



ANÁLISE GENÉTICA E GENÔMICA DE ISOLADOS DE *SALMONELLA* DO SOROTIPO GALLINARUM DE CASOS DE TIFO AVIÁRIO NO BRASIL

Silvia De Carli¹

Fernanda Kieling Moreira Lehmann²

Nilo Ikuta³

Vagner Ricardo Lunge^{3,4}

Resumo

As doenças infecciosas aviárias são de grande importância em toda a cadeia de produção, pois causam perdas econômicas significativas. Entre estas, o tifo aviário e a pulorose são infecções causadas pelo sorotipo Gallinarum e Pullorum que apresentam altos índices de mortalidade em criações de aves. Surto deste sorotipo têm aparecido com frequência no Brasil e outros países da América do Sul nos últimos anos. O objetivo do presente estudo foi realizar análises genéticas e genômica de isolados de *Salmonella* Gallinarum de surtos de tifo aviário/pulorose que ocorreram no Brasil nos últimos três anos. Inicialmente foram obtidas 18 amostras do sorotipo Gallinarum, sendo 10 do biovar Gallinarum e oito do biovar Pullorum. O DNA destas amostras foi extraído e amplificado para diferentes alvos genéticos (*invA*, *fliC g*, *fliC i*, *sefA*, *pefA* e *spvC*). O DNA de uma amostra foi selecionado para sequenciamento do genoma através do equipamento Illumina. Os resultados demonstraram que o genoma completo possui 4.718.352 bp. Na comparação com a cepa de referência Brasileira 287/91 verificou-se um alto grau de concordância (99,8%). A análise de polimorfismos de nucleotídeo único – SNPs em comparação com uma sequência genômica de uma cepa Brasileira depositada no GenBank (287/91) possibilitou a identificação de 795 SNPs ao longo do genoma.

Palavras-chave: *Salmonella* Gallinarum; Polimorfismo de nucleotídeo único-SNP; Virulência.

INTRODUÇÃO

A avicultura é uma importante atividade econômica no Brasil. A carne de frango é atualmente o produto de origem animal mais consumido no país, o segundo item nas exportações do agronegócio. O Brasil embarca anualmente em torno de quatro milhões de toneladas de carne de frango, quase um terço da produção total (ABPA, 2015).

As doenças infecciosas aviárias são de grande importância em toda a cadeia de produção, pois causam perdas econômicas significativas. Entre estas, destacam-se as salmoneloses que, além de serem responsáveis por doenças aviárias específicas (tifo aviário e pulorose), também tem impacto na saúde pública. A *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e possui três espécies principais: *Salmonella subterranea*, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Especificamente *Salmonella enterica* possui 2.610 sorotipos (Park; Ricke, 2014; Batista et al., 2015), entre os quais Gallinarum. Este sorotipo apresenta dois biovars (Gallinarum e Pullorum) que são responsáveis pelo tifo aviário e pulorose, respectivamente. Estas salmoneloses possuem transmissão vertical e apresentam sinais clínicos parecidos (apatia, anorexia, diarreia amarelo-esverdeada, queda da postura e morte

¹ Aluna do curso de Medicina Veterinária - Bolsista PROBIC/FAPERGS – silvia.decarli@hotmail.com

² Laboratório de Diagnóstico Molecular – ULBRA – fernandakieling@gmail.com

³ Professor do PPGBioSaúde – vagner.lunge@gmail.com

⁴ Orientador

em poucos dias), porém atuam em diferentes idades, com o tifo ocorrendo em aves adultas e a pulorose em aves jovens (Kanget al., 2011; Murray et al., 1999).

No início do século XX o sorotipo Gallinarum se tornou endêmico na Europa e nas Américas, causando altas perdas econômicas nas criações comerciais. A erradicação deste sorotipo foi possível com a implementação de programas de vigilância e vacinação em diversos países (Rabschet al., 2000). No início deste século, surtos de tifo aviário e pulorose voltaram a ocorrer no Brasil, em outros países da América do Sul e continentes (América Central, África e Ásia). Especificamente no Brasil, dados extraoficiais demonstram a ocorrência de 51 surtos em diferentes tipos de categorias de aves (galinhas reprodutoras, frangos de corte, perus, aves caipiras, entre outros) e diversos estados (RS, SC, PR, SP, MS, MG e GO) entre os anos de 2010 e 2013. Isso sem contar inúmeros surtos não comunicados. O motivo desta “reemergência” ainda é muito estudado, sendo levantadas as seguintes possibilidades: latência desta bactéria em aves de “fundo de quintal” (criações de subsistência com menor rigor de biossegurança), não erradicação de animais sintrópicos e do cascudinho (potenciais reservatórios de *Salmonella*) nas dependências industriais e conversão da cepa vacinal atenuada 9R em virulenta (Martins, 2015; Kwon et al., 2011).

Com o intuito de erradicar Gallinarum das criações avícolas, várias normativas foram estabelecidas para lidar com o destino das aves. No Brasil, o controle do tifo aviário é regulamentado pela Instrução normativa nº 10, de 26 de abril de 2010, que determina a eliminação de todos lotes positivos para Gallinarum (visa erradicação). A vacinação só é permitida para aves poedeiras comerciais entre 12 a 15 semanas de vida, sendo que reprodutoras devem possuir o status de livre deste sorotipo.

A detecção convencional de *Salmonella* é realizada por isolamento bacteriano seguido de avaliações bioquímicas e sorológicas (ANVISA). Ferramentas moleculares (como a reação em cadeia da polimerase - PCR) também podem ser utilizadas, tanto para a confirmação da espécie como para caracterização do sorotipo. Os testes mais usuais para detecção da espécie são baseados no gene *invA*. Por outro lado, a avaliação de sorotipos e/ou características de patogenicidade/virulência requer a detecção de outros alvos, tais como genes de antígenos flagelares (*fliC i*, *fliC g*), fímbrias (*pefA*, *sefA*) e plasmídios (*spvC*) (Bhatta et al., 2007; Friedrich et al., 1993; Kang et al., 2011; Turcotte e Woodward, 1993; Zhang et al., 2015).

Atualmente novas metodologias de análise genômica estão disponíveis (denominadas NGS, *Next-Generation Sequencing*) e possibilitam uma caracterização genética mais ampla de bactérias (presença de diversos genes de virulência, ocorrência de plasmídios, inserções e deleções, polimorfismos de nucleotídeo único - SNPS, etc). Estas técnicas fornecem informações poderosas para comparação de isolados, rastreamento da origem de cepas, perfil de virulência, resistência a antimicrobianos e a evolução genética de patógeno ao longo dos anos (Faison et al., 2014).

O objetivo do presente estudo foi realizar análises genéticas e genômica de isolados de *Salmonella* Gallinarum de surtos de tifo aviário/pulorose que ocorreram no Brasil nos últimos três anos.

MATERIAIS E MÉTODO

Amostras

A partir de 91 amostras de diversos sorotipos de *Salmonella* isoladas de aves de sete estados do Brasil (SC, RS, PR, DF, SP, BA e GO) entre os anos de 2011 e 2014, foram obtidas 18 amostras do sorotipo Gallinarum. Estas salmonelas foram isoladas a partir de

órgãos de aves oriundas de três categorias de produção (genética, matrizes e frango de corte). Dez isolados foram caracterizados como biovar Gallinarum e oito como biovar Pullorum.

Detecção de *Salmonella*

A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura conforme descrito por Soumetet al. (1994), com adaptações. O DNA destas amostras foi então submetido à amplificação para detecção do gene *invA* por PCR em tempo real o equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems), utilizando condições preestabelecidas: 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 dos resultados foi visualizada diretamente no equipamento através de curvas de amplificação e valores de Ct (*cyclethreshold*).

Detecção de genes específicos

As amostras foram então amplificadas por PCR convencional para detecção de genes de antígenos de superfície (*fliC i* e *fliC g*) e de virulência (*sefA*, *pefA* e *spvC*) no equipamento *Veriti96WellThermalCycler*(Applied Biosystems) As condições de amplificação foram: 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 final a 72°C por 5min por PCR convencional. Os produtos amplificados foram detectados através de eletroforese em gel de poliacrilamida e foram considerados positivos quanto apresentaram fragmentos de DNA de tamanho esperado (*fliC i* 223-238 bp, *fliC g* 466 bp, *sefA* 119bp, *pefA* 382-388 bp e *spvC* 567bp).

Avaliação genômica

A extração do DNA para sequenciamento genômico foi realizada através do kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit – Invitrogen (Applied Biosystems by Life Technologies Co, Foster City, CA, USA), conforme as indicações do fabricante. O genoma foi sequenciado no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) na plataforma MiSeq sequenciamento (Illumina). Os dados foram reunidos pela ferramenta *de novo* no BaseSpaceCloud (Illumina) pela montagem *SPAdes* genome (versão 3.0).

A análise do genoma está sendo realizada através do software Geneouis versão 8.1.6 (Kearse et al., 2012). Utilizou-se como referência a sequencia 287/91 de um isolado brasileiro (Thomson et al., 2008).Até o momento realizou-se o rastreo e mapeamento de SNPs ao longo do genoma comparado a cepa de referência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detecção de genes de virulência

Todas as amostras apresentaram resultado positivo para o gene *invA*, confirmando serem isolados de *Salmonella*, e foram utilizadas para amplificação dos demais genes (Tabela 1).

Tabela 1. Amostras de *Salmonella*Gallinarume Pullorumutilizadas no estudo e detecção de genes específicos.

Biovar	Estado	Categoria	<i>InvA</i>	<i>fliC i</i>	<i>fliC g</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>	<i>glgC</i>	<i>speC</i>	<i>spvC</i>
Gallinarum	RS	Matriz	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos
Gallinarum	RS	Matriz	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos
Gallinarum	RS	Matriz	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg
Gallinarum	RS	Matriz	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos
Gallinarum	SC	Frangos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos
Gallinarum	RS	Matriz	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg
Gallinarum	RS	Matriz	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg
Gallinarum	RS	Matriz	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos
Gallinarum	RS	Matriz	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	NR
Gallinarum	RS	Matriz	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	NR
Pullorum	SC	Frangos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
Pullorum	SC	Frangos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
Pullorum	SC	Frangos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
Pullorum	RS	Frangos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos
Pullorum	SP	Genética	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	NR
Pullorum	SP	Genética	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	NR
Pullorum	DF	Matriz	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	NR
Pullorum	DF	Matriz	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	NR

Análise genômica

Uma amostra de biovar Gallinarum foi escolhida para sequenciamento genômico. Os resultados demonstraram que o genoma completo possui 4.718.352 bp. Na comparação com a cepa de referência Brasileira 287/91 verificou-se um alto grau de concordância (99,8%).

A análise de SNPS foi realizada através de uma ferramenta do programa Geneious e contou-se a presença de 795 variações ao longo do genoma, quando comparado à sequência de referência. Estas variações dividiram-se entre 350 SNPs de transição (uma única alteração de transição de nucleótidos comparada à sequência de referência), 195 SNPs de tranverso (uma única alteração de transversão nucleotídica), SNPs (uma única posição), 197 substituições (uma alteração de dois ou mais nucleótidos adjacentes), 29 inserções (um ou mais nucleótidos inserido sem relação à sequência de referência) e 24 deleções (um ou mais nucleótidos deletados).

Verificou-se uma grande deleção de 6.526bp ao comparar a sequência do presente estudo com a cepa de referência 287/91, esta região corresponde ao operon flagelar *srfABC*, este conjunto de genes é controlado pelo operon principal *flhDC* que está no topo da hierarquia transcricional, onde a decisão fundamental para produzir flagelos é controlada. Frye et al. (2006) avaliaram novos genes flagelares de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium através da expressão genética e constataram que o operon *srfABC* pode estar relacionado com a virulência do gênero *Salmonella* e sua patogenicidade esta diretamente relacionada ao *flhDC*. Devido à *Salmonella* Gallinarum ser imóvel, possivelmente ocorreu à perda destes genes flagelares responsáveis pela motilidade da bactéria através da evolução genética por redução de genes (Batista et al., 2015). Novas análises estão sendo realizadas para completa elucidação do genoma de *Salmonella* Gallinarum, bem como o sequenciamento de outras amostras para ampliação do estudo.

CONCLUSÃO

Até o momento verificou-se que o sequenciamento de próxima geração possibilita uma gama de análises, assim, aumentando a possibilidade de investigação da origem de surtos através do rastreamento de SNPs para caracterizar a evolução genética. A amostra estudada até o presente momento apresentou alto grau de similaridade a cepa de referência, isto indica que não ocorreu muita divergência entre de um surto de tifo aviário de 1991 para 2014.

Para completa elucidação dessas diferenças comparações com outras sequências de referências disponíveis no GenBank estão sendo elaboradas, bem como o estudo das novas ferramentas moleculares para maximizar e otimizar o seu uso. Espera-se concluir a análise de SNPs das sequências de Gallinarum disponíveis para acesso e posteriormente construção de uma árvore filogenética.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/resumo>. Acesso em: 06/07/2015.
- Bhatta, D. R., Bangtrakulnonth, A., Tishyadhigama, P., Saroj, S. D., Bandekar, J. R., Hendriksen, R. S., Kapadnis, B. P. Serotyping, PCR, phage-typing and antibiotic sensitivity testing of *Salmonella* serovars isolated from urban drinking water supply systems of Nepal. *Lett Appl Microbiol*, v. 44, n. 6, p.588-594, jun. 2007.
- Batista, D. F.; Freitas Neto, O. C.; Barrow, P. A.; Oliveira, M. T.; Almeida, A. M.; Ferraudo, A. S.; Berchieri, A. Jr. Identification and characterization of regions of difference between the *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum and the *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum genomes. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 30, p. 74-81, mar. 2015.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2013. Website: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/fafd86004fe4d5d49622feece77a031c/Modulo+004.pdf?MOD=AJPERES&attachment=true&id=1370521896924>. Acesso em: 06/07/2015.
- Faison, W. J., Rostovtsev, A., Castro-Nallar, E., Crandall, K. A., Chumakov, K., Simonyan, V., Mazumder, R. Whole genome single-nucleotide variation profile-based phylogenetic tree building methods for analysis of viral, bacterial and human genomes. *Genomics*, v. 104, n.1, p. 1-7, jul. 2014.
- Friedrich, M. J.; Kinsey, N. E.; Vila, J.; Kadner, R. J. Nucleotide sequence of a 13,9kb segmente of the 90kb virulence plasmid of *Salmonella* Typhimurium: the presence of fimbrial biosynthetic genes. *Molecular microbiology*, v. 8, n. 3, p. 543- 558, oct. 1993.
- Frye, J., Karlinsey, J. E., Felise, H. R., Marzolf, B., Dowidar, N., McClelland, M., Hughes, K. T. Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, v. 188, n. 6, p. 2233-2243, mar. 2006.
- Kang, M. S., Kwon, Y. K., Jung, B. Y., Kim, A., Lee, K. M., An, B. K, Song, E. A., Kwon, J. H., Chung, G. S. Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes. *Vet microbiol*, v. 147, n. 1-2, p. 181-185, jan. 2011.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A.

Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, n. 12, p. 1647-1649. 2012.

Kwona, H., Cho, S. Pathogenicity of SG 9R, a rough vaccine strain against fowl typhoid. *Vaccine*. v. 29, n. 6, p. 1311-1318, fev. 2011.

Martins, P. Uso de antimicrobianos na prevenção e controle das infecções paratífoides em aves. In: Salão internacional de avicultura e suinocultura, 143., 2015. São Paulo. Anais... São Paulo: CD, 2015. p. 143-161.

Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. Manual of Clinical Microbiology: Gram-negative bacteria. 7^a edição. Washington: American Society for Microbiology, 1999. 1773 p.

Park, S. H., Ricke, S. C. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, *Sal.* Enteritidis, *Salm.* Heidelberg and *Salm.* Typhimurium. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, n.1, p. 152-160, jan.2014.

Rabsch, W., Hargis, B. M., Tsois, R. M., Kingsley, R. A., Hinz, K. H., Tschäpe, H., & Bäuml, A. J. Competitive exclusion of *Salmonella* enteritidis by *Salmonella* gallinarum in poultry. *Emerging Infectious Diseases*, v. 6, n. 5, p. 443-448, sep-oct. 2000.

Soumet, C.; Ermel, G.; Fach, P.; Colin, P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, volume 19, capítulo 5, p. 294-298. 1994.

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 Res.* v. 18, n.10, p. 1624-1637, oct. 2008.

Turcotte, C., Woodward, M. J. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. *J Gen Microbiol*, v. 139, n. 7, p. 1477-1485, jul. 1993.

Zhang, S., Yin, Y., Jones, M. B., Zhang, Z., Deatherage Kaiser, B. L., Dinsmore, B. A., Fitzgerald, C., Fields, P. I., Deng, X. *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *J Clin Microbiol*, v. 53, n. 5, p. 1685-1692, may. 2015.