



DETECÇÃO DE *SALMONELLA* E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA MOLECULAR DE SURTOS DE PULOROSE E TIFO AVIÁRIO NO BRASIL

Nathalie de Souza Zanetti¹

Silvia De Carli¹

Diéssy Kipper²

Fernanda Kieling Moreira Lehmann²

Nilo Ikuta³

Vagner Ricardo Lunge³

Resumo

A *Salmonella* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* classificada em mais de 2.500 sorotipos. Alguns destes sorotipos infectam aves e estão associados às gastroenterites, mas apenas o sorotipo Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum, causam tifo aviário e pulorose, respectivamente. Surtos destas doenças com elevada mortalidade e grandes prejuízos têm acometido granjas avícolas do Brasil nos últimos anos. O avanço destas infecções tem sido controlado com programas de biossegurança e imunização com vacina viva específica (cepa SG9R) nos lotes em produção. Os objetivos deste trabalho foram (1) detectar genes associados aos biovars do sorotipo Gallinarum em isolados de *Salmonella* de aves e (2) identificar a cepa SG9R em amostras de lotes de produção comercial (vacinados ou não). Foram obtidos 9 1 isolados de *Salmonella* previamente sorotipados e provenientes de aviários não vacinados do Brasil, e 50 amostras de lotes com suspeita de tifo aviário/pulorose submetidos ou não à vacinação. A metodologia consistiu na extração de DNA de todos isolados/amostras, detecção genérica de *Salmonella* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (gene *invA*) e detecção específica dos biovars Gallinarum e Pullorum pela análise de quatro genes (*sefA*, *fliCg*, *glgC* e *speC*). As 50 amostras de lotes suspeitos foram submetidas a uma etapa adicional de amplificação por PCR para detecção específica de SG9R. Os resultados mostraram que todos isolados apresentaram amplificação do gene *invA*, confirmando que as culturas eram *Salmonella*. Os dez isolados do biovar Gallinarum apresentaram resultado positivo em todos os demais PCRs (*sefA*, *fliCg*, *glgC* e *speC*) enquanto os oito isolados de Pullorum apresentaram resultado positivo em três PCRs (*sefA*, *fliCg* e *speC*). Os isolados de outros sorotipos apresentaram outros perfis de detecção, possibilitando a diferenciação. A análise das 50 amostras de lotes vacinados demonstrou a ocorrência de 31 isolados do biovar Gallinarum, sendo 20 de SG9R e 19 de outras salmonelas. Em conclusão, o presente estudo demonstra a aplicação de testes específicos para a detecção e caracterização dos isolados de sorotipos associados a surtos de tifo aviário e pulorose em aves.

Palavras-chave: *Salmonella*; Gallinarum; PCR.

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Salmonella* são responsáveis por doenças em aves de produção industrial. Atualmente são conhecidos mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella*, e 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, 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.

O tifo aviário é uma infecção sistêmica aguda ou crônica que afeta as aves de todas as idades, em especial as aves adultas, com mortalidade variável entre 40 e 80%, causando

¹ Alunas do curso de graduação em Medicina Veterinária Ulbra – Bolsista PIBIC/CNPq – natha.aa@hotmail.com

² Pesquisadora no Laboratório de Diagnóstico Molecular (LDM) Ulbra

³ Professor- pesquisador no LDM Ulbra – vagner.lunge@gmail.com

hepatoesplenomegalia, anemia e nas últimas fases hemorragia do trato intestinal. A pulorose é uma doença sistêmica aguda que acomete principalmente as aves jovens, nas três primeiras semanas de vida, causando a chamada “diarréia branca dos pintinhos”, com mortalidade variável, podendo atingir 100% do lote (SAIF et al., 2008).

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 SG9R) e inativadas (BERCHIERI JUNIOR et al., 2000).

Apesar da adoção de medidas de biossegurança, inúmeros casos de pulorose e tifo aviário têm sido reportados no Brasil nos últimos anos. Foram oficialmente registrados 92 surtos de tifo aviário (n=82) e pulorose (n=10) entre 2004 e 2008 (BARROW; FREITAS NETO, 2011). Ainda, de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), entre os anos de 2010 e 2015, foram relatados alguns surtos de tifo aviário, mas sem dados quantitativos, embora tenha sido descrito que, entre fevereiro e abril 2012 ocorreram 4 surtos no estado do Paraná e 2 em Santa Catarina. Enquanto isso, a pulorose foi registrada com 5 surtos no ano de 2010; 2 surtos em 2012 sendo um em Goiás e outro em Santa Catarina; em 2014 um surto no Mato Grosso; em 2011 e 2015 foram apenas relatados sem dados quantitativos.

O diagnóstico das salmoneloses é realizado pela associação da anamnese, achados clínicos e anatomopatológicos. Sempre é necessária a análise laboratorial, que envolve a coleta de amostras, a análise bacteriológica visando a obtenção de isolados e caracterização sorológica e/ou molecular das bactérias isoladas. O material para análise pode ser colhido de diversos órgãos como baço, fígado, ovários e conteúdo intestinal. Pode-se colher fragmentos ou swabs, colocados em caldos seletivos, de enriquecimento, ou em placas de ágar, que devem ser incubados a 37°C por 16 a 18 horas (overnight), observando-se colônias compatíveis com as do gênero *Salmonella*. A seguir, no exame sorológico os antígenos somáticos O, e os antígenos flagelares H são utilizados nas provas de aglutinação para a determinação do sorotipo de *Salmonella* de acordo com a sua fórmula antigênica. O sorotipo Gallinarum contém antígenos somáticos O 12, 9 e 1 e não contém antígenos flagelares H, associados à motilidade, gerando a fórmula antigênica 1,9,12:-:-. Contudo, não é possível discriminar antigenicamente os isolados dos biovars Gallinarum e Pullorum. Neste caso, os isolados são diferenciados pelas provas bioquímicas de fermentação de dulcitol e de utilização da ornitina. Cepas do biovar Gallinarum normalmente fermentam o dulcitol, porém são incapazes de utilizar ornitina, já isolados do biovar Pullorum apresentam o comportamento inverso. No entanto, algumas cepas apresentam comportamento atípico (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009).

Desde os anos 90, os ensaios de biologia molecular têm sido utilizados para detectar e identificar os sorotipos de *Salmonella*. PCRs para os genes alvos *invA*, *sefA* e *fliC* foram usadas para detectar os principais sorotipos relacionados às aves (DORAN et al., 1996, ITOH et al, 1997;. SOUMET et al, 1999;. OLIVEIRA et al, 2002). Além disso, o gene *pefA* foi detectado em plasmídeos dos sorotipos Typhimurium e Enteritidis (WOODWARD et al., 1996). Mais recentemente, os ensaios de PCR para a detecção específica dos biovars Gallinarum e Pullorum, bem como para a cepa vacinal SG9R foram desenvolvidos com base nas mutações específicas (polimorfismos de um único nucleótido, deleções e/ou inserções) nos genes *speC* e *glgC* (KANG et al ., 2011, 2012).

Os objetivos deste estudo foram detectar os genes associados aos biovars Gallinarum e Pullorum do sorotipo Gallinarum, de 91 isolados de *Salmonella* de aves, nos últimos anos no Brasil. Além disso, identificar a cepa SG9R em amostras de lotes de produção (vacinados ou não) através de ensaios de PCR específicos.

METODOLOGIA

Amostras bacterianas:

Foram obtidos 91 isolados de *Salmonella* a partir de 40 diferentes lotes de produção de aves de granjas localizadas em sete estados do Brasil: Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), Distrito Federal (DF), São Paulo (SP), Bahia (BA) e Goiás (GO), entre os anos de 2011 e 2015. Um total de 18 isolados eram do sorotipo Gallinarum, sendo 10 do biovar Gallinarum e 8 do biovar Pullorum.

Os demais 73 isolados eram dos sorotipos Enteritidis (n=7), Typhimurium (n=10), e de outros sorotipos não determinados (n=56). Também foram obtidos 50 isolados de lotes vacinados ou não, com a cepa vacinal Gallinarum SG9R em surtos recentes (entre 2013 e 2015).

Foram também obtidas amostras de referência do sorotipo Gallinarum (ATCC e Instituto Adolfo Lutz) e duas vacinas comerciais de *Salmonella* Gallinarum SG9R (Ceva Saúde Animal Ltda, Laboratório Biovet).

Extração de DNA:

A extração de DNA dos isolados foi realizada pelo método de fervura como previamente descrita por Soumet et al., 1994, com algumas adaptações.

Deteção de Salmonella por PCR em tempo real:

As amostras de DNA extraídas foram submetidas para detecção genérica de *Salmonella* usando PCR em tempo real no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) através do gene *invA* (OLIVEIRA et al., 2002). Os ensaios de PCR foram preparados utilizando um kit de amplificação comercial (SalmAmp New Gene, Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brasil). 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, cycle threshold).

Deteção dos genes *pefA*, *sefA*, *fliCg* e *fliCi*:

As amostras foram submetidas à amplificação por PCR convencional (Veriti 96 Well Thermal Cycler – Applied Biosystems) utilizando iniciadores específicos para os alvos *pefA*, *fliCg*, *fliCi* (Tabela 1) e *sefA* (Oliveira et al., 2002) nas seguintes condições: 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.

2.5 Deteção específica dos biovars Gallinarum e Pullorum por PCR:

As amostras foram analisadas por dois 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. Além disso, o gene *glgC9R* da cepa vacinal 9R (KANG et al., 2011; KANG et al., 2012).

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; KANG et al., 2012).

Tabela 1: Descrição dos *Primers* desenvolvidos neste estudo

Gene alvo	Sequência de <i>Primers</i> (5' - 3')	Produto de amplificação (bp)	Referências
<i>pefA</i>	TGACCACTTCTGTCAACGGCG GCCACAGATTTGAAGTCACCTTC	382-388	Neste estudo
<i>fliCg</i>	GGTACCGCTGAAGCCAAAGCG CTGCGGCAGCGTCTTCATTGA	466	Neste estudo
<i>fliCi</i>	TTACGCCAAAGTTACCGTTACGGG CTTAACAACAGATGCTGTGCCGGT	223-238	Neste estudo

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detecção dos genes associados aos biovars do sorotipo Gallinarum dentre os 91 isolados de *Salmonella* obtidos de granjas avícolas do Brasil:

Todos isolados apresentaram resultado positivo na detecção genérica de *Salmonella* pela PCR em tempo real através do gene *invA*. Na detecção dos genes *pefA*, *sefA*, *fliCg* e *fliCi*, os dez isolados do sorotipo Gallinarum biovar Gallinarum foram positivos para os alvos *fliCg* e *sefA*, bem como os oito isolados do sorotipo Gallinarum biovar Pullorum.

Na análise com os PCRs específicos, os dez isolados do biovar Gallinarum foram positivos para os dois alvos (*glgC* e *speC*), enquanto os oito do biovar Pullorum foram positivos para somente um alvo (*speC*), possibilitando a diferenciação destes biovars entre si.

Os demais sorotipos apresentaram um perfil genético diferente, das sete amostras do sorotipo Enteritidis, 4 obtiveram resultado positivo para os alvos *fliCg* e *sefA*, enquanto 3 apresentaram amplificações para um alvo a mais, o gene *pefA*. Os dez isolados do sorotipo Typhimurium apresentaram resultado positivos para os genes *fliCi* e *pefA*. Os restantes dos 56 isolados de sorotipos indeterminados apresentaram um perfil genético diversificado e separados em 9 padrões de acordo com o perfil genético de cada um (Tabela 2).

Tabela 2: Perfil genético molecular dos 56 isolados de *Salmonella* de sorotipos indeterminados

Sorotipo	Padrão	N	<i>invA</i>	<i>fliCi</i>	<i>fliCg</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>	<i>glgC</i>	<i>speC</i>
Outro sorotipo (indeterminado)	I	37							
	II	6							
	III	5							
	IV	2							
	V	2							
	VI	1							
	VII	1							
	VIII	1							

	IV	1							
Total	56	56	3	8	7	5	0	0	

¹O círculo preto indica que o gene foi detectado no isolado de *Salmonella*, enquanto o círculo branco indica que o gene estava ausente.

Identificação da cepa SG9R em 50 amostras de lotes de produção comercial (vacinados ou não):

As técnicas foram então utilizadas na análise de 50 isolados de galinhas com doença clínica típica de tifo aviário. Na análise dos resultados, verificou-se a ocorrência de 31 isolados do biovar Gallinarum, sendo 20 da cepa SG9R. Os outros 19 isolados apresentaram resultado negativo para o sorotipo Gallinarum, mas positivo para *Salmonella* (gene *invA*), indicando a ocorrência de outros sorotipos. 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 SG9R da cepa de campo que tem circulado no país.

CONCLUSÕES

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 SG9R) podendo substituir os métodos bioquímicos e sorológicos atualmente utilizados.

REFERÊNCIAS

- BARROW, P.A.; FREITAS NETO, O.C. Pullorum disease and fowl typhoid- new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, v.20, cap.40, p.1-13. feb. 2011.
- 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.
- DORAN, J.L. et al. Diagnostic potencial of *sefA* DNA probes to *Salmonella enteritidis* and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. **Molecular Cellular Probes**, v.10, p. 233-246, 1996
- ITOH, Y. et al. Application of *rfbE* and *fliC* Genes by Polymerase Chain Reaction for Identification and Detection of *Salmonella* Enteritidis, Dublin and Gallinarum-Pullorum. **Microbiology and Immunology**, v.41, p.791-794. 1997.
- 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**, v.147, p.181-185, jan. 2011.
- 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**, v.160, p.491-495, may. 2012.
- OLIVEIRA, S.D. et al. Detection and identification of salmonelas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.25-35, 2002.
- SAIF, Y. M. et al. Diseases of Poultry. In: GAST, R.K.; SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. **Salmonella Infections**.12.ed.Oxford: Blackwell Publishing, 2008. cap.16, p.619-636.
- 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**, cap.5, p.294-298, 1994.

SOUMET, C. et al. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.1-6, 1999.