



**DETECÇÃO MOLECULAR DOS BIOVARES GALLINARUM E
PULLORUM EM ISOLADOS DE *SALMONELLA* DE GRANJAS DE PRODUÇÃO
AVÍCOLA**

Nathalie de Souza Zanetti¹

Diéssy Kipper²

Adryane Moraes da Conceição³

Nilo Ikuta⁴

Vagner Ricardo Lunge⁴

Resumo

A *Salmonella* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* normalmente encontrada no trato entérico de diferentes animais. Este microrganismo é classificado em mais de 2.500 sorotipos. As salmonelas do sorotipo Gallinarum, que inclui os biovares Gallinarum e Pullorum, infectam as aves causando tifo aviário e pulorose, respectivamente. Surto destas doenças têm ocorrido em lotes de produção industrial de aves no Brasil, causando grandes perdas econômicas. A redução de casos destas doenças em granjas avícolas tem sido obtida com programas de biossegurança e utilização de vacina comercial específica nos lotes em produção. O objetivo deste estudo foi aplicar métodos baseados na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) para detecção molecular específica dos biovares Gallinarum e Pullorum a partir de isolados bacterianos de recentes surtos. As amostras utilizadas incluíram 91 isolados de *Salmonella* previamente sorotipados (incluindo dez isolados de Gallinarum e oito de Pullorum) e provenientes de aviários não vacinados do Brasil entre 2011 e 2014. A metodologia consistiu em extração de DNA, detecção genérica de *Salmonella* pela PCR em tempo real (gene *invA*), e detecção específica dos biovares por dois PCRs independentes (genes *glgC* e *speC*). Os resultados foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Na análise das 91 amostras, os dez isolados do sorotipo Gallinarum e os oito de Pullorum foram detectados especificamente pelos testes de PCR. Os demais isolados (previamente identificados como sorotipos Enteritidis, Typhimurium e outros) apresentaram resultado negativo nos testes de detecção específica. Concluindo, o presente estudo demonstra a efetividade dos testes de PCR na detecção específica de isolados de *Salmonella* de sorotipos associados a surtos de tifo aviário e pulorose em aves. Esta metodologia é uma alternativa eficiente, podendo substituir os métodos bioquímicos e sorológicos atualmente utilizados.

Palavras-chave: Salmonelose; enterobactérias; pulorose; tifo aviário

1 Aluno do curso de graduação de Medicina Veterinária na ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPq – natha.aa@hotmail.com

2 Aluno do curso de graduação de Medicina Veterinária na ULBRA – Bolsista PIBIT/CNPq

3 Aluno do curso de graduação de Agronomia na ULBRA

4 Professor do PPGBioSaúde da ULBRA – vagner.lunge@gmail.com

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são responsáveis por uma ampla variedade de doenças de andamento agudo e crônico na avicultura. Além disso, as aves domésticas podem transmitir estas bactérias para o homem, principalmente pela alimentação, e causar casos de toxinfecção (BRAUNWALD, E. et al., 2008).

Atualmente são conhecidos mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella*. Mas em torno de 90 são os mais comuns em casos de infecção de seres humanos e animais. Muitas destas salmonelas causam doenças em aves (salmoneloses aviárias). São reconhecidas três enfermidades principais: pulorose, causada somente por bactérias do sorotipo Gallinarum biovar Pullorum, o tifo aviário, causada por bactérias do sorotipo Gallinarum biovar Gallinarum, e o paratifo aviário, que pode ser causado por outros sorotipos, principalmente Enteritidis e Typhimurium.

A prevenção e controle das salmonelas são 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 das aves, no início do período de postura, tem se mostrado instrumento importantíssimo de prevenção da transmissão vertical, sendo considerado o principal responsável pelo sucesso no controle da doença. Para o controle do tifo aviário, também estão disponíveis vacinas vivas e inativadas (bacterinas). Merece ser lembrado que o programa de vacinação não substitui as medidas gerais de controle (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009)

O diagnóstico das salmoneloses se baseia na associação da anamnese, achados clínicos e anatomopatológicos. A identificação de aves/lotos infectados é normalmente realizada por testes sorológicos rápidos, como ensaio imunoenzimático (ELISA) e soroaglutinação 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).

Técnicas específicas de detecção molecular dos biovars Gallinarum e Pullorum têm sido desenvolvidas nos últimos anos, por meio de dois PCRs independentes, baseados nas regiões polimórficas dos genes *glgC* e *speC*, que foi aplicado na detecção/diferenciação destas salmonelas em aves de produção e permitiu uma rápida confirmação (KANG et al., 2011). O gene *speC* amplifica para todos os isolados das biovars Gallinarum e Pullorum (SGP) e o gene *glgC* somente para as bactérias da biovar Gallinarum (SG).

O objetivo deste trabalho foi utilizar estes métodos de detecção molecular dos biovars Gallinarum e Pullorum para análise de isolados de *Salmonella* de granjas avícolas do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras:

O estudo inclui 91 isolados de *Salmonella*, previamente sorotipados, contendo 10 isolados do sorotipo Gallinarum, 8 de Pullorum, 7 de Enteritidis, 10 de Typhimurium, e 56 amostras sorotipadas como outras *Salmonellas* (*Salmonella* spp., *Salmonella* do Grupo B e *Salmonella* do Grupo D), provenientes de aviários não vacinados, de sete estados do Brasil (SC, RS, PR, DF, SP, BA e GO), entre os anos de 2011 e 2014. Também foram obtidas culturas de referência, dos biovars Gallinarum e Pullorum, para uso como controles nas reações.

Extração:

A extração das amostras foi realizada pelo método de fervura (SOUMET et al., 1994) com algumas adaptações conforme a seguir. Com o Bico de Bunsen aceso, adiciona-se 100 µl de água tratada em um Eppendorf, coleta-se amostra da cultura com alça de esfregaço de Drigalsky e homogeneiza-se, leva-se ao termobloco durante 5 minutos a 99.9°C, realiza-se um choque-térmico por 1 minuto no freezer, centrifuga-se por 3 minutos à 10.000 rpm e pipeta-se o sobrenadante em torno de 80 µl do material extraído.

Análise por Real Time PCR (gene *invA*):

Para verificar a viabilidade das amostras, realizou-se a detecção genérica de *Salmonella* pela PCR em tempo real (*StepOne Plus – Applied Biosystems*) tendo como alvo o gene *invA* (*invasina*). As condições foram as seguintes: 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 respectivos valores de *Ct* (*cycle treshold*).

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

As amostras foram analisadas pelos dois testes de PCR independentes que utilizam primers específicos para a amplificação de sequências dos genes *speC* dos biovares Gallinarum e Pullorum (SGP) e *glgC* das bactérias do biovar Gallinarum (SG) (Tabela 1).

Tabela 1: Primers utilizados nos ensaios de PCR descritos por Kang et al., 2011

SGP

SGP-L 5'- CGG TGT ACT GCC CGC TAT- 3'

SGP-R 5'- CTG GGC ATT GAC GCA AA - 3'

SG

SG-L 5'- GAT CTG CTG CCA GCT CAA - 3'

SG-R 5'- GCG CCC TTT TCA AAA CAT A - 3'

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.

Detecção:

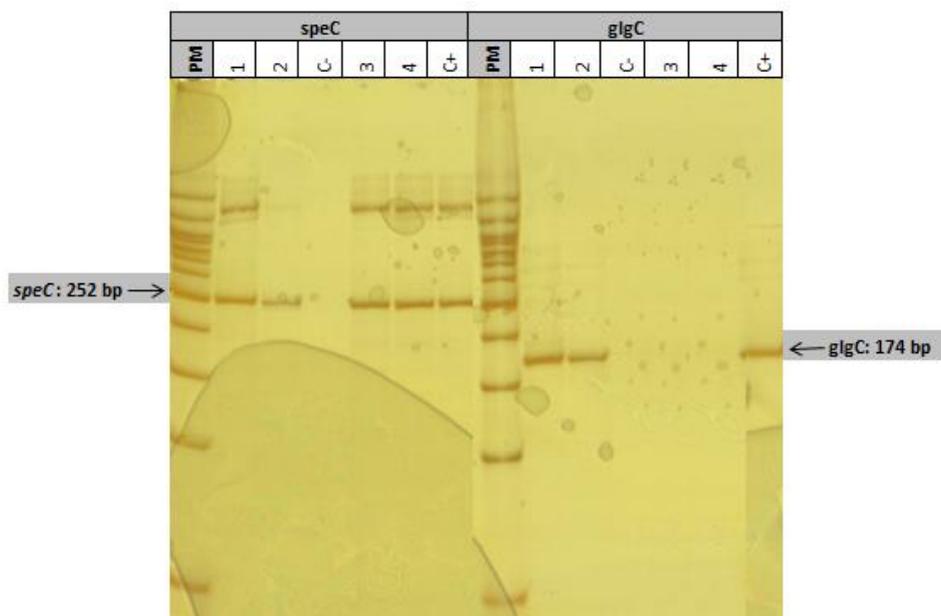
A detecção foi executada em eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, e analisada de acordo com o tamanho do fragmento (KANG et al., 2011):

- Fragmento SGP (*speC*): 252 bp

- Fragmento SG (*glgC*): 174 bp

Para detectar uma amostra com *Salmonella* Gallinarum, o gel deve apresentar bandas específicas para os dois alvos analisados, *speC* e *glgC*. Para a amostra ser *Salmonella* Pullorum precisa apresentar banda específica apenas para o alvo *speC* (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); Controle positivo (C+) de *Salmonella* Gallinarum



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na detecção genérica de *Salmonella* pela PCR em tempo real, todas amostras apresentaram resultado positivo para o gene *invA*. Na análise com os PCRs específicos, os dez isolados do sorotipo Gallinarum e os oito de Pullorum foram detectados especificamente. Os demais 73 isolados (previamente identificados como sorotipos Enteritidis, Typhimurium e outros) apresentaram resultado negativo nos testes de detecção específica, exceto cinco amostras (uma de Enteritidis e quatro de sorotipos não identificados) que apresentaram resultado positivo para o gene *glgC*, sendo que uma apresentou amplificação também para o gene *speC*. Este tipo de resultado pode indicar como biovar Gallinarum, novos estudos deverão ser realizados para confirmação do resultado sorológico desta amostra. A tabela 2 apresenta os resultados obtidos com os 91 isolados de *Salmonella*, conforme o sorotipo encontrado.

Tabela 2: Detecção de amostras de *Salomonella* por PCR em tempo real para o gene *invA* e caracterização das mesmas por PCR convencional através dos genes *glgC* e *speC*

Sorotipo	n	<i>invA</i>	<i>glgC</i>	<i>speC</i>
Gallinarum	10	+	+	+
Pullorum	8	+	-	+
Enteritidis	6	+	-	-
Enteritidis	1	+	+	-
Typhimurium	10	+	-	-
Outro	52	+	-	-
Outro	3	+	+	-
Outro	1	+	+	+
Total	91			

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram alta concordância entre a detecção específica por PCR e as análises sorológicas (100% e 98,9% para os biovars Pullorum e Gallinarum, respectivamente).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra a efetividade dos testes de PCR na detecção específica de isolados de *Salmonella* de sorotipos associados a surtos de tifo aviário e pulorose em aves no Brasil. Estes procedimentos são uma alternativa eficiente para a identificação dos principais biovars associados ao tifo aviário e à pulorose, 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.

REFERÊNCIAS

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., v.147, p.181-185, 2011.

SOMET, 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.], Cap.5, p.294-298, 1994.