



ANÁLISE GENÉTICA MOLECULAR DE SALMONELAS DE SURTOS DE TIFO AVIÁRIO E PULOROSE NO BRASIL

Nathalie S. Zanetti¹, Sílvia D. Carli¹, Diéssy Kipper¹, Nilo Ikuta², Vagner R. Lunge²

¹Alunas do curso de graduação de Medicina Veterinária-ULBRA

²Professores-pesquisadores ULBRA

Resumo

A *Salmonella* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* classificada em mais de 2.500 sorotipos que ocorrem normalmente no trato entérico de animais. Muitos destes sorotipos infectam aves e estão associados a gastroenterites (paratifo aviário), mas apenas as biovars Gallinarum e Pullorum do sorotipo Gallinarum podem causar infecções sistêmicas em aves de produção e resultar em tifo aviário e pulorose, respectivamente. Surtos destas doenças com elevada mortalidade e grandes prejuízos têm ocorrido em granjas avícolas do Brasil nos últimos anos. O avanço destas infecções tem sido controlado com programas de biossegurança e o uso de uma vacina viva específica (cepa Gallinarum 9R) nos lotes em produção. Os objetivos deste trabalho foram: (1) realizar a análise do perfil de alguns genes associados às duas biovars do sorotipo Gallinarum em isolados bacterianos de aves de diferentes sorotipos associados ou não aos recentes surtos, (2) detectar a cepa 9R em isolados de *Salmonella* de lotes comerciais (vacinados ou não). As amostras utilizadas incluíam 91 isolados de *Salmonella* previamente sorotipados e provenientes de aviários não vacinados do Brasil entre 2011 e 2014, e 50 isolados de lotes com suspeita de tifo aviário/pulorose e ou que foram submetidos à vacinação. A metodologia consistiu na extração de DNA de todos isolados, detecção genérica de *Salmonella* pela PCR em tempo real (gene *invA*) e detecção de quatro genes (*sefA*, *fliCg*, *glgC*, *speC*) por PCR convencional. Os 50 isolados do segundo grupo foram analisados pelo mesmo procedimento com uma etapa adicional de amplificação por PCR convencional específica para detecção específica da cepa 9R. Os resultados mostraram que todos isolados foram positivos para o gene *invA*. Com relação aos demais genes, ocorreu um perfil específico para os dez isolados do sorotipo Gallinarum (*sefA*+, *fliCg*+, *glgC*+, *speC*+) e os oito de Pullorum (*sefA*+, *fliCg*+, *glgC*-, *speC*+) e os demais isolados (previamente identificados como sorotipos Enteritidis, Typhimurium e outros) apresentaram perfil diferente (*sefA*+/-, *fliCg*+/-, *glgC*-, *speC*-), possibilitando a diferenciação das biovars Gallinarum e Pullorum. A análise das 50 amostras de lotes vacinados demonstrou a ocorrência de 31 isolados do biovar Gallinarum (sendo 20 da cepa 9R) e 19 de outras salmonelas. Em conclusão, o presente estudo demonstra um perfil genético-molecular específico para os isolados de sorotipos associados a surtos de tifo aviário e pulorose em aves.

Palavras-chave: Salmonelose. Gallinarum. Pullorum.

Introdução

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são responsáveis por doenças em aves de produção industrial. Além disso, pode ocorrer a transmissão destas bactérias para o homem, principalmente pelo consumo de alimentos contaminados, e causar casos de toxinfecção (BRAUNWALD, E. et al., 2008).

Atualmente são conhecidos mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella*. Aproximadamente 90 destes sorotipos são os mais comuns em casos de infecção de seres humanos e animais. Especificamente nas aves, são reconhecidas três enfermidades principais: pulorose, causada por bactérias do sorotipo Gallinarum biovar Pullorum, o tifo aviário, causado por bactérias do sorotipo Gallinarum biovar Gallinarum, e o paratifo aviário, causado por uma gama maior de sorotipos, mais frequentemente Enteritidis e Typhimurium.

A prevenção das salmonelas é de suma importância em qualquer local de produção avícola. Além das medidas gerais de biossegurança, direcionadas a todas as etapas das operações avícolas, é preciso maior atenção com as granjas reprodutoras e incubatórios. O exame clínico das aves, no início do período de postura, tem se mostrado efetivo na prevenção da transmissão vertical. O controle das doenças causadas pelo sorotipo Gallinarum também pode ser realizado pelo uso de vacinas vivas (baseadas principalmente na cepa 9R) e inativadas (bacterinas) (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009),

O diagnóstico das salmoneloses é realizado pela associação da anamnese, achados clínicos e anatomopatológicos. A identificação de aves/lotos infectados é normalmente realizada por testes sorológicos imunoenzimáticos (tipo ELISA) e/ou aglutinação em placa. As aves reagentes positivas devem ser submetidas a exame bacteriológico, bioquímico e sorológico para identificação dos sorotipos. O material para análise pode ser colhido do baço, fígado, ovários, coração, conteúdo intestinal e saco da gema, sendo os exames de baço, fígado e ovários os mais importantes (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009).

Estudos realizados previamente estabeleceram técnicas para análise genética dos biovares Gallinarum e Pullorum e da cepa vacinal 9R pela reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymersase Chain Reaction*). Estas técnicas possibilitaram a detecção de genes característicos de Gallinarum e Pullorum, auxiliando no diagnóstico das infecções em lotes de produção (KANG et al., 2011; KANG et al., 2012) .

O objetivo deste trabalho foi implementar e utilizar estes métodos de PCR específicos para a detecção molecular dos biovares Gallinarum e Pullorum e da cepa vacinal 9R na análise de isolados de *Salmonella* de granjas avícolas do Brasil.

Materiais e Métodos

Amostras:

Noventa e um isolados de *Salmonella*, sendo 10 do sorotipo Gallinarum, 8 de Pullorum, 7 de Enteritidis, 10 de Typhimurium, e 56 de outros sorotipos foram obtidos de um banco de amostras do laboratório. Estes isolados eram provenientes de aviários não vacinados contra o sorotipo Gallinarum (cepa 9R) localizados em sete estados do Brasil (SC, RS, PR, DF, SP, BA e GO), sendo obtidos entre os anos de 2011 e 2014. Também foram obtidos 50 isolados de lotes vacinados com a cepa vacinal Gallinarum 9R, com suspeita de salmonelose, de surtos recentes.

Extração:

A extração das amostras foi realizada pelo método de fervura (SOMET et al., 1994) com algumas adaptações. Adicionou-se 100 µl de água tratada em um Eppendorf, no qual foi adicionada a amostra da cultura com alça de Drigalsky. Após homogenização, cada tubo foi incubado em termobloco durante 5 minutos a 99.9°C, realizado um choque-térmico no freezer por 1 minuto e submetido à centrifugação por 10.000 rpm por 3 minutos.

Análise por PCR em tempo real (gene *invA*):

A viabilidade das amostras foi avaliada pela detecção genérica de *Salmonella* usando PCR em tempo real no equipamento *Step One Plus*

(*Applied Biosystems*) tendo como alvo o gene *invA* (invasina). As condições de amplificação incluíram um ciclo de desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15s a 95°C e 60s a 60°C. A avaliação foi realizada diretamente no equipamento pela análise da presença de curvas de amplificação e determinação dos valores de ciclo limite de leitura (*Ct*, *cycletreshold*).

Análise por PCR convencional (genes *fliCg* e *sefA*):

As amostras foram submetidas à amplificação por PCR convencional (Veriti 96 Well Thermal Cycler – *Applied Biosystems*) utilizando iniciadores específicos para os alvos *sefA* e *fliCg* nas seguintes condições de amplificação: um ciclo de desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de desnaturação por 20 segundos a 95°C, anelamento por 40 segundos a 55°C, extensão por 60 segundos a 72°C e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5min. Cada amostra foi submetida à detecção por eletroforese em gel de poliacrilamida corada com nitrato de prata.

Análise por PCR convencional (genes *speC* e *glgC*):

As amostras foram analisadas por três testes de PCR independentes que utilizam iniciadores específicos para a amplificação dos genes *speC* dos biovars *Gallinarum* e *Pullorum*, *glgC* das bactérias do biovar *Gallinarum* e *glgC 9R* da cepa vacinal 9R.

As reações foram realizadas no equipamento Veriti 96 Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*) com as seguintes condições de amplificação: 1 ciclo de desnaturação de 3 minutos a 95°C; 35 ciclos de desnaturação por 20 segundos a 95°C; anelamento por 40 segundos a 65°C; extensão por 60 segundos a 72°C; e 1 ciclo de extensão final de 5 minutos a 72°C.

A detecção foi executada em eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, e analisada de acordo com o tamanho do fragmento (KANG et al., 2011; 2012) (Figura 1).

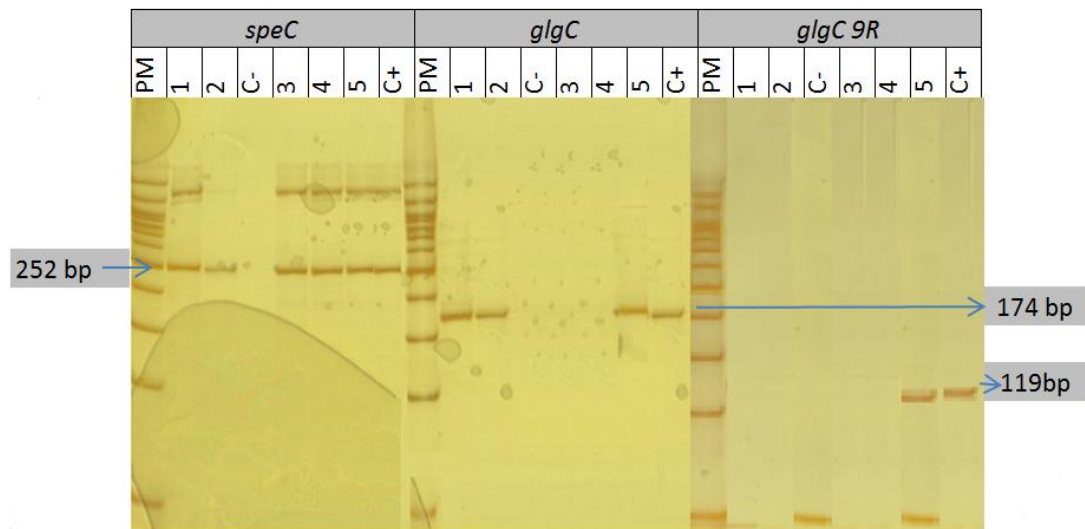


Figura 1: Gel de poliacrilamida apresentando amostras do sorotipo Gallinarum (1 e 2) com amplificação para os alvos *speC*(252 bp) e *glgC* (174 bp); amostras do sorotipo Pullorum (3 e 4) com amplificação para o alvo *speC* (252 bp); amostra de cepa vacinal Gallinarum 9R (5) com amplificação para os alvos *speC*(252 bp),*glgC*(174 bp) e *glgC 9R* (119 bp); amostra Controle negativo (C-); amostra Controle positivo (C+) de vacina Gallinarum 9R .

Resultados e Discussão

Todos isolados apresentaram resultado positivo na detecção genérica de *Salmonella* pela PCR em tempo real. Na análise com os PCRs específicos, os dez isolados do sorotipo Gallinarum foram positivos para quatro alvos (*sefA*, *fliCg*, *glgC* e *speC*), enquanto os oito de Pullorum foram positivos para três alvos (*sefA*, *fliCg* e *speC*), possibilitando a diferenciação destes biovars entre si. Os demais sorotipos apresentaram um perfil genético diferente (Tabela 2).

Tabela 2: perfil genético molecular de isolados de *Salmonella*.

Sorotipo	N	<i>invA</i>	<i>fliCg</i>	<i>sefA</i>	<i>glgC</i>	<i>speC</i>
Gallinarum	10	+	+	+	+	+
Pullorum	8	+	+	+	-	+
Enteritidis	7	+	+	+	-	-
Typhimurium	10	+	-	-	-	-
Outro (indeterminado)	49	+	-	-	-	-
Outro (indeterminado)	3	+	-	+	-	-
Outro (indeterminado)	3	+	+	-	-	-
Outro (indeterminado)	1	+	+	-	+	-
Total	91					

As técnicas foram então utilizadas na análise de 50 isolados de galinhas com doença clínica típica de Tifo Aviário e de lotes vacinados. Na análise dos resultados, verificou-se a ocorrência de 31 isolados do biovar Gallinarum, sendo 20 da cepa 9R. Os outros 19 isolados apresentaram resultado negativo para sorotipo Gallinarum, mas positivo para *Salmonella*, indicando a ocorrência de outros sorotipos (Tabela 3). Estes dados demonstram coerência, confirmando-se os padrões compatíveis com o esperado, sugerindo que a técnica de PCR é capaz de distinguir a cepa vacinal 9R da cepa de campo que tem circulado.

Tabela 3: Detecção de amostras de *Salmonella*, de lotes vacinados, por PCR em tempo real para o gene *invA* e caracterização das mesmas por PCR convencional através dos genes *glgC*, *speC* e *glgC 9R*

Sorotipo	n	<i>invA</i>	<i>glgC</i>	<i>speC</i>	<i>glgC 9R</i>
Gallinarum	11	+	+	+	-
Vacina Gallinarum 9R	20	+	+	+	+
Outro	19	+	-	-	-

Conclusão

O presente estudo demonstra a ocorrência de um perfil genético molecular específico para os isolados dos biovars Gallinarum e Pullorum do sorotipo Gallinarum. Esta análise permitiu uma melhor caracterização de isolados de surtos de tifo aviário e pulorose em aves no Brasil. Estes procedimentos são uma alternativa eficiente para a identificação dos surtos destas principais salmoneloses aviárias (inclusive com diferenciação da cepa vacinal 9R) podendo substituir os métodos bioquímicos e sorológicos atualmente utilizados.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa; aos colegas, professores e funcionários do Laboratório de Diagnóstico Molecular da Ulbra que tornaram possíveis o desenvolvimento deste trabalho.

Bibliografia

BERCHIERI JUNIOR A. et al. Doenças das aves. In: BERCHIERI JUNIOR A.; MACARI, M. **Salmoneloses Aviárias**.Campinas: Facta, 2000. Cap.4.1, p.185-194.

BERCHIERI JUNIOR A. et al. **Doenças das aves**.2.ed. Campinas: Facta, 2009. Cap.4.1, p.435-454.

BRAUNWALD, E. et al. Harrison Medicina Interna. In: PEGUES, D.A.; MILLER, S.I. **Salmoneloses**.17.ed.Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2008. Cap.146, p.956-962.

KANG, M. et al. Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum* based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes. **Veterinary Microbiology Journal**, Korea, jan. 2011. v.147, p.181-185.

KANG, M. et al. Differential identification of *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum* and the biovar *Gallinarum* live vaccine strain 9R. **Veterinary Microbiology Journal**. Korea, may. 2012. v.160, p. 491-495.

SOUMET, C. et al. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, [s.l.], 1994. Cap.5, p.294-298.