05756-7) e pelo suporte financeiro desse projeto de pesquisa, bem como por todo o suporte financeiro ao laboratório;

Aos meus amigos da faculdade Adrienne, Amanda, Gabriel, Beatriz, Erick, Izadora, Juliane, Karen e Leticia, pelos momentos felizes e pelos tristes, pela incrível e eterna amizade, pela parceria, e por serem meu porto seguro durante todo o curso. Muito obrigado.

Finalmente agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização desse trabalho.

Este trabalho foi realizado no seguinte laboratório de pesquisa:

Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP/USP).

SUMÁRIO

Resumo -----	8
Introdução -----	10
Proposição -----	15
Materiais e Métodos -----	17
Resultados -----	25
Discussão -----	30
Conclusões -----	35
Referências -----	37

1. RESUMO

Salmonella Dublin é uma sorovariedade fortemente adaptada que pode causar enterite e/ou doença sistêmica em bovinos com altos índices de mortalidade. Entretanto, ela pode ser isolada de humanos onde causa doença geralmente grave, podendo ser fatal. Diferentemente de *S. Dublin*, infecções na corrente sanguínea causadas por outras sorovariedades não-tifóides não são comuns. No entanto, na África Subsaariana, linhagens de *Salmonella* Typhimurium pertencentes ao ST 313 estão entre os patógenos mais comumente relacionados a essas infecções. Um possível marcador de virulência encontrado nas linhagens do ST 313, o gene *st313-td*, interessantemente não está presente nas linhagens de *S. Typhimurium* de outros STs, porém está uniformemente presente em linhagens de *S. Dublin*. Esse estudo tem como objetivo verificar a prevalência dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2*, a motilidade e a capacidade de invasão a células epiteliais e sobrevivência em macrófagos em linhagens de *Salmonella* Dublin isoladas no Brasil. Para isso, 113 linhagens de *Salmonella* Dublin isoladas de humanos e animais no Brasil entre 1983 e 2016 foram pesquisadas quanto à presença dos genes *st-313td*, *fliC* e *sopE2* por PCR. Entre estas, 20 linhagens de *Salmonella* Dublin foram selecionadas para verificação da invasão a células Caco-2 e invasão e sobrevivência em macrófagos humanos (U937). Ademais, a motilidade para estas 20 linhagens também foi verificada através da formação de halo em ágar semi-sólido. Todas as linhagens de *S. Dublin* estudadas apresentaram os genes *st-313td*, *fliC* e *sopE2*. A taxa de invasão a células Caco-2 verificada nas linhagens estudadas foi entre 53.97 a 88.88% em relação ao inóculo inicial. Em relação à sobrevivência em macrófagos U937, as linhagens de *S. Dublin* apresentaram uma taxa de sobrevivência entre 72.90 a 98.08% em relação ao inóculo inicial. As linhagens apresentaram baixa motilidade, sendo que 15 não apresentaram formação de halo. Esses resultados sugerem que a presença uniforme dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2* nas linhagens de *Salmonella* Dublin estudadas pode ser fundamental para que esta sorovariedade cause doença invasiva em humanos e bovinos no Brasil. Ademais, as altas taxas de invasão e sobrevivência das linhagens de *S. Dublin* em células epiteliais Caco-2 e macrófagos U937 de humanos, além das baixas taxas de motilidade verificadas, reforçam a capacidade de tais linhagens causarem doença invasiva em seres humanos no Brasil.

INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

A salmonelose decorrente da infecção por sorovariedades não-tifóides está entre as infecções causadas por alimentos mais comuns no mundo, com uma estimativa de 93,8 milhões de casos de gastroenterite levando a 155 mil mortes anualmente (Majowicz *et al.*, 2010).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é composto por bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, geralmente flagelados. A classificação sorológica de *Salmonella* é baseada na identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), este último quando presente. Tais antígenos definem a sorovariedade (Guibourdenche *et al.*, 2010).

Atualmente, esse gênero é subdividido em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A primeira espécie, *S. enterica* é subdividida em seis grupos ou subespécies que compreendem 2659 sorovariedades, sendo que quase todas as sorovariedades patogênicas para o homem estão incluídas no grupo I, também denominado de subespécie *enterica*. A segunda espécie, *S. bongori* compreende 22 sorovariedades e é isolada, sobretudo, de animais de sangue frio e do ambiente (Uzzau *et al.*, 2000; Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014).

Apesar da alta similaridade genética entre as sorovariedades de *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, elas diferem significativamente quanto aos hospedeiros que infectam, bem como quanto à doença que causam (Uzzau *et al.*, 2000; Betancor *et al.*, 2012).

As sorovariedades ubiqüitárias, como por exemplo, Enteritidis e Typhimurium, em geral causam infecções gastrointestinais auto-limitada em uma ampla gama de hospedeiros. As hospedeiro-restritas, como por exemplo, Typhi em humanos e Gallinarum em galinhas, causam doença sistêmica severa em seus hospedeiros específicos. Finalmente, as hospedeiro-adaptadas, como por exemplo, Choleraesuis e Dublin, causam doença sistêmica severa em porcos e gado, respectivamente, porém esporadicamente causam doença em outros mamíferos incluindo humanos (Uzzau *et al.*, 2000; Betancor *et al.*, 2012).

Salmonella Dublin (*S. Dublin*) é uma sorovariedade fortemente adaptada a bovinos, porém esporadicamente causa doença em humanos. As linhagens dessa sorovariedade são altamente invasivas em comparação a outras sorovariedades não-tifóides, sendo reportadas mundialmente com índices de invasão maiores do que 40%, enquanto os índices das sorovariedades mais isoladas, como

Typhimurium e Enteritidis, raramente excedem 5% (Tablante e Lane, 1989; Uzzau *et al.*, 2000; Munang'andu *et al.*, 2012; Pezoa *et al.*, 2014; Yim *et al.*, 2014).

Em geral, tanto em bovinos quanto em humanos *Salmonella* Dublin causa infecções graves podendo levar a morte. Em bovinos a doença é caracterizada por febre, anorexia e redução abrupta na produção de leite rapidamente seguida de diarreia severa, além de pneumonia, artrite, osteomielite e meningoencefalite levando a altos níveis de mortalidade. Outras manifestações clínicas incluem doença semelhante à febre tifoide e geralmente resulta em um hospedeiro carreador crônico assintomático, excretando o microrganismo nas fezes por anos e, em alguns casos, durante toda a vida (Uzzau *et al.*, 2000; Nielsen, 2013; Pezoa *et al.*, 2014).

Em humanos, a infecção por *S. Dublin* geralmente é grave e pode ser fatal, especialmente em pacientes com doenças crônicas subjacentes, que em alguns casos causa uma doença indistinguível da febre tifoide. Os fatores bacterianos de *S. Dublin* responsáveis por essa característica invasiva em humanos são desconhecidos (Uzzau *et al.*, 2000; Betancor *et al.*, 2012; Nielsen, 2013; Yim *et al.*, 2014).

Diferentemente de *S. Dublin*, infecções na corrente sanguínea ou infecções focais causadas por outras sorovarietades não-tifóides não são comuns e, em países desenvolvidos, geralmente ocorrem em indivíduos com fatores de risco específicos. Já em países em desenvolvimento, essas sorovarietades frequentemente causam doença severa, infecções invasivas e até mesmo morte, especialmente em crianças com doenças subjacentes ou entre adultos HIV positivos. Na África Subsaariana, salmonelas não-tifóides estão entre os patógenos mais comumente relacionados com doença invasiva, causando bacteremia e meningite com uma taxa de mortalidade de 20 a 25% (Gilks *et al.*, 1990; Hohmann, 2001; Berkley *et al.*, 2005; Gordon, 2008; Gordon *et al.*, 2008; Sigaúque *et al.*, 2009; Graham, 2010; Feasey *et al.*, 2012; Leekitcharoenphon *et al.*, 2013; Herrero-Fresno *et al.*, 2014).

Entre as sorovarietades não-tifóides causadoras de infecções invasivas na África Subsaariana, *Salmonella* Typhimurium é responsável por uma significativa proporção dos relatos dessas infecções, sendo que linhagens pertencentes a um específico *MultiLocus Sequence Type* (MLST), o ST 313, têm sido relacionadas a maioria dessas infecções (Kingsley *et al.*, 2009; Feasey *et al.*, 2012; Leekitcharoenphon *et al.*, 2013; Herrero-Fresno *et al.*, 2014). Importante ressaltar

que linhagens desse ST raramente são isoladas fora da África, porém, foram recentemente detectadas no Brasil pelo nosso grupo de estudo (Almeida et al., 2010).

A análise genômica de linhagens de *Salmonella* Typhimurium pertencentes ao ST313 demonstrou que essas linhagens possuem um repertório de profagos distintos, bem como um elemento Tn21 único que codifica múltiplos genes de resistência no plasmídeo associado à virulência. Além disso, verificou-se uma degradação genômica significativa, acima da observada em linhagens do ST19, sendo que alguns desses genes degradados são também não funcionais em linhagens de sorovariedades tifóides como *S. Typhi* e *Paratyphi A*. Baseado nesses dados, tem sido proposto que linhagens do ST313 que causam doença sistêmica estão evoluindo da mesma forma como sorovariedades tifóides para se tornarem mais hospedeiro-adaptadas (Kingsley et al., 2009; Carden et al., 2015).

Além disso, um possível marcador de virulência foi encontrado nas linhagens de *S. Typhimurium* do ST 313, o então chamado gene *st313-td*. Interessantemente, esse gene não está presente nas linhagens de *S. Typhimurium* de outros STs, mais associados a diarreia, porém está uniformemente presente em linhagens da sorovariedade Dublin, geralmente relacionadas a doença invasiva em humanos e bovinos (Leekitcharoenphon et al., 2013; Herrero-Fresno et al., 2014).

Até o momento não se sabe exatamente qual a função do gene *st313-td* tanto em linhagens da sorovariedade Typhimurium quanto nas da sorovariedade Dublin, porém um único estudo realizado com algumas linhagens da sorovariedade Typhimurium demonstraram que linhagens mutantes nocautes para o gene *st313-td* tiveram sua capacidade de sobrevivência em macrófagos alterada, o que pode ajudar a explicar a diferente característica dessas linhagens uma vez que para causar doença invasiva é necessário sobreviver em macrófagos. Ademais, linhagens de *S. Typhimurium* do ST313 demonstraram níveis menores de invasão a células epiteliais humanas do que as do ST19, relacionadas à diarreia, bem como menor expressão do antígeno flagelar, relacionado com ativação da resposta inflamatória no hospedeiro (Carden et al., 2015).

Diferentemente do gene *st313-td*, outros genes de virulência já amplamente estudados em linhagens de *Salmonella* também são responsáveis por influenciar processos de invasão e sobrevivência celular. O gene *fliC* é um dos responsáveis por codificar a flagelina, uma proteína antigênica responsável pela formação de

flagelo em linhagens de *Salmonella*, que está intimamente ligado ao desencadeamento da resposta inflamatória em células humanas (Itoh *et al.*, 1997; Yim *et al.*, 2014; Carden *et al.*, 2015). Já o gene *sopE2* é responsável por codificar uma proteína de mesmo nome, associada à ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella* (SPI-1), e está relacionado à invasão em células fagocíticas e não-fagocíticas (Bakshi *et al.*, 2010; Hur *et al.*, 2010, Carden *et al.*, 2015). No entanto, a prevalência destes genes não foi elucidada em linhagens da sorovariedade Dublin isoladas no Brasil.

Pelo nosso conhecimento, nenhum estudo foi realizado até o momento para verificar a frequência dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2*, a capacidade de invasão a células epiteliais intestinais e sobrevivência em macrófagos de humanos de linhagens de *S. Dublin* isoladas no Brasil, o que permitiria uma melhor caracterização de linhagens dessa sorovariedade de importância clínica tão pouco estudada no país quanto às suas características invasivas.

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo geral verificar a prevalência dos genes *st313-td*, *sopE2* e *fliC* em linhagens de *Salmonella* Dublin isoladas no Brasil. Ademais, a motilidade, a capacidade de invasão a células epiteliais e a sobrevivência em macrófagos de humanos de linhagens dessa sorovariedade será verificada.

Dentre os objetivos específicos realizados estão:

- 1- Verificar a prevalência dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2* por PCR em 113 linhagens de *S. Dublin*, isoladas de animais e humanos no Brasil;
- 2- Verificar a capacidade de invasão a células epiteliais de intestino humano (Caco-2) de 20 *S. Dublin* selecionadas entre as 113 linhagens estudadas;
- 3- Verificar a capacidade de sobrevivência em macrófagos humanos (U937) de 20 *S. Dublin* selecionadas entre as 113 linhagens;
- 4- Verificar a presença de flagelo pelo teste de motilidade nas 20 linhagens de *S. Dublin* utilizadas nos ensaios de invasão a células epiteliais Caco-2 e sobrevivência em macrófagos U937;

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Linhagens bacterianas

Foram estudadas 113 linhagens (Tabela 1) de *Salmonella* Dublin, 83 isoladas de humanos e 30 de animais no Brasil entre 1983 e 2016, provenientes do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL-SP) e de Ribeirão Preto (IAL-RP) e da Coleção de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ). Ademais, a linhagem de *Salmonella* Typhi ATCC 19430, relacionada à doença sistêmica em humanos, e duas linhagens de *Salmonella* Typhimurium, uma pertencente ao ST313 e outra ao ST19, foram incluídas para fins de comparação.

Para os ensaios de motilidade, invasão a células epiteliais Caco-2 e sobrevivência em macrófagos U937, foram selecionadas 20 linhagens de *S. Dublin* entre as 113 linhagens previamente estudadas, representativas dos anos, fonte (humanos ou animais) e material de isolamento (casos invasivos e não-invasivos). As 20 linhagens selecionadas estão marcadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Ano, estado, material e fonte de isolamento das 113 linhagens de *Salmonella* Dublin estudadas, isoladas de humanos (83) e animais (30) no Brasil.

Linhagem	Ano	Estado	Material	Fonte
4891*	1983	SP	Líquor	Humano
1351	1984	SP	Sangue	Humano
1391	1984	SP	Sangue	Humano
1847	1984	SP	Sangue	Humano
288	1985	SP	Fezes	Humano
290*	1985	SP	Sangue	Humano
21	1987	SP	Sangue	Humano
312*	1987	SP	Vesícula biliar	Humano
762	1987	SP	Sangue	Humano
775	1987	SP	Líquor	Humano
1164	1987	SP	Sangue	Humano
67*	1988	SP	Secreção	Humano
81	1988	SP	Sangue	Humano
155	1988	SP	Sangue	Humano
576	1988	SP	Sangue	Humano
379	1989	SP	Fezes	Humano
107*	1990	SP	Sangue	Humano
114	1990	SP	Líquor	Humano

115	1990	SP	Sangue	Humano
136	1990	SP	Líquor	Humano
137	1990	SP	Sangue	Humano
484	1990	SP	Sangue	Humano
517	1990	SP	Sangue	Humano
530	1990	SP	Sangue	Humano
87	1991	SP	Fezes	Humano
90	1991	SP	Sangue	Humano
99	1991	SP	Urina	Humano
534	1991	SP	Líquido hepático	Humano
535	1991	SP	Sangue	Humano
557*	1991	SP	Sangue	Humano
741	1991	SP	Sangue	Humano
749	1991	SP	Líquido ascítico	Humano
750	1991	SP	Sangue	Humano
383	1992	SP	Sangue	Humano
595*	1992	SP	Origem animal (suíno)	Animal
721	1992	SP	Fezes	Humano
722	1992	SP	Sangue	Humano
731	1992	SP	Sangue	Humano
747	1992	SP	Secreção	Humano
1019	1993	SP	Urina	Humano
1032	1993	SP	Sangue	Humano
7362	1993	SP	Líquor	Humano
1030	1994	SP	Sangue	Humano
1048	1994	SP	Sangue	Humano
1053	1994	SP	Sangue	Humano
607*	1995	SP	Escarro	Humano
625	1995	SP	Sangue	Humano
137	1996	RJ	Fezes-bovino	Animal
2411	1997	RJ	Bovino	Animal
2413	1997	RJ	Bovino	Animal
2414	1997	RJ	Bovino	Animal
2415	1997	RJ	Fezes-bovino	Animal
2416	1997	RJ	Bovino	Animal
2417	1997	RJ	Bovino	Animal
2418*	1997	RJ	Bovino	Animal
2419	1997	RJ	Bovino	Animal
2420	1997	RJ	Bovino	Animal
8207	1997	SP	Fezes	Humano
519	1998	SP	Sangue	Humano

536	1998	SP	Sangue	Humano
557	1998	SP	Sangue	Humano
558	1998	SP	Sangue	Humano
559*	1998	SP	Sangue	Humano
571	1998	SP	Sangue	Humano
595	1998	SP	Sangue	Humano
600	1998	SP	Sangue	Humano
883	1998	RJ	Cerebro camundongo	Animal
884	1998	RJ	Cerebro camundongo	Animal
885	1998	RJ	Cerebro bovino	Animal
2554	1998	RJ	Bovino	Animal
2566	1998	MG	Fezes-bovino	Animal
5564	1998	RJ	Fígado de bovino	Animal
760	1999	CE	Humana	Humano
761	1999	CE	Humana	Humano
1338	1999	DF	Humana	Humano
1653*	1999	RS	Bovinos	Animal
1654	1999	RS	Bovinos	Animal
2439	1999	DF	Humana	Humano
3099	2003	RJ	Fezes (Bovino)	Animal
3100	2003	RJ	Swab reto (Bovino)	Animal
3101*	2003	RJ	Cérebro bovino	Animal
5812	2003	MG	Bovino	Animal
6185	2003	GO	Javali (Pulmão)	Animal
8543	2003	SP	Sangue	Humano
8923	2003	GO	Sangue	Humano
8924	2003	GO	Sangue	Humano
5318	2004	RJ	Sangue	Humano
5319	2004	RJ	Sangue	Humano
5320*	2004	RJ	Sangue	Humano
5321	2004	RJ	Humana	Humano
903	2005	RJ	Humana	Humano
3638	2005	DF	Sangue	Humano
3639	2005	DF	Secreção Quadril	Humano
3640	2005	DF	Sangue	Humano
4271	2005	RJ	Sangue Periférico	Humano
14847*	2005	RS	Bovino	Animal
12612*	2007	RJ	Urina	Humano
8731*	2010	SP	Sangue	Humano
1240	2013	MG	Bovino	Animal
1241	2013	MG	Bovino	Animal

1310*	2013	MG	Sangue	Humano
1859	2013	ES	Sangue	Humano
1860	2013	ES	Sangue	Humano
1883	2013	GO	Sangue	Humano
2839	2013	RJ	Sangue	Humano
3178*	2014	MS	Líquido de punção	Humano
3179	2014	MS	Líquido de punção	Humano
3722	2014	ES	Sangue	Humano
40*	2015	RS	Medula Espinhal bovina	Animal
647	2015	BA	Bovino	Alimento
648	2015	BA	Bovino	Alimento
1548	2015	RJ	Sangue	Humano
2093*	2016	DF	Urina	Humano

Total: 113

SP, São Paulo; RJ, Rio de Janeiro; DF, Distrito Federal; GO, Goiás; MG, Minas Gerais; ES, Espírito Santo; MS, Mato Grosso do Sul; RS, Rio Grande do Sul; BA, Bahia; CE, Ceará.

*linhagens selecionadas para os ensaios de motilidade, invasão a células epiteliais e sobrevivência em macrófagos U937.

4.2 - Verificação da presença dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2* por PCR

A presença dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2* foi verificada por PCR nas 113 linhagens de *S. Dublin* estudadas (Tabela 1), na linhagem de *S. Typhi* e nas duas linhagens de *S. Typhimurium* mencionadas no item anterior.

O DNA das linhagens foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Campioni e Falcão (Campioni e Falcão, 2014). A concentração e a pureza do DNA genômico extraído foram analisadas em NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific) com comprimentos de onda (λ) de 260 nm e 280 nm (Sambrook & Russell, 2001). Foram consideradas como boas as extrações de pureza ≥ 1.6 e ≤ 1.9 (260nm/280nm). As condições utilizadas na PCR foram realizadas de acordo com as descritas por Falcão e colaboradores (Falcão *et al.*, 2006), utilizando 1.0 U de *Taq* DNA polimerase. A Tabela 2 apresenta os *primers* utilizados no presente estudo, as sequências e as respectivas temperaturas de hibridação (Tabela 2).

Os genes de algumas linhagens positivas para suas presenças foram sequenciados para validação de sua identidade. O sequenciamento foi realizado no Hemocentro do HCFMRP-USP no sequenciador ABI 3500XL (Applied Biosystems), utilizando o polímero POP7 (Applied Biosystem), seguindo as condições descritas em Souza e colaboradores (Souza *et al.*, 2010). As sequências obtidas foram

analisadas individualmente através do programa *ChromasPro* (Technelysium Pty Ltd).

Tabela 2 – *Primers* utilizados para verificação da presença dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2* por PCR das linhagens de *S. Dublin*.

<i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos (5'- 3')	Temperatura de Hibridação (°C)	Amplicon (pb)	Referência
<i>st313-td F</i>	GGTGATGTAGAAAGACGAA	49	1029	Herrero- Fresno <i>et al.</i> (2014)
<i>st313-td R</i>	GGAAGAGTAGGGAAAAGAA			
<i>fliC F</i>	ATGGCACAAGTCATTA	40	1515	Selander <i>et al.</i> (1992)
<i>fliC R</i>	TTAACGCAGTAAAGAG			
<i>sopE2 F</i>	TACTACCATCAGGAGG	44	995	Hur <i>et al.</i> (2011)
<i>sopE2 R</i>	TACTACCATCAGGAGG			

4.3 - Ensaio de invasão a células epiteliais humana (Caco-2) e sobrevivência em macrófagos humanos (U937)

A capacidade de invasão a células epiteliais Caco-2 (adenocarcinoma de colo humano) e de sobrevivência em macrófagos humanos (U937) foi verificada de acordo com o descrito por Moreira *et al.*, 2010, Pfeifer *et al.*, 1999 e Fierer *et al.*, 1993 (com modificações) para as 20 linhagens de *Salmonella* Dublin descritas no item 4.1 (Tabela 1). Ademais, as linhagens de *S. Typhi* e de *S. Typhimurium* descritas no item 4.1 também foram incluídas com o propósito de comparação.

Para isso, as células epiteliais foram crescidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies) em 5% de CO₂ e adicionadas na ordem de 1x10⁵ células em cada poço de uma microplaca de 12 poços. O ensaio foi iniciado após 12 dias de incubação, tempo necessário para que o estado de diferenciação das células fosse atingido. Os macrófagos humanos (U937) foram crescidos em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium* – Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies) em 5% de CO₂ e adicionados na ordem de 1x10⁵ células em cada poço de uma microplaca de 24 poços. Para a montagem das

placas, o meio de cultura foi suplementado com 10 nM de forbol miristato acetato (Sigma) para ativação das células. Após 48 horas, o meio de cultura das células foi substituído por meio sem forbol e as células foram incubadas por mais 24 horas para então iniciar-se o ensaio.

Para cada linhagem bacteriana estudada, o ensaio foi realizado em triplicata e poços com células e sem bactérias foram utilizados como controle negativo. A multiplicidade de infecção (MOI) utilizada foi de 100 células bacterianas para 1 célula epitelial humana (100:1). As linhagens bacterianas foram cultivadas *overnight* em meio LB a 37°C, e depois foram subcultivadas *overnight* em 5ml de meio LB pH 8,0 com 1% de NaCl em tubos de 13x100 mm.

Em seguida, o crescimento foi ajustado para a $DO_{600}=0.2$, que corresponde a aproximadamente $8\log_{10}$ CFU/ml (Shah *et al.*, 2013). Deste crescimento, 1 ml foi transferido para um tubo *Eppendorf* estéril, centrifugado a 8.000 X g por 15 minutos e o *pellet* ressuspensionado em 1 ml do meio de cultivo celular pré-aquecido a 37°C, sem antibióticos e sem soro bovino fetal. Desta suspensão, 100 μ l foram adicionados em cada poço da placa já contendo 900 μ l do crescimento celular em meio DMEM sem antibióticos e soro bovino fetal. Após isso, as microplacas foram centrifugadas para sedimentar as células bacterianas e colocá-las em contato com as células epiteliais, e então as placas foram incubadas a 37°C em estufa a 5% de CO₂, por 90 minutos para as células epiteliais Caco-2 e 30 minutos para os macrófagos humanos U937. Após incubação, as células foram lavadas com PBS (*Phosphate buffered saline*) para remover bactérias extracelulares e incubadas por mais 90 minutos em estufa de 5% CO₂ a 37°C contendo 1 ml de meio DMEM com 30 μ g/mL de gentamicina por poço. Novamente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 1 ml de meio DMEM sem antibiótico e soro bovino fetal a 37°C em estufa de 5% CO₂ por 3 horas.

Posteriormente, as células foram lavadas novamente com PBS e lisadas com uma solução de Triton X-100 a 1% em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente. Por último, diluições seriadas foram feitas em solução salina 0,8% para cada linhagem estudada, foram semeadas em ágar LB e incubadas a 37°C por 24 horas para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.4 - Análise estatística

A porcentagem de invasão e sobrevivência das linhagens foi calculada dividindo o valor de Log CFU/ml após a lise das células pelo Log 10^7 (inóculo inicial), e os resultados foram multiplicados por 100.

4.5 – Teste de motilidade

A verificação da motilidade foi realizada segundo protocolo descrito por Yim e colaboradores (Yim *et al.*, 2014) para as 20 linhagens de *Salmonella* Dublin descritas no item 4.1 (Tabela 1). Ademais, as linhagens de *S. Typhi* e de *S. Typhimurium* descritas no item 4.1 também foram incluídas com o propósito de comparação. Para isso, as linhagens bacterianas foram cultivadas *overnight* em meio LB a 37°C, e depois foram subcultivadas *overnight* em 5ml de meio LB pH 8,0 com 1% de NaCl em tubos de 13x100 mm, e 2 µl desta cultura foi colocado na superfície de uma placa com meio LB contendo 0,3% de ágar (ágar semi-sólido) e incubada por 6 horas a 37°C. O halo de crescimento das linhagens foi comparado e as linhagens que não apresentaram halo foram consideradas não-móveis. O experimento foi realizado em triplicata para cada linhagem estudada.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 - Extração do DNA Genômico das linhagens estudadas

A Figura 1 apresenta um gel representativo de uma eletroforese em gel de agarose, realizada para avaliação da integridade do DNA genômico de algumas das linhagens estudadas. Todas as 113 linhagens de *S. Dublin*, a linhagem ATCC de *S. Typhi* e as duas linhagens de *S. Typhimurium* apresentaram pureza entre 1,60 e 1,80.

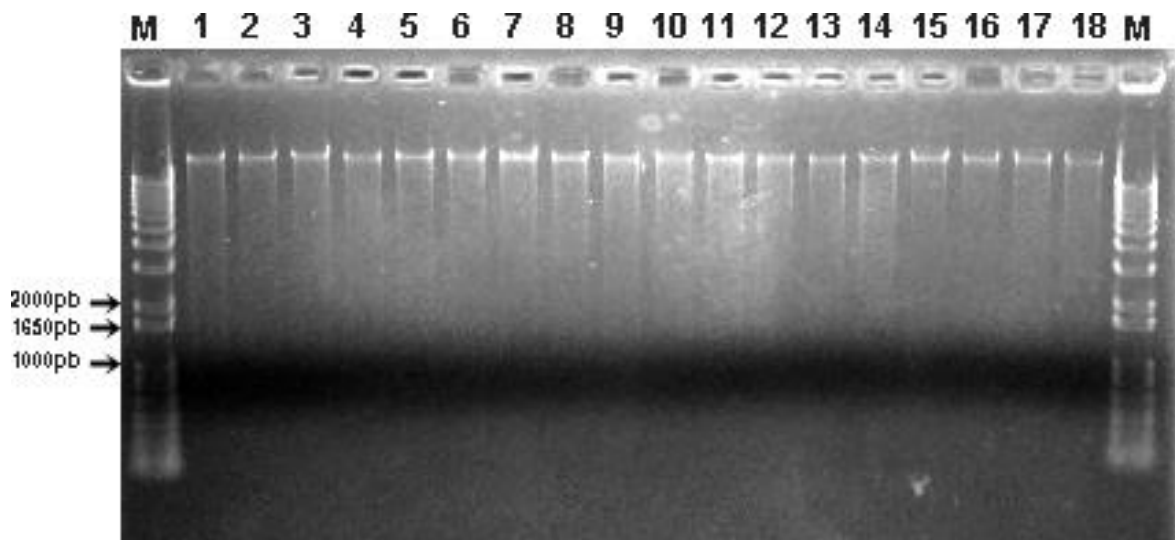


Figura 1 – Gel de agarose 1% representando o produto da extração do DNA genômico de algumas linhagens de *S. Dublin* estudadas. As letras M sobre as respectivas colunas representam o marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os poços de 1 a 18 representam as linhagens SD 114, SD 115, SD 136, SD 137, SD 484, SD 517, SD 530, SD 87, SD 90, SD 99, SD 534, SD 535, SD 557, SD 741, SD 107, SD 155, SD 21 e SD 288, respectivamente.

5.2 - Verificação da presença do gene *st313-td*, *fliC* e *sopE2*

Todas as 113 linhagens de *S. Dublin* estudadas apresentaram os genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2*. As linhagens de *S. Typhi* e *S. Typhimurium* apresentaram os genes *fliC* e *sopE2*, mas não apresentaram o gene *st313-td*. Para confirmação da presença e identidade dos respectivos genes, as linhagens de *S. Dublin* SD 2417, SD 885 e SD 1654 foram sequenciadas e utilizadas como controle positivo em todas as reações de PCR.

A Figura 2 mostra um gel representativo de uma eletroforese em gel de agarose, da amplificação do gene *st313-td*, de aproximadamente 1029pb.

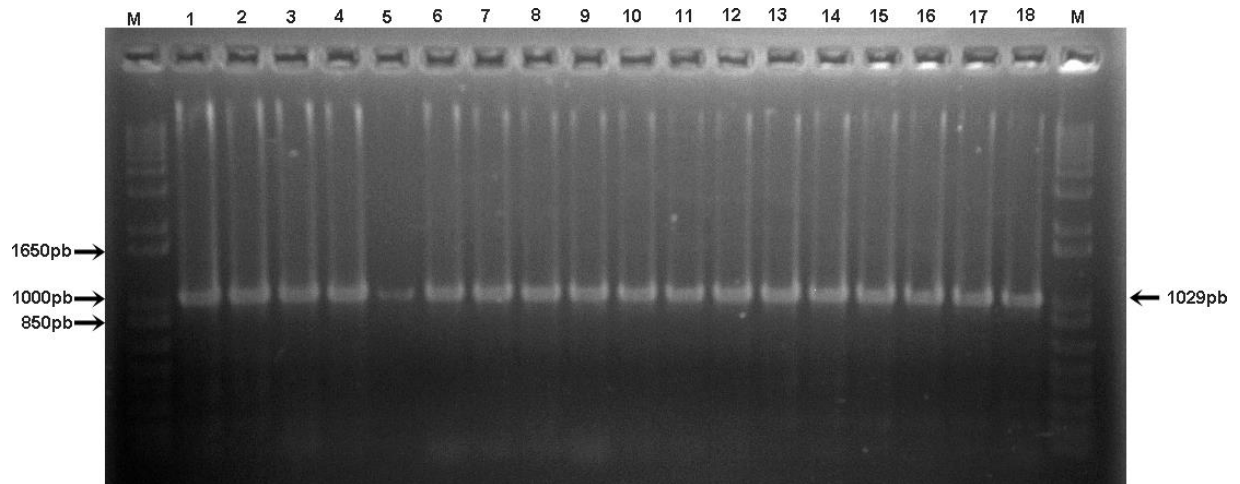


Figura 2 – Gel de agarose 1,5% representativo da amplificação do gene *st313-td* em algumas linhagens de *Salmonella* Dublin. As letras M sobre as respectivas colunas representam o marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As colunas de 1 a 18 representam as linhagens SD 136, SD 137, SD 484, SD 517, SD 530, SD 87, SD 90, SD 99, SD 534, SD 535, SD 557, SD 741, SD 749, SD 750, SD 383, SD 595, SD 721 e SD 722, respectivamente.

5.3 - Invasão a células epiteliais humana (Caco-2)

A Figura 3 apresenta as porcentagens de invasão a células Caco-2 das 20 linhagens de *S. Dublin* estudadas (Tabela 1). A taxa de invasão observada foi entre 53.97 e 88.88% em relação ao inóculo inicial (Figura 3). As linhagens controle de *S. Typhimurium* pertencentes aos ST 313 e ST 19 apresentaram uma taxa de invasão de 85.06% e 48.11%, respectivamente, enquanto a taxa da linhagem ATCC de *S. Typhi* foi de 67.90% (Figura 3).

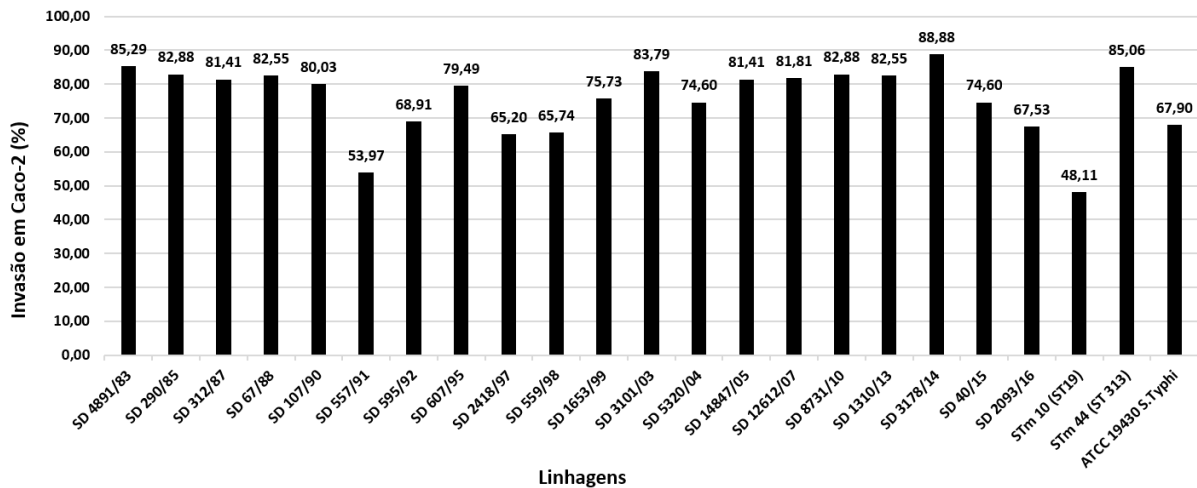


Figura 3 – Porcentagem de invasão das 20 linhagens de *S. Dublin* estudadas quanto a invasão em células Caco-2 humanas. As colunas STm10 e STm44 representam as linhagens de *S. Typhimurium* pertencentes aos STs 19 e 313, respectivamente.

5.4 - Sobrevivência em macrófagos humanos

A Figura 4 apresenta as porcentagens de sobrevivência das 20 linhagens de *S. Dublin* estudadas em macrófagos U937. As linhagens de *S. Dublin* apresentaram uma taxa de sobrevivência entre 72.90 a 98.08% em relação ao inóculo inicial (Figura 4). As linhagens de *S. Typhimurium* pertencentes aos ST 313 e ST 19 apresentaram uma taxa de 73.52% e 58.10% de sobrevivência, respectivamente, enquanto a linhagem ATCC de *S. Typhi* apresentou uma taxa de 68.33% (Figura 4).

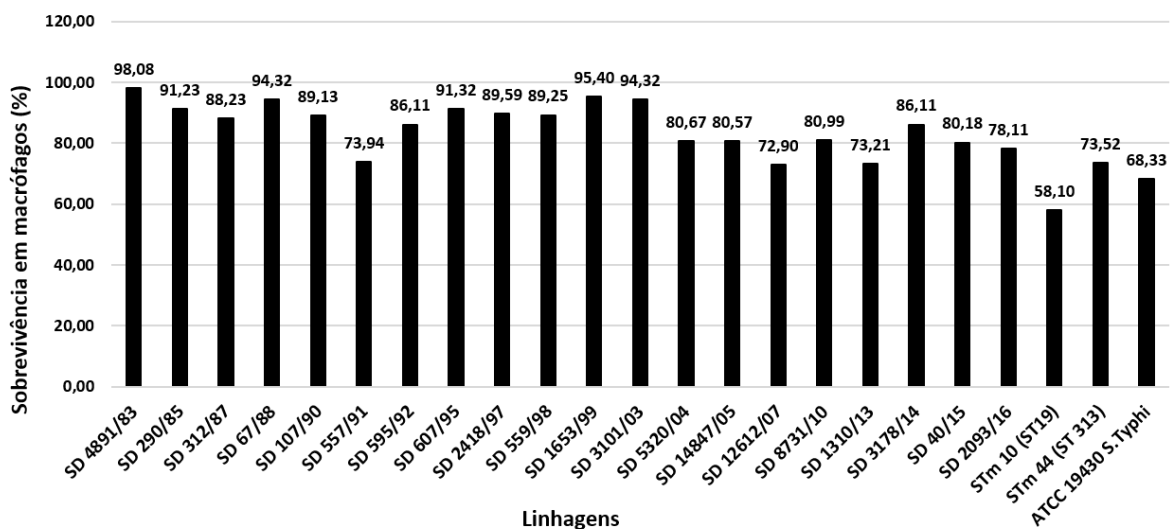


Figura 4 – Porcentagem de sobrevivência das 20 linhagens de *S. Dublin* estudadas quanto à sobrevivência em macrófagos humanos. As colunas STm10 e STm44 representam as linhagens de *S. Typhimurium* pertencentes aos STs 19 e 313, respectivamente.

5.5 – Teste de Motilidade

A Figura 5 apresenta exemplos de linhagens com e sem presença de halo, obtidos no teste de motilidade. As linhagens SD290/85, SD595/92, SD2418/97, SD8731/10, SD2093/16 e a linhagem de *S. Typhimurium* pertencente ao ST313 apresentaram formação de halo em um dos experimentos da triplicata. As outras linhagens de *S. Dublin* estudadas, além das linhagens de *S. Typhimurium* do ST 19 e de *S. Typhi* não apresentaram formação de halo em nenhum dos experimentos realizados.

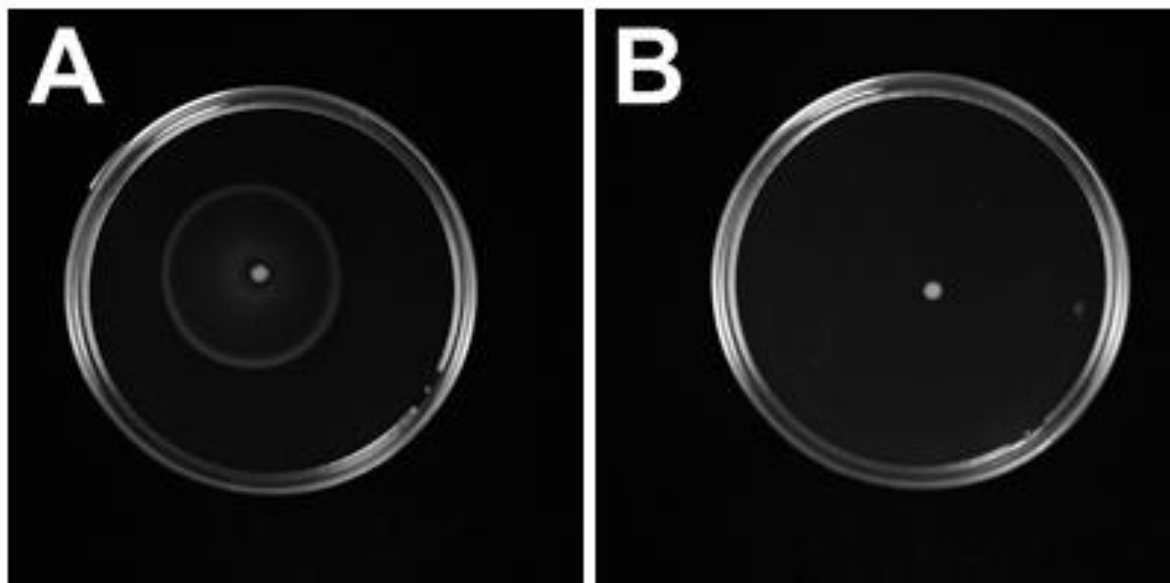


Figura 5 - Placas representativas do teste de motilidade em ágar LB semi-sólido. A placa marcada com a letra A representa uma linhagem móvel em um dos experimentos realizados (SD 290/85), que apresentou halo de crescimento, enquanto a placa marcada com a letra B representa uma linhagem imóvel (SD 40/15), de acordo com o teste de motilidade.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Salmonella é um dos mais importantes patógenos transmitidos através da ingestão de alimentos contaminados ao redor do mundo (Hoelzer *et al.*, 2011). *S. Dublin* é uma sorovariedade fortemente adaptada a bovinos, nos quais causa doença sistêmica severa, levando a prejuízos econômicos devido à alta taxa de mortalidade, morbidade, abortos e menor produção de leite no gado. Além disso, essa sorovariedade também pode infectar humanos, geralmente pelo consumo de produtos bovinos contaminados, levando a grave bacteremia com doença severa e alta taxa de mortalidade, muitas vezes semelhante à doença causada por *S. Typhi* (Zhai *et al.*, 2014; Hoelzer *et al.*, 2011; Uzzau *et al.*, 2000; Betancor *et al.*, 2012; Yim *et al.*, 2014).

Diferentemente de *S. Dublin*, infecções invasivas por outras sorovariedades não-tifóides não são comuns, mas em países em desenvolvimento têm sido diagnosticadas em crianças com doenças subjacentes ou entre adultos HIV positivos, causando doença severa, infecções e até mesmo morte (Gilks *et al.*, 1990; Hohmann, 2001; Berkley *et al.*, 2005; Gordon, 2008; Gordon *et al.*, 2008; Sigaúque *et al.*, 2009; Graham, 2010; Feasey *et al.*, 2012; Leekitcharoenphon *et al.*, 2013; Herrero-Fresno *et al.*, 2014).

Linhagens de *Salmonella* Typhimurium pertencentes ao ST 313 são responsáveis por uma significativa proporção dos relatos dessas infecções invasivas (Kingsley *et al.*, 2009; Feasey *et al.*, 2012; Leekitcharoenphon *et al.*, 2013; Herrero-Fresno *et al.*, 2014), e um possível marcador de virulência, o gene *st313-td*, foi encontrado nestas linhagens, que curiosamente está presente de maneira uniforme em linhagens de *S. Dublin*. No entanto, não se sabe exatamente qual a função deste gene tanto em linhagens da sorovariedade Typhimurium quanto nas da sorovariedade Dublin (Leekitcharoenphon *et al.*, 2013; Herrero-Fresno *et al.*, 2014).

O presente estudo teve por objetivo verificar em 113 linhagens de *S. Dublin*, isoladas de humanos e animais no Brasil, a prevalência do gene *st313-td*, além da presença dos genes *sopE2* e *fliC*, relacionados à invasão da célula do hospedeiro e produção de flagelo, respectivamente, além da motilidade e da capacidade de invasão a células epiteliais e sobrevivência em macrófagos.

Todas as 113 linhagens de *S. Dublin* desse estudo apresentaram o gene *st313-td*, enquanto as linhagens de *S. Typhimurium* dos STs 19 e 313 e a linhagem

de *S. Typhi*, utilizadas como controle, não apresentaram o gene. Herrero-Fresno e colaboradores (2014), em um estudo com 50 linhagens de *S. Dublin* e 295 de *S. Typhimurium* provenientes de uma coleção global na Dinamarca e isoladas de sangue, fezes e alimentos, detectaram o gene *st313-td* nas 50 linhagens da sorovariedade *Dublin* e em 121 linhagens da sorovariedade *Typhimurium*, onde a prevalência do gene foi mais comum em isolados de sangue (Herrero-Fresno *et al.*, 2014).

Do mesmo modo, Leekitcharoenphon e colaboradores (2013) verificaram a presença do gene *st-313td* em 177 linhagens de *Salmonella* spp. provenientes de uma coleção global e detectaram esse gene em seis linhagens de *S. Dublin*, isoladas da Dinamarca, Taiwan, Tailândia, Columbia e Nigéria, e isoladamente em algumas linhagens das sorovariedades *Bredeney*, *Saintpaul* e *Kentucky*, demonstrando dessa forma a presença uniforme do gene *st313-td* em linhagens pertencentes à sorovariedade *Dublin*, diferentemente de outras sorovariedades não-tifóides, onde foi variável (Leekitcharoenphon *et al.*, 2013).

Em relação à presença dos genes *fliC* e *sopE2*, as linhagens de *S. Dublin* apresentaram ambos uniformemente em todas as linhagens, assim como as linhagens de *S. Typhi* e *S. Typhimurium* utilizadas como controle. Do mesmo modo, estudos anteriores também detectaram os respectivos genes uniformemente tanto em linhagens de *S. Dublin* quanto em outras sorovariedades de *Salmonella*, ressaltando a importância da presença destes genes nos processos de invasão celular e virulência desta espécie (Itoh *et al.*, 1997; Bakshi *et al.*, 2000).

Em relação a invasão de células epiteliais Caco-2 e a sobrevivência em macrófagos U937, foram selecionadas 20 linhagens de *S. Dublin* (Tabela 1) dentre as 113 linhagens estudadas. Tanto em relação às células epiteliais quanto aos macrófagos humanos, verificou-se que as linhagens de *S. Dublin* apresentaram altas taxas de invasão e sobrevivência após a infecção (Figuras 3 e 4), independentemente do ano, fonte ou material de isolamento. Os valores obtidos foram semelhantes ou mesmo superiores aos encontrados para as linhagens invasivas de *S. Typhi* e *S. Typhimurium* ST 313 também estudadas.

Brackelsberg e colaboradores (1997), ao compararem a invasão de oito linhagens de *S. Dublin* e oito de *S. Typhimurium* isoladas de bovinos nos EUA em células epiteliais MDBK (rim bovino), também verificaram uma maior taxa de invasão

das linhagens da sorovariedade Dublin em comparação as da sorovariedade Typhimurium após 9 horas de incubação (Brackelsberg *et al.*, 1997).

Diferentemente, Weinstein e colaboradores (1998), em estudo comparando uma linhagem da sorovariedade Dublin com linhagens das sorovariedades Typhimurium e Typhi quanto à invasão em células epiteliais intestinais Int 407, verificaram que as linhagens de *S. Dublin* e *S. Typhimurium* foram recuperadas em quantidades semelhantes, porém ambas significativamente abaixo do valor recuperado para *S. Typhi* (Weinstein *et al.*, 1998). Já Watson e colaboradores (1995), comparando duas linhagens de *S. Dublin* com duas linhagens de *S. Typhimurium* quanto à invasão a células epiteliais MDCK (rim canino) e células epiteliais intestinais Int 407, verificaram que as linhagens de *S. Typhimurium* foram recuperadas na ordem de 10^6 UFC, próximo ao inóculo inicial, enquanto as linhagens de *S. Dublin* foram recuperadas na ordem de 10^5 UFC, mas ainda assim apresentando alta taxa de invasão celular (Watson *et al.*, 1995).

A presença de flagelo em *Salmonella* Dublin pode ser um importante determinante para a resposta inflamatória nas células do epitélio intestinal. Logo, sua ausência seria um importante fator para não desencadear a resposta inflamatória no epitélio intestinal e assim, promover sua disseminação sistêmica (Yim *et al.*, 2014). No presente estudo, apenas cinco linhagens de *S. Dublin* entre as 20 estudadas apresentaram formação de halos em apenas um dos três experimentos, formando halos de 8 a 25 mm, sem apresentar distinção quanto à fonte, material e ano de isolamento, enquanto as outras 15 não apresentaram flagelo em nenhum dos experimentos. Estes dados reforçam os dados encontrados em relação às altas taxas de invasão detectadas entre as linhagens estudadas.

Diferentemente dos dados obtidos, Yim *et al.* (2014) em um estudo com 25 linhagens isoladas de humanos e animais no Uruguai, encontrou entre as linhagens de humanos quatro consideradas não-móveis, com halos menores de 10 mm, e seis móveis, com halos de crescimento entre 20 e 40 mm; já entre as linhagens de animais, 10 linhagens foram consideradas não-móveis, com halos abaixo de 10 mm, e cinco móveis, com halos entre 28 e 44 mm (Yim *et al.*, 2014). Dessa forma, apesar de algumas linhagens do presente estudo terem apresentado motilidade, os valores de halos encontrados foram menores do que os encontrados pelos pesquisadores acima citados.

É importante ressaltar que, pelo nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro a verificar tanto a frequência dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2* quanto à capacidade de invasão a células epiteliais Caco-2, capacidade de sobrevivência em macrófagos humanos (U937) e motilidade de linhagens de *S. Dublin* isoladas de humanos e animais no Brasil. Ademais, existem poucos dados na literatura sobre a presença destes genes, motilidade e invasão a células com linhagens de *S. Dublin*, o que torna difícil a comparação dos dados obtidos com os dados de linhagens isoladas em outros locais no mundo (Brackelsberg *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1995; Weisntein *et al.*, 1998; Bakshi *et al.*, 2000; Leekitcharoenphon *et al.*, 2013; Herrero-Fresno *et al.*, 2014; Yim *et al.*, 2014). Deste modo, os resultados obtidos contribuíram com uma melhor caracterização das linhagens de *S. Dublin* isoladas no Brasil.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

7.1 - A presença uniforme dos genes *st313-td*, *fliC* e *sopE2* nas linhagens de *Salmonella* Dublin estudadas sugerem que esses devem ser fundamentais para que esta sorovariedade seja capaz de causar doença invasiva em humanos e bovinos no Brasil.

7.2 – As altas taxas de invasão e sobrevivência em células epiteliais Caco-2 e macrófagos U937 de humanos, além das baixas taxas de motilidade verificadas, reforçam a capacidade dessas linhagens de *S. Dublin* em causar doença invasiva em seres humanos no Brasil.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. et al. Virulence-associated genes, antimicrobial resistance and molecular typing of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from swine from 2000 to 2012 in Brazil. **J Appl Microbiol**, v. 120, n. 6, p. 1677-90, Jun 2016. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26913828> >.

_____. Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium isolated in Brazil by CRISPR-MVLST. **J Microbiol Methods**, v. 133, p. 55-61, Feb 2017. ISSN 1872-8359. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28034696> >.

_____. Genotypic diversity, pathogenic potential and the resistance profile of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983 to 2013 in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 64, n. 11, p. 1395-407, Nov 2015. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26307078> >.

_____. Draft Genome Sequences of 40 *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strains Isolated from Humans and Food in Brazil. **Genome Announc**, v. 4, n. 5, Sep 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5034119/> >.

_____. Multilocus sequence typing of *Salmonella* Typhimurium reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 51, p. 41-44, Mar 2017. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28288927> >.

BAJAJ, V. et al. Co-ordinate regulation of *Salmonella* typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. **Mol Microbiol**, v. 22, n. 4, p. 703-14, Nov 1996. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8951817> >.

BAKSHI, C. S. et al. Identification of SopE2, a *Salmonella* Secreted Protein Which Is Highly Homologous to SopE and Involved in Bacterial Invasion of Epithelial Cells. **J Bacteriol**, v. 182, n. 8, p. 2341-2344, Jan 2000. ISSN 0021-9193 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC111290/> >.

BERKLEY, J. A. et al. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. **N Engl J Med**, v. 352, n. 1, p. 39-47, Jan 2005. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635111> >.

BETANCOR, L. et al. Genomic Comparison of the Closely Related *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Dublin. **Open Microbiol J**, v. 6, p. 5-13, 2012. ISSN 1874-2858. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22371816> >.

BRACKELSBERG, C. A.; NOLAN, L. K.; BROWN, J. Characterization of *Salmonella* Dublin and *Salmonella* Typhimurium (Copenhagen) Isolates from Cattle. **Veterinary Research Communications**, v. 21, n. 6, p. 409-420, Aug 1997. ISSN 1573-7446. Disponível em: < <https://doi.org/10.1023/A:1005803301827> >.

CAMPIONI, F. et al. MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among *S. Enteritidis* strains isolated from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American Strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 174-181, Mar 15 2013 2013. ISSN 0168-1605.

CAMPIONI, F.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. **APMIS**, v. 122, n. 3, p. 215-22, Mar 2014. ISSN 1600-0463. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23763723> >.

CAMPIONI, F.; MORATTO BERGAMINI, A. M.; FALCÃO, J. P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella Enteritidis* isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiol**, v. 32, n. 2, p. 254-64, Dec 2012. ISSN 1095-9998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986188> >.

CAMPIONI, F. et al. Prevalence of *gyrA* Mutations in Nalidixic Acid-Resistant Strains of *Salmonella Enteritidis* Isolated from Humans, Food, Chickens, and the Farm Environment in Brazil. **Microb Drug Resist**, Aug 2016. ISSN 1931-8448. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27559761> >.

CAMPIONI, F.; ZOLDAN, M. M.; FALCÃO, J. P. Characterization of *Salmonella Enteritidis* strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. **Epidemiol Infect**, p. 1-8, Mar 2014. ISSN 1469-4409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625654> >.

CARDEN, S. et al. Non-typhoidal *Salmonella* Typhimurium ST313 isolates that cause bacteremia in humans stimulate less inflammasome activation than ST19 isolates associated with gastroenteritis. **Pathog Dis**, v. 73, n. 4, Jun 2015. ISSN 2049-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25808600> >.

ELLERMEIER, C. D.; ELLERMEIER, J. R.; SLAUCH, J. M. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 3, p. 691-705, Aug 2005. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16045614> >.

FALCÃO, J. P. et al. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 11, p. 1539-48, Nov 2006. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030914> >.

FEASEY, N. A. et al. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. **Lancet**, v. 379, n. 9835, p. 2489-99, Jun 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22587967> >.

FIERER, J. et al. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophages and nonphagocytic cells. **Infection and Immunity**, v. 61, n.

12, p. 5231-5236, 1993. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281306/> >.

GILKS, C. F. et al. Life-threatening bacteraemia in HIV-1 seropositive adults admitted to hospital in Nairobi, Kenya. **Lancet**, v. 336, n. 8714, p. 545-9, Sep 1990. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1975046> >.

GORDON, M. A. Salmonella infections in immunocompromised adults. **J Infect**, v. 56, n. 6, p. 413-22, Jun 2008. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474400> >.

GORDON, M. A. et al. Epidemics of invasive Salmonella enterica serovar enteritidis and S. enterica Serovar typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 7, p. 963-9, Apr 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444810> >.

GRAHAM, S. M. Nontyphoidal salmonellosis in Africa. **Curr Opin Infect Dis**, v. 23, n. 5, p. 409-14, Oct 2010. ISSN 1473-6527. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20736739> >.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol**, v. 161, n. 1, p. 26-9, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1769-7123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840847> >.

HERRERO-FRESNO, A. et al. The role of the st313-td gene in virulence of Salmonella Typhimurium ST313. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84566, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24404174> >.

HOHMANN, E. L. Nontyphoidal salmonellosis. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 2, p. 263-9, Jan 2001. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170916> >.

HUR, J. et al. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. **Can J Vet Res**, v. 75, n. 1, p. 49-56, May 2011. ISSN 0830-9000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003562/> >.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol**, v. 165, n. 7, p. 526-30, Sep 2014. ISSN 1769-7123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25049166> >.

ITOH, Y. et al. Amplification of rfbE and fliC Genes by Polymerase Chain Reaction for Identification and Detection of Salmonella Serovar Enteritidis, Dublin and Gallinarum-Pullorum. **Microbiol Immunol**, v. 41, n. 10, p. 791-794, Oct 1997. ISSN 0385-5600. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01928.x> >.

KINGSLEY, R. A. et al. Epidemic multiple drug resistant Salmonella Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. **Genome Res**, v. 19, n. 12, p. 2279-87, Dec 2009. ISSN 1549-5469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901036> >.

KUNDINGER, M. et al. Real-time polymerase chain reaction quantification of Salmonella Typhimurium hilA expression during agitation and static incubation. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 16 n. 3, p. 273-283, 2008.

LEEKITCHAROENPHON, P. et al. Genomics of an emerging clone of Salmonella serovar Typhimurium ST313 from Nigeria and the Democratic Republic of Congo. **J Infect Dev Ctries**, v. 7, n. 10, p. 696-706, Oct 2013. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24129621> >.

MAJOWICZ, S. E. et al. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 6, p. 882-9, Mar 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20158401> >.

Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Joseph Sambrook , David W. Russell. **The Quarterly Review of Biology**, v. 76, n. 3, p. 348-349, Set 2001. ISSN 0033-5770. Disponível em: < <https://doi.org/10.1086/394015> >. Acesso em: 2017/11/10.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC Mediates Salmonella enterica Serovar Typhimurium Virulence In Vitro and In Vivo. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 914-926, Dec 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825943/> >.

MUNANG'ANDU, H. M. et al. Bacteria isolations from broiler and layer chicks in zambia. **J Pathog**, v. 2012, p. 520564, 2012. ISSN 2090-3065. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988514> >.

NIELSEN, L. R. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of Salmonella Dublin in cattle. **Vet Microbiol**, v. 162, n. 1, p. 1-9, Feb 2013. ISSN 1873-2542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22925272> >.

PEZOA, D. et al. Only one of the two type VI secretion systems encoded in the Salmonella enterica serotype Dublin genome is involved in colonization of the avian and murine hosts. **Vet Res**, v. 45, p. 2, 2014. ISSN 1297-9716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24405577> >.

PFEIFER, C. G. et al. Salmonella typhimurium Virulence Genes Are Induced upon Bacterial Invasion into Phagocytic and Nonphagocytic Cells. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5690-5698, Aug 1999. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96943/> >.

SELANDER, R. K. et al. Molecular evolutionary genetics of the cattle-adapted serovar Salmonella dublin. **J Bacteriol**, v. 174, n. 11, p. 3587-92, Jun 1992. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1592813> >.

SHAH, J. et al. Preadaptation to Cold Stress in Salmonella enterica Serovar Typhimurium Increases Survival during Subsequent Acid Stress Exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 79, n. 23, p. 7281-7289, Aug 2013. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837722/> >.

SIGAÚQUE, B. et al. Community-acquired bacteremia among children admitted to a rural hospital in Mozambique. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, n. 2, p. 108-113, Feb 2009. ISSN 0891-3668. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131902> >.

SOUZA, R.A. et al. Evaluation of four molecular typing methodologies as tools for determining taxonomy relations and for identifying species among Yersinia isolates. **J. Microbiol. Methods**, v. 82, n. 2, p. 141–150, Ago 2010. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.05.005> >.

TABLANTE, N. L.; LANE, V. M. Wild mice as potential reservoirs of Salmonella dublin in a closed dairy herd. **Can Vet J**, v. 30, n. 7, p. 590-2, Jul 1989. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17423375> >.

UZZAU, S. et al. Host adapted serotypes of Salmonella enterica. **Epidemiol Infect**, v. 125, n. 2, p. 229-55, Oct 2000. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11117946> >.

WATSON, P. R. et al. Characterization of intestinal invasion by Salmonella typhimurium and Salmonella dublin and effect of a mutation in the invH gene. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2743-2754, 1995. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173367/> >.

WEINSTEIN, D. L. et al. Differential Early Interactions between Salmonella enterica Serovar Typhi and Two Other Pathogenic Salmonella Serovars with Intestinal Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2310-2318, Maio 1998. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC108196/> >.

YIM, L. et al. Repression of flagella is a common trait in field isolates of Salmonella enterica serovar Dublin and is associated with invasive human infections. **Infect Immun**, v. 82, n. 4, p. 1465-76, Apr 2014. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24421045> >.