



ANÁLISE DE GENOMA COMPLETO REVELA A ORIGEM DE *SALMONELLA* GALLINARUM DE CASOS RECENTES DE TIFO AVIÁRIO NO SUL DO BRASIL

Silvia De Carli^{1,2}
Tiago Gräff²
Nathalie Zanetti²
Diéssy Kipper²
Fernanda Kieling Moreira Lehmann²
André K. Salvador³
Nilo Ikuta^{2,3}
Vagner Ricardo Lunge^{2,3,4}

Resumo

Cepas de *Salmonella* sorotipo Gallinarum são patógenos de aves e causam tifo aviário (TF) e pulorose (PU). *S. Gallinarum* isolada de surtos recentes que ocorreram no Brasil foram analisadas e demonstraram relação entre si pelo estudo de regiões intergênicas de genes de RNAs ribossomais. O sequenciamento de genoma completou revelou que esses isolados de surtos recentes são filogeneticamente relacionados com uma cepa ancestral circulante há muitos anos no país.

Palavras-chave: Genoma; *SNP-calling*; Genética.

INTRODUÇÃO

Tifo aviário (TF) e Pulorose (PU) são as doenças aviárias causadas por *Salmonella* enterica subsp. enterica do sorotipo Gallinarum (*S. Gallinarum*). Este sorotipo é dividido nos biovars Gallinarum (associada ao TF) e Pullorum (associada à PU). Aves com estas doenças apresentam infecção sistêmica com vários sinais clínicos. Lotes de aves comerciais são acometidos por variável morbidade e elevada mortalidade, com perdas econômicas significativas (BARROW; NETO, 2011; GAST, 2008; SHIVAPRASAD, 2000). No Brasil, um programa governamental (Programa Nacional de Sanidade Avícola, PNSA) foi implementado para controle desses patógenos em todo país, sendo bastante eficaz para reduzir os surtos entre 1994-2006 (MAPA, 2003). No entanto, mais de cem surtos (principalmente de TF) foram relatados no Brasil e outros países da América do Sul nos últimos anos (OIE, 2016). Duas possibilidades foram levantadas para explicar o ressurgimento do TF: (i) reversão da cepa da vacina viva 9R (intensivamente utilizada para controlar *S. Gallinarum* no campo) para uma forma virulenta (KWON; CHO, 2011; VAN IMEERSEEL et al., 2013; SMITH, 1956) e (ii) falha no programas de biossegurança e negligência nas medidas de higiene (PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2014; SECUNDO DE SOUZA et al., 2015). O presente estudo teve como objetivo detectar e caracterizar isolados de *S. Gallinarum* obtidos de casos recentes de TF no Sul do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Onze amostras de *S. Gallinarum* foram isoladas a partir de lotes de aves com sinais clínicos de TF e/ou PU no Sul do Brasil (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), de 2013 a

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

²Laboratório de Diagnóstico Molecular – ULBRA – Canoas

³Símbios Biotecnologia – Cachoeirinha

⁴Professor do curso de graduação Medicina Veterinária – vagner.lunge@gmail.com

2014. O isolamento bacteriológico foi realizado por enriquecimento em água peptonada tamponada (BPW) em 36°C durante 24 h, seguido de enriquecimento seletivo de caldos de Rappaport-Vassiliadis e tetrionato a 43°C durante mais 24 h. Depois disso, eles foram plaqueados em ágar MacConkey e as colônias típicas foram observadas depois de 24 h a 36°C. Estes isolados foram sorotipados de acordo com o esquema de Kauffman-White (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014) e testados para descarboxilação da ornitina e lisina, produção de sulfureto de hidrogênio, decomposição da uréia, e a utilização de sacarose, lactose, maltose, e citrato (BARROW; NETO, 2011; BOPP, 1999; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Também foram obtidos dois isolados de referência de *S. Gallinarum* (ATCC e Instituto Adolfo Lutz) e duas vacinas comerciais *S. Gallinarum* SG9R CEVAC® e BIO-gallinarum 9R (Biovét laboratório).

Extração de DNA e ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR)

A extração de DNA foi realizada pelo método da fervura conforme descrito por Soumet et al. (1994). O gene *invA* foi utilizado como um teste de triagem para *Salmonella* (HOORFA et al., 2000). Três reações de PCR independentes com pares de primers específicos direcionados para o gene *speC* dos Biovares Pullorum e Gallinarum, o gene *glgC* do biovar Gallinarum e o gene *glgC* da cepa vacinal SG9R (*glgC* 9R) foram realizadas de acordo com trabalhos anteriores (KANG et al., 2011; KANG et al., 2012). Além disso, a região intergênica do operon *rrnH* foi amplificada e sequenciada conforme descrição prévia (PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2014).

Análises genômicas

O sequenciamento do genoma e análise foi demonstrado em estudo anterior (CARLI et al., 2016). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram avaliados em genes específicos de *S. Gallinarum* e comparados com cepas de referência de acordo com trabalhos anteriores (VAN IMEERSEEL et al., 2013). A análise filogenética foi gerada pelo software snpTree que utiliza como método a máxima verossimilhança e bootstraps como suporte de clusters (ACCESS et al., 2012) com quatro genomas de Gallinarum (SRR1045126/SG9, AM933173/287-91, SRR1045124/MB4523, SRR1045136/SG9R), três Pullorum (CP003247, CP003786, CP012347) e uma do sorotipo Enteritidis (AM933172), que tem sido descrito como a origem evolutiva do sorotipo Gallinarum (LANGRIDGE et al., 2015).

RESULTADOS

Testes bioquímicos e PCR na detecção dos biovares Gallinarum e Pullorum

Através dos testes bioquímicos seis isolados foram classificados do biovar Gallinarum, enquanto os cinco restantes foram do biovar Pullorum. Estes resultados foram confirmados com os testes específicos de PCR. Todos os seis isolados do biovar Gallinarum foram positivos para os PCRs de *glgC* e *speC*, enquanto os cinco isolados do biovar Pullorum foram positivos apenas para o PCR *glgC*.

Detecção do sorotipo através da análise do operon rrnH

A análise filogenética das regiões intergênicas de genes de RNAs ribossômicas revelou que todos os isolados do biovar Gallinarum formam um mesmo ramo filogenético, apresentando 100% de identidade entre si. Enquanto os isolados do biovar Pullorum apresentaram duas sequências nucleotídicas distintas, ambas diferentes do grupo do biovar Gallinarum, indicando maior diversidade filogenética.

Análise filogenética

O estudo do genoma completo da cepa BR_RS12 e a respectiva análise filogenética mostrou que os isolados do biovar Gallinarum SG 9, SG 9R e MB4523 tem maior semelhança entre si do que com os isolados brasileiros (287/91 e o próprio BR_RS12) (Figura 1). Como os dois genomas de cepas do Brasil estavam em um mesmo ramo filogenético, realizou-se uma análise de variações entre eles. Ocorreram 700 alterações, sendo que destes 136 foram substituições, 25 inserções, 33 exclusão, 353 SNPs de transição e 153 SNPs de transversão.

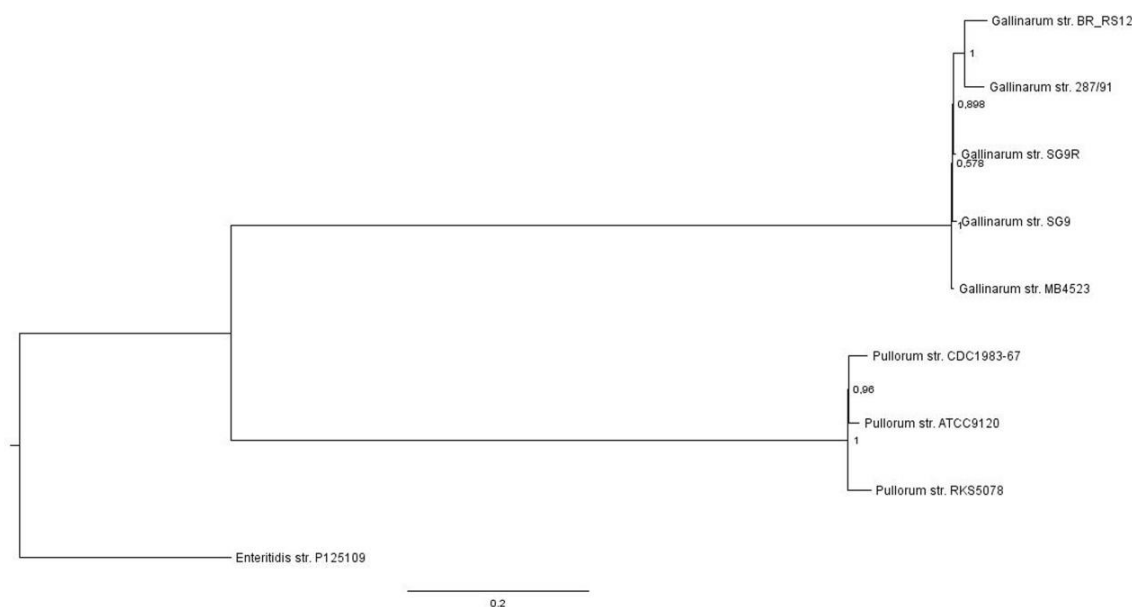


Figura 1. Análise filogenética de genomas dos sorotipos Gallinarum (biovars Gallinarum e Pullorum) e Enteritidis.

Análises de SNPs em genes específicos

Foram avaliados SNPs em onze genes (*aceE*, *rfaJ*, *galT*, *btuB*, *dpaL*, *sseC*, *pegB*, *menC*, *yeo*, *bcsC* e SG4114) associados à reversão da virulência da cepa vacinal (Tabela 1). Observou-se que as duas cepas brasileiras estão mais estreitamente relacionadas entre si do que a cepa virulenta progenitora (SG 9), que se distingue por apenas uma alteração no gene *galT*, alteração também presente na cepa vacinal SG 9R e MB4523. A atenuação da SG9R pode estar relacionada com a mutação nos genes *aceE* e *rfaJ* como previamente descrito por Van Immerseel (2013) e ambos revelaram um padrão diferente em amostras brasileiras daqueles encontrados nas amostras derivadas da vacina. As diferenças de SNPs nestes codons suportam a possibilidade de que a cepa BR_RS12 não é derivada da vacina.

Tabela 1. Alterações genéticas entre as cepas SG9, MB4523, 287/91 e BR_RS12, segundo posições descritas por Van Immerseel (2013).

SNP position	Gene	Strain SG9		Strain SG9R		Strain MB4523		Strain 287/91		Strain BR_RS12	
179676	<i>aceE</i>	aTc	Ile	aAc	Asn	aTc	Ile	aTc	Ile	aTc	Ile
3904242-3	<i>rfaJ</i>	tCA	Tyr	tAA	STOP	tAT	Tyr	tCA	Tyr	tCA	Tyr
817373	<i>galT</i>	Gaa	Glu	Aaa	Lys	Aaa	Lys	Aaa	Lys	Aaa	Lys
3432990	<i>btuB</i>	tCA	Tyr	tAA	STOP	tAA	STOP	tCA	Tyr	tCA	Tyr
1026921	<i>dpaL</i>	aAt	Asn	aAt	Asn	aGt	Ser	aAt	Asn	aAt	Asn
1783872	<i>sseC</i>	aAt	Asn	aAt	Asn	aGt	Ser	aAt	Asn	aAt	Asn
2240972	<i>pegB</i>	atC	Ile	atC	Ile	atA	Ile	atC	Ile	atC	Ile
2398116	<i>menC</i>	Gag	Glu	Gag	Glu	Tag	STOP	Gag	Glu	Gag	Glu
3730062	<i>yeo</i>	cGa	Arg	cGa	Arg	cTa	Leu	cGa	Arg	cGa	Arg
4021808	<i>bcsC</i>	Cag	Gln	Cag	Gln	Tag	STOP	Cag	Gln	Cag	Gln
4345332	SG4114	Gcg	Ala	Gcg	Ala	Acg	Thr	Gcg	Ala	Gcg	Ala
4620917	intergenic	A	-	A	-	G	-	A	-	A	-

DISCUSSÃO

S. Gallinarum é um importante patógeno em lotes de aves comerciais e leva anualmente a elevadas perdas econômicas, descobrir os mecanismos da doença e sua propagação de origem pode ser muito importante para o combate. Van Immerseel (2013) sugeriu a possibilidade de a doença estar sendo causada por reversão da virulência da cepa da vacina. O presente estudo demonstrou que não houve reversão recente de virulência, mas sim a disseminação de cepa de campo. Outro estudo realizado por ERIC-PCR identificou padrões para as cepas atuais de *Salmonella* Gallinarum no Brasil e ao comparar com a vacina encontrou padrões distintos, reforçando a hipótese de que os casos recentes estão sendo causados por cepas de campo que tem se mantido devido à falhas nos programas de biossegurança e negligência nas medidas de higiene (SECUNDO DE SOUZA et al., 2015).

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os eventos que estão ocorrendo no Brasil são devido a uma cepa ancestral brasileira. Esta provavelmente se manteve viável em aves ao longo dos anos e voltou a ser disseminada pela falta de biossegurança. Mais estudos são necessários para completa elucidação da origem dos surtos que ocorrem no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ACCESS, O. snpTree - a web-server to identify and construct SNP trees from whole genome sequence data. , v. 13, n. Suppl 7, p. 1–8, jan. 2012.
- BARROW, P. A; NETO, O. C. F. Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, v. 40, n. 1, p. 1–13, fev. 2011.
- BOPP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. 1999. Gram-negative bacteria: *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*, p 459–474. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (ed), **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed. ASM Press, Washington, DC.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Instrução Normativa n. 78, 03 de novembro de 2003, define as normas técnicas para o controle e certificação de criações avícolas e empresas como livre de *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum e livre de ou controlada para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Diário Oficial da União. Brasília, DF, p. 3–5, de 05 de novembro de 2003.
- CARLI, S. DE; GRÄF, T.; MAYER, F. Q.; et al. Draft Genome Sequence of a *Salmonella* enterica subsp. enterica Serovar Gallinarum bv. Gallinarum Isolate Associated with Fowl Typhoid Outbreaks in Brazil. **Genome announcements**, v. 4, n. 1, p. 1–2, mar. 2016.
- GAST, R. K. 2008. Bacterial diseases: *Salmonella* infection, p 619–636. In Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE (ed), **Diseases of poultry**, 12th ed. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.
- IMMERSEEL, F. VAN; STUDHOLME, D. J.; EECKHAUT, V.; et al. *Salmonella* Gallinarum field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. **Vaccine**, v. 31, n. 43, p. 4940–5, out. 2013.
- ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, set. 2014.
- KANG, M. S.; KWON, Y. K.; JUNG, B. Y.; 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**, v. 147, n. 1-2, p. 181–185, 2011.

KANG, M. S.; KWON, Y. K.; KIM, H. R.; et al. Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 3-4, p. 491–495, abr. 2012.

KWON, H.-J.; CHO, S.-H. Pathogenicity of SG 9R, a rough vaccine strain against fowl typhoid. **Vaccine**, v. 29, n. 6, p. 1311–8, out. 2011.

LANGRIDGE, G. C.; FOOKES, M.; CONNOR, T. R.; et al. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 3, p. 863–868, mar. 2015.

O.I.E - World Organisation for Animal Health. Fowl typhoid [Internet]. World Animal Health Information Database (WAHID). 2016. Disponível em: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail.

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; NASCIMENTO, V. P. DO. Presence of *salmonella enteritidis* and *salmonella gallinarum* in commercial laying hens diagnosed with fowl typhoid disease in Colombia. **Avian Diseases**, v. 58, n. 1, p. 165–170, abr. 2014.

SECUNDO DE SOUZA, A. I.; FREITAS NETO, O. C. DE; BATISTA, D. F. A.; et al. ERIC-PCR genotyping of field isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. **Avian Pathology**, v. 44, n. 6, p. 475–479, fev. 2015.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 405–424, out. 2000.

SMITH, H. W. The use of live vaccines in experimental *Salmonella Gallinarum* infection in chickens with observations on their interference effect. **J Hyg (Lond)**, v. 54, n. 419, set. 1956.