

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR ENTRE *Salmonella enterica*
subsp *enterica* sorovar Pullorum E *Salmonella enterica*
subsp *enterica* sorovar Gallinarum.**

Simone Alves Mendes Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Berchieri Júnior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Área de Patologia Animal)

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SIMONE ALVES MENDES RIBEIRO – Nascida em 20 de dezembro de 1970, natural de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, é formada em Medicina Veterinária no ano de 1994, pela Universidade Federal de Uberlândia. Atualmente inscrita no Conselho Regional de São Paulo sob nº 09973. Ingressou na área avícola em janeiro de 1995, na Cooperativa dos Avicultores de Catalão – GO, na qual assistiu criações de frango de corte. No mesmo período foi representante da Organização das Cooperativas de Goiás (OCG) em reuniões do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Em novembro de 1996 foi contratada pela Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas para trabalhar no Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro-SP) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Desde então, atuante no Setor de Sanidade Aviária, o qual tem suas atividades fundamentadas no PNSA e no controle de qualidade de vacinas utilizadas pela avicultura nacional. Desde maio de 2001 passou a ser responsável pela Área de Bacteriologia do Setor de Sanidade Avícola, função que desempenha até o momento. Em fevereiro de 2004 obteve o Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA (PATOLOGIA ANIMAL) pela UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal ao defender a dissertação “INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Salmonella enterica* SUBSP *enterica* SOROVAR Kottbus EM PINTOS DE CORTE DE UM DIA E EM OVOS FÉRTEIS SPF”.

E-mail: simone_ribeiro2002@yahoo.com.br

Agradeço ao Senhor, Deus Todo Poderoso,

“Tudo tem seu tempo determinado,
e há tempo para todo propósito debaixo do céu”...

... “Sei que tudo quanto Deus faz durará eternamente;
nada se lhe pode acrescentar e nada lhe tirar;
e isto faz Deus para que os homens temam diante Dele.”

(Eclesiastes 3 : 1 , 14)

Dedico

À minha querida filha Isabelle,
que compartilhou seus seis anos de vida com os meus deveres de estudante,
na maioria das vezes sem compreender as razões da caminhada.

Ao bebezinho que em breve estará chegando...
Você já faz parte de nossas vidas.

Ofereço

Ao Denilson, por ser o companheiro de momentos felizes ou não, por toda a admiração profissional que muitas vezes me dá forças para continuar e por participar da concretização deste objetivo.

Ao Norvandir (*in memoriam*) e à Nilde, pais de amor incondicional e que se fazem presente em todos os momentos de minha vida. À minha mãe por toda a disponibilidade e por seu carinho para com minha filha.

À Francielle, por todas as palavras de incentivo que me deram ânimo e força, por me fazer enxergar novos horizontes e por desdobrar-se quando o assunto é sua sobrinha.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, especialmente ao Departamento de Patologia Animal, pela acolhida e aprendizagem.

Ao Prof. Dr. Ângelo Berchieri Júnior, a quem muito admiro, pela orientação, disponibilidade, incentivo, amizade e por toda a preocupação em me ajudar durante todos estes anos.

À Prof^a Dra. Rosangela Zacarias Machado pela atenção dispensada durante a parte experimental.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos por todo o auxílio, dedicação e ensinamentos durante o experimento.

Aos pós-graduandos, orientados pelo Prof. Berchieri, pelo convívio e pela solidariedade.

À D. Cida por todo o auxílio no laboratório. Em especial, por todo o carinho e cuidado a mim dispensados, por abrir as portas de sua casa e incondicionalmente, considerar-me membro de sua família.

Ao Sr. Antônio por todo o auxílio no laboratório e pelo carinho.

À Fundação Oswaldo Cruz e Instituto Adolfo Lutz pela doação de amostras e ao IAL também pela caracterização bioquímica.

À Dra. Sueli Aparecida Fernandes pela colaboração, auxílio e disponibilidade.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro-SP) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela colaboração e estímulo.

À Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Dr. José Guedes Deák e Dr. Abraão Buchatski pelo apoio e incentivo.

À Dra. Maria Ângela Orsi pela amizade, carinho e companheirismo.

Ao André de Oliveira Mendonça por todo o estímulo, compreensão e auxílio, que proporcionaram a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Setor de Sanidade Avícola do Lanagro-SP pelo companheirismo.

Àqueles que, com muito trabalho, contribuíram decisivamente para a realização desta Tese:

- Fábio Zotesso, graduando de veterinária e aluno de iniciação científica, que não mediu esforços para me ajudar. Sem a sua colaboração, grande parte deste trabalho não teria sido realizado;

- Jacqueline Boldrin de Paiva, bióloga presente no laboratório em período integral, por toda a paciência, disponibilidade e auxílio durante o experimento. Agradeço por todo o carinho, preocupação e sincera amizade.

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram não somente para a realização deste trabalho, como também para o meu aprimoramento profissional.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS / SIGNIFICADOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMARY.....	xv
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Amostras utilizadas.....	13
4.2. Diferenciação de <i>Salmonella Pullorum</i> e <i>Salmonella Gallinarum</i> por meio da técnica de PCR do gene <i>rfbS</i>	13
4.2.1. Obtenção do DNA.....	14
4.2.1.1. Extração de DNA segundo SOUMET et al. (1994).....	15
4.2.1.2. Extração de DNA a partir da colônia bacteriana segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998),	15
4.2.2. Composição da solução empregada na PCR do gene <i>rfbS</i> , das regiões polimórficas nas posições 598 e 237.....	16
4.2.3. Composições alternativas empregadas na PCR do gene <i>rfbS</i> , das regiões polimórficas nas posições 598 e 237.....	16
4.2.4. PCR do gene <i>rfbS</i> , utilizando a amplificação da região polimórfica de posição 598.....	18
4.2.4.1. <i>Primers</i> utilizados.....	18

4.2.4.2. Amplificação do gene <i>rfbS</i> , da posição 598.....	18
4.2.4.3. Análise dos produtos de amplificação do gene <i>rfbS</i> , da posição 598.....	18
4.2.5. PCR do gene <i>rfbS</i> , utilizando a amplificação da região polimórfica de posição 237.....	19
4.2.5.1. <i>Primers</i> utilizados.....	19
4.2.5.2. Amplificação do gene <i>rfbS</i> , da posição 237.....	19
4.2.5.3. Análise dos produtos de amplificação do gene <i>rfbS</i> , da posição 237.....	19
4.3. Diferenciação de <i>Salmonella Pullorum</i> e <i>Salmonella Gallinarum</i> por meio da técnica de PCR dos genes <i>speC</i> e <i>speF</i>	20
4.3.1. Obtenção do DNA para PCR sem prévia extração segundo SAMBROOK RUSSEL (2001).....	20
4.3.2. <i>Primers</i> utilizados.....	20
4.3.3. Composição da solução empregada na PCR dos genes <i>speC</i> e <i>speF</i>	21
4.3.4. Amplificação dos genes <i>speC</i> e <i>speF</i>	21
4.3.5. Análise dos produtos de amplificação dos genes <i>speC</i> e <i>speF</i>	21
4.3.6. Digestão enzimática do produto amplificado, segundo SAMBROOK & RUSSEL, (2001).....	22
4.3.7. Análise dos produtos de amplificação dos genes <i>speC</i> e <i>speF</i> , após a digestão enzimática.....	22
4.4. Estudo bioquímico das amostras segundo HOLT et al. 1993 e BRASIL, 1994....	23
V. RESULTADOS.....	26
5.1- Diferenciação de <i>S. Pullorum</i> e <i>S. Gallinarum</i> pela análise do gene <i>rfbS</i>	26
5.1.1. Amplificação da região polimórfica de posição 598.....	26
5.1.1.1. DNA obtido pelo método de extração segundo SOUMET et al. (1994).....	26
5.1.1.2. DNA obtido pelo método de extração a partir da colônia bacteriana segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998).....	28

5.1.2. Amplificação da região polimórfica de posição 237.....	32
5.1.2.1. DNA obtido pelo método de extração segundo SOUMET et al. (1994)	32
5.1.2.2. DNA obtido pelo método de extração a partir da colônia bacteriana segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998),....	34
5.2. Diferenciação de <i>S. Pullorum</i> e <i>S. Gallinarum</i> pela análise dos genes <i>speC</i> e <i>speF</i>	35
5.2.1. Padronização da PCR.....	35
5.2.2. Tratamento enzimático do produto de PCR (genes <i>speC</i> e <i>speF</i>).....	37
5.2.3. Amplificação do gene <i>speC</i> e tratamento com a enzima <i>Eco</i> RI nas amostras estudadas.....	38
5.3. Caracterização bioquímica.....	41
VI. DISCUSSÃO.....	43
VII. CONCLUSÕES.....	50
VIII. REFERÊNCIAS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGNIFICADOS

AMPLIFICAÇÃO	Criar múltiplas cópias
ARMS	Sistema de Amplificação de Mutação Refratária
CN	Controle Negativo (água destilada)
ELETROFOROGRAMA	Figura que representa a corrida no gel de eletroforese
<i>FORWARD PRIMER</i>	Seqüência de nucleotídeos que conduz a reação em sentido direto (ida)
GENE <i>rfbS</i>	Responsável pela codificação de enzimas relacionadas à biossíntese dos lipopolissacarídeos, nos sorogrupos A e D de <i>Salmonella</i>
GENES <i>speC</i> e <i>speF</i>	Relacionados com a descarboxilação do aminoácido ornitina
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>Mix SG</i>	Mistura de reagentes contendo <i>primers</i> que amplificam a posição 598 do gene <i>rfbS</i> de SG
<i>Mix SP</i>	Mistura de reagentes contendo <i>primers</i> que amplificam a posição 598 do gene <i>rfbS</i> de SP

<i>Mix SPP</i>	Mistura de reagentes contendo <i>primers</i> que amplificam a posição 237 do gene <i>rfbS</i> de SP
MM	Marcador de peso molecular
ODC	Ornitina descarboxilase
PCR	Reação da cadeia em polimerase
POLIMORFISMO DO GENE	Apresenta região com seqüência de nucleotídeo alterada
<i>REVERSE PRIMER</i>	Seqüência de nucleotídeos que conduz a reação em sentido inverso (volta)
SG	<i>Salmonella</i> Gallinarum
SP	<i>Salmonella</i> Pullorum
<i>X- Mix</i>	Mistura de reagentes contendo dNTP, MgCl ₂ , tampão e H ₂ O

DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR ENTRE *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Pullorum E *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Gallinarum

RESUMO - A *Salmonella* Pullorum (SP) é muito semelhante à *Salmonella* Gallinarum (SG), agentes da Pulorose e Tifo aviário, respectivamente, sendo responsáveis por perdas econômicas no setor avícola. São salmonelas de composição antigênica similar e a distinção de ambas tem sido baseada em provas bioquímicas. Entretanto, este procedimento é laborioso e o surgimento de estirpes com comportamento bioquímico atípico tem estimulado a procura por outros métodos de diagnóstico, como os testes moleculares. No presente estudo, analisou-se o método descrito na literatura envolvendo o gene *rfbS* em conjunto com testes desenvolvidos com base nos genes *speC* e *speF*. O gene *rfbS* codifica a enzima que atua na parede celular de bactérias e tem sido utilizado para diferenciar SP e SG. Com o propósito de padronizar a PCR para ser utilizada na rotina laboratorial, empregou-se dois métodos de extração de DNA e diferentes concentrações de reagentes. Entretanto, tendo em vista a dificuldade de padronização encontrada desde o início, foi concomitantemente desenvolvida a PCR para os genes *speC* e *speF*. Estes dois últimos estão relacionados com a produção da enzima ornitina-descarboxilase, a qual é ativa em SP e inativa em SG. Após testes iniciais, foi possível padronizar a PCR do gene *speC* com posterior utilização da técnica de tratamento enzimático com a enzima de restrição *Eco* RI. Tanto para o gene *rfbS* quanto para os genes *speC* e *speF*, os resultados encontrados permitiram a diferenciação de 13 amostras de SP e 20 de SG isoladas no Brasil e duas cepas ATCC. Sendo assim, as ações sanitárias e a tomada de decisão no campo podem ser conduzidas de maneira rápida e segura.

PALAVRAS-CHAVE: diferenciação, gene *rfbS*, gene *speC*, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum

MOLECULAR DIFFERENTIATION BETWEEN *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Pullorum AND *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Gallinarum

SUMMARY - *Salmonella* Pullorum (SP) is very similar to *Salmonella* Gallinarum (SG). They are respectively agents of Pulorosis and Avian Typhoid, both diseases responsible for economic losses to poultry production. Due to the fact that both salmonellas have similar antigenic composition, their differentiation has been based in biochemical tests. However, this fact that this kind of procedure is very troublesome and the occurrence of strains showing atypical behavior have stimulated the search for others diagnostic methods, such as molecular tests. In the present study, a method described in the literature using gene *rfbS* was analyzed together with tests developed based on genes *speC* and *speF*. Gene *rfbS* encodes an enzyme that acts on the cell wall of bacteria and has been used in the differentiation between SP and SG. In order to standardize the PCR procedure to be used in laboratory routine, two methods for DNA extraction were used, as well as different concentrations of the reagents. However, due to the difficulty in the standardization observed from the beginning of the study, a PCR procedure was developed for genes *speC* and *speF*. These genes are related to the production of the enzyme ornithine-decarboxilase, active in SP and inactive in SG. After the initial tests, PCR of gene *speC* was standardized, and later on it was coupled with the enzymatic treatment with restriction enzyme *Eco* RI. Results obtained for gene *rfbS* as well as for genes *speC* and *speF* enabled differentiation of 13 SP and 20 SG strains isolated in Brazil and two strains ATCC. So, the sanitary actions and the decisions in the livestock can to be conduced with safety and rapidity.

KEY-WORDS: differentiation, gene *rfbS*, gene *spec*, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum

I- INTRODUÇÃO

As salmoneloses são enfermidades provocadas por bactérias do gênero *Salmonella*, responsáveis por perdas econômicas significativas no setor avícola. Bactérias deste gênero infectam as aves e podem causar a Pulorose, cujo agente é a *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Pullorum (SP), o Tifo Aviário, causado pela *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Gallinarum (SG) e o Paratifo Aviário, causado por qualquer outra salmonela que não seja SP e SG.

A *Salmonella* Pullorum é muito semelhante à *Salmonella* Gallinarum, entretanto, difere na relação parasita-hospedeiro com a ave. Sendo assim, sob o ponto de vista epidemiológico e para fins de programa de controle, a diferenciação destas duas salmonelas é muito importante, tendo-se em vista que as medidas adotadas em cada situação são distintas.

Os sorovares Pullorum e Gallinarum são de difícil diferenciação em procedimento laboratorial rotineiro. A caracterização sorológica com soros específicos, utilizada na identificação de salmonelas não permite identificar os sorovares acima, uma vez que SP e SG pertencem ao mesmo sorogrupo e não possuem flagelos. Além disso, apresentam comportamento bioquímico idêntico em muitas reações. Uma prova muito utilizada na distinção das duas refere-se à capacidade da *Salmonella* sp em assimilar o aminoácido ornitina, por ação da enzima ornitina descarboxilase (ODC). *S. Pullorum* descarboxila este aminoácido enquanto *S. Gallinarum* não. No entanto, o isolamento de estirpes com comportamento bioquímico atípico quanto à metabolização da ornitina, tem dificultado tal diferenciação.

Considerando que a confirmação dos dois sorovares de *Salmonella* sp utilizando testes bioquímicos são passíveis de erro e podem levar a resultados dúbios, a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) pode ser uma ferramenta útil, pois permite a detecção rápida destas salmonelas aviárias.

Provas moleculares utilizando genes como o *rfbS*, têm sido sugeridas para diferenciar SP de SG. Os genes relacionados com a produção de ornitina descaboxilase também poderiam ser objeto dessa diferenciação (*speC* e *speF*), já que a

metabolização da ornitina é uma das provas mais discriminatórias entre *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*.

O gene *rfbS* codifica a enzima *paratose syntetase*, que atua na síntese de parede celular de bactérias. Baseando-se no polimorfismo de nucleotídeos específicos para SP e SG, presentes neste gene e utilizando o método de PCR alelo-específico, procurar-se-á obter a diferenciação entre SP e SG.

Os genes *speC* e *speF* estão relacionados com a expressão da ornitina e não se observa diferença entre *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, ao se analisar o tamanho de cada gene (em pares de bases – bp). Entretanto, a análise dos fragmentos gerados após o tratamento dos genes com enzimas de restrição poderá revelar que há diferença entre os sorovares, tendo-se em vista que SP e SG comportam-se de maneira diferente quanto à assimilação de ornitina.

II- OBJETIVOS

- Aprimorar o diagnóstico de *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum, mediante a inclusão de testes moleculares relativos aos genes *rfbS*, *speC* e *speF*;

- Analisar a prova molecular recomendada para a diferenciação de *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum considerando o gene *rfbS*, em conjunto com o estudo dos genes *speC* e *speF*, para o mesmo propósito;

- Diminuir o tempo necessário para se chegar ao diagnóstico definitivo de SP ou SG, mesmo quando as amostras apresentarem comportamento bioquímico atípico, contribuindo para que medidas sanitárias sejam adotadas com rapidez e segurança;

III- REVISÃO DE LITERATURA

Dentre as principais infecções que afetam as aves e comprometem a avicultura comercial estão as salmoneloses, responsáveis por prejuízos diretos ou indiretos à produção avícola, além da importância que têm em saúde pública (BERCHIERI JÚNIOR et al. 2001; BUCHALA et al. 2006).

As salmoneloses são enfermidades provocadas por bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, gênero *Salmonella*, espécies *S. bongori* e *S. enterica*. Esta última divide-se nas subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. São bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, catalase-positivos, oxidase-negativos, redutores de nitratos e nitritos, não formadores de esporos e móveis por meio de flagelos peritríquios, com exceção da *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Pullorum e *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Gallinarum que são aflagelares (FRANCO & LANGRAF, 1996; JAY, 2000; FORSHELL & WIERUP, 2006).

As salmoneloses são enfermidades de grande importância na avicultura industrial. Entretanto, nem sempre são facilmente reconhecidas, a menos que um cuidadoso programa de prevenção e controle seja efetuado. Diante deste fato, é necessário adotar medidas para evitar tanto a transmissão vertical quanto a horizontal de salmonelas entre aves para exploração comercial (SILVA, 1991; TESSARI et al. 2003). Considerando-se que as três maiores fontes de *Salmonella* sp para aves de interesse comercial seriam a introdução de ave infectada, o meio ambiente e a ração, a pesquisa de salmonelas, principalmente nestas fontes, se faz necessário para avaliar o grau de infecção das aves por estas bactérias, permitindo o uso de medidas eficientes, objetivando o seu controle (KAMPELMACHER, 1987; PEREIRA et al. 1999). Não obstante, a presença de *Salmonella* sp também é uma barreira sanitária que restringe o comércio de aves e seus produtos (GAMBIRAGI et al. 2003).

São conhecidos mais de 2.500 sorovares de *Salmonella* sp, contudo cerca de 80 a 90 são os mais comuns em casos de infecção dos seres humanos e dos animais. Nas aves, a *S. Pullorum* é o agente etiológico da Pulorose, a *S. Gallinarum* do Tifo Aviário e qualquer outra salmonela que não seja as citadas é capaz de infectar as aves,

acarretando o Paratifo Aviário. Os sorovares SP e SG são caracterizados como *Salmonella enterica* subsp *enterica*, grupo D (antígenos somáticos 1, 9 e 12) e apresentam semelhanças quanto às suas características bioquímicas e de antigenicidade. Além de ambas não possuírem flagelos, apresentam crescimento mais lento em meios de cultivo e produzem pouco H₂S no TSI inclinado (*Triple Sugar Iron Agar*), ao contrário das demais salmonelas (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

A Pulorose é uma enfermidade que pode acometer as aves em qualquer idade, entretanto, é mais comum em aves jovens, principalmente nas três primeiras semanas de vida. Nesse período, a mortalidade pode ser alta e as aves que sobrevivem à doença podem se tornar portadoras, não crescer dentro dos parâmetros zootécnicos esperados e produzir ovos contaminados. A sua história se confunde com o desenvolvimento da avicultura industrial, sendo que o processo de incubação artificial de ovos foi muito influenciado por sua ocorrência, que prejudicava a incubação, provocava alta mortalidade entre os pintainhos e muita refugagem. Com a incubação de ovos provenientes de aves diferentes, o agente da Pulorose foi sendo transferido para outras aves de interesse econômico, como os perus. Para viabilizar a incubação artificial em escala industrial, foi preciso buscar métodos de controle dessa enfermidade (POMEROY & NAGARAJA, 1991; SHIVAPRASAD, 1997; BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

As medidas para prevenir a Pulorose eram baseadas em higiene e limpeza. Todavia, o controle só foi conseguido com o desenvolvimento, na década de 20 do século passado, de uma prova sorológica baseada em aglutinação, que permitia identificar e eliminar aves portadoras. Após 1930, verificou-se que o teste poderia ser feito com sangue total, tornando-o factível em larga escala. Assim, com o teste sendo realizado nos plantéis reprodutores, foi possível controlar a Pulorose. Ainda hoje, o método de aglutinação rápida em placa com sangue total, realizado em 100% do lote de aves reprodutoras, é um instrumento imprescindível para seu controle em avicultura industrial. Não obstante, com a aprovação do uso em reprodutoras de vacina contra *Salmonella* Enteritidis, o teste de Pulorose perdeu a sua essencialidade (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

No Brasil, foram diagnosticados vários surtos de Pulorose nas décadas de 1980

e 1990, incluindo-se aí a presença de uma estirpe bacteriana com comportamento bioquímico atípico. De um modo geral, criações de aves em que se utiliza a incubação artificial, como galinhas, perus e codornas, é preciso estar atento a esta enfermidade (POMEROY & NAGARAJA, 1991; TAVECHIO et al. 1996; SHIVAPRASAD, 1997; BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

O Tifo Aviário, embora seja causado por uma *Salmonella* muito semelhante ao agente da Pulorose, apresenta uma relação parasita-hospedeiro com a ave bastante diferente. A *S. Gallinarum* é altamente patogênica, capaz de causar infecção sistêmica e pode acometer aves de qualquer idade. Entretanto, a sua ocorrência é mais comum entre aves adultas. A mortalidade provocada pelo Tifo Aviário pode chegar a 40-80% do plantel. Observa-se que algumas aves adoecem e acabam morrendo em 7-14 dias. Este processo é contínuo e aos poucos vai acometendo as demais aves de uma granja, tendo-se no final, mortalidade dentro dos parâmetros mencionados anteriormente. Muitas vezes, a morte é decorrente da enfermidade e de intoxicação pelos medicamentos usados para combatê-la (POMEROY & NAGARAJA, 1991; SHIVAPRASAD, 1997; BERCHIERI JR. 2000).

No final do século XIX, o Tifo Aviário foi reconhecido na Inglaterra, e atualmente é uma doença considerada de países “em desenvolvimento”. Nos Estados Unidos da América, tem sido considerada sob controle e este resultado deve-se a um plano nacional de prevenção de enfermidades avícolas, com destaque para o controle de salmoneloses. Parte importante deste plano refere-se à eliminação de aves infectadas, à adoção de provas sorológicas, à pesquisa e identificação do sorovar de *Salmonella* por meio de exames bacteriológicos, em conjunto com medidas de limpeza, desinfecção e higiene. Na Europa, Alemanha e Dinamarca, o Tifo Aviário foi notificado no início da década de 1990. A enfermidade tem sido observada nas Américas Central e do Sul. No México, programas de vacinação têm sido utilizados para prevenir o Tifo Aviário. No Brasil, tem sido diagnosticada em áreas de exploração de aves de postura comercial, mas também pode ocorrer em aves reprodutoras para a produção de pintos de corte e de postura (POMEROY & NAGARAJA, 1991; TAVECHIO et al. 1996; SHIVAPRASAD, 1997; BERCHIERI JR. 2000; OLIVEIRA et al. 2001). Segundo

CHRISTENSEN et al. (1992), na década de 1980 observaram-se casos na Dinamarca em aves de postura, relacionados a surtos em aves de fundo de quintal.

Embora o Brasil tenha uma avicultura considerada de “primeiro mundo”, aliás, é de fato uma das melhores do mundo, o clima e o sistema de criação, com barracões abertos, favorece o desenvolvimento de enfermidades, como a salmonelose. Segundo dados do Laboratório de Patógenos Entéricos do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil), no período de 1991 a 1995 foram identificadas 372 amostras de *Salmonella* procedentes de criações avícolas, sendo que 21 eram de *S. Pullorum* e 35 de *S. Gallinarum* (TAVECHIO et al. 1996). Essas duas salmonelas são muito parecidas quanto à sua constituição antigênica e bioquímismo, mas algumas provas têm sido utilizadas para diferenciá-las, incluindo a produção de gás durante a fermentação de glicose, maltose e dulcitol, utilização de d-tartarato, mucato, celobiose, salicina e gelatina. Segundo TRABULSI & EDWARDS (1962), a capacidade ou não de assimilar a ornitina seria a principal prova bioquímica que permite a diferenciação entre SP e SG, mas o isolamento de estirpes de comportamento bioquímico atípico nessa prova dificulta a separação das duas (CHRISTENSEN, et al. 1992; SHIVAPRASAD, 1997).

NOBREGA (1935) estudando amostras de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* e levando em consideração suas características bioquímicas e sorológicas, já mencionava a dificuldade em diferenciá-las, levando em consideração somente estes fatores. LANGENEGGER et al. (1982), apesar de terem encontrado apenas amostras com reações bioquímicas e sorológicas típicas, fizeram menção de formas “variantes”, as quais apresentavam características distintas das encontradas em culturas de bactérias padrão.

A diferenciação dessas duas salmonelas é muito importante sob o ponto de vista epidemiológico e para fins de programa de controle, tendo-se em vista que as medidas sanitárias a adotar são distintas (SHIVAPRASAD, 1997). Por meio de medidas de controle sanitário e de desenvolvimento técnico e científico, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da República Federativa do Brasil (MAPA) pretende reduzir a presença de microrganismos patogênicos na carne de frango e nas criações, com o intuito de fornecer produtos avícolas de qualidade, tanto no mercado nacional como no

internacional. Com essa finalidade, em 1994 foi criado o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que tem como ações prioritárias a vigilância, o controle e a erradicação das principais doenças aviárias de importância para a saúde animal e para a saúde pública, como as salmoneloses (BRASIL, 1994; BRASIL 2003).

O esquema de Kauffmann-White (POPPOFF, 2001) propicia a classificação do gênero *Salmonella* em mais de 2.500 sorovares pela combinação de antígenos somáticos e flagelares. Entretanto, a diferenciação entre SP e SG por esta técnica não é possível, tendo-se em vista que as duas pertencem ao mesmo sorogrupo (1,9,12 :-:-) e não possuem flagelos. Por todas essas dificuldades, tem-se procurado por medidas alternativas, como a utilização de métodos moleculares (PROUX et al. 2002).

A amplificação do DNA através da PCR tem se mostrado de grande valia para a identificação de microrganismos, mesmo quando estes não estão mais viáveis, quando suas concentrações são baixas e o isolamento é difícil ou simplesmente se os microrganismos são desconhecidos (COHEN et al. 1993).

Segundo COHEN et al. (1993) e MAKINO et al. (1999) a PCR é uma técnica altamente sensível e específica. Além disso, o teste baseado em PCR pode ser mais rápido, confiável, e de melhor custo-benefício do que métodos tradicionais utilizados (STONE et al. 1995; TUCHILI et al. 1995; ITOH et al. 1997). Em estudos envolvendo a detecção de patógenos relacionados a casos de toxinfecção alimentar, incluindo a *Salmonella*, a PCR também demonstrou ser sensível e específica. Por esta razão, a técnica foi validada e normatizada pelo Comitê Europeu para uso em rotina laboratorial (MALORNY et al. 2002).

Portanto, a PCR descrita por Kary Mullis em 1983, pode ser uma ferramenta útil, no intuito de fornecer a detecção rápida e precisa de *Salmonella* (NELSON & COX, 2002).

Analisando o genoma de diferentes sorovares de *Salmonella*, incluindo SP e SG, foram observadas numerosas inserções, deleções, substituições, inversões, translocações e pseudogenes específicos de cada sorovar, que muitas vezes podem estar relacionadas com a patogenicidade da bactéria (RILEY & ANILIONIS, 1980; WU et al. 2005).

OLSEN et al. (1996), analisaram amostras de SP e SG utilizando métodos de tipagem molecular e puderam observar que estes sorovares são muito similares quanto à constituição cromossômica. Entretanto, pelo emprego do método de PFGE (*Pulsed-field gel eletrophoresis*), é possível observar que diferem entre si.

Provas moleculares para diferenciação de SP e SG têm sido direcionadas para a análise de seus genes, como o *rfbS*.

A membrana externa de *Salmonella* é formada por uma estrutura denominada LPS (lipopolissacarídeo). A fração do polissacarídeo confere à bactéria suas características antigênicas: antígeno somático (O) e antígeno de grupo (representados por letras do alfabeto). Nos grupos A, B e D de *Salmonella* tal antígeno é formado por um polímero de quatro açúcares: manosil-ramnosil-galactose (estão presentes em todos os grupos) e uma dideoxihexose (paratose nos grupos A e D, abequose no grupo B e tivelose no grupo D) (VERMA et al. 1988; LIU et al. 1991; LUK et al. 1993; XIANG et al. 1993; XIANG et al. 1994; ITOH et al. 1997).

O gene responsável pela codificação de enzimas relacionadas à biossíntese dos antígenos somáticos O é denominado *rfb*. Após o sequenciamento deste gene foi possível observar que existe uma região central, de função diferenciada, a qual é responsável pelas diferenças entre os sorogrupos (XIANG et al. 1993, 1994). Nos sorogrupos A e D, o gene que codifica a *paratose synthetase* (enzima que atua na etapa final da via biossintética dos lipopolissacarídeos), foi denominado *rfbS* (VERMA & REEVES, 1989; LIU et al. 1991).

LUK et al. (1993), conhecendo a seqüência de nucleotídeos do gene *rfb* nos sorogrupos A, B, C2 e D, conseguiram com sucesso a diferenciação entre os sorovares.

Posteriormente, a PCR baseada na amplificação do gene *rfbS* foi desenvolvida para a detecção específica dos sorotipos que pertencem às salmonelas do sorogrupo D (LUK et al. 1997).

PARK et al. (2001), clonaram e sequenciaram um fragmento do gene *rfbS* e observaram um polimorfismo de nucleotídeos específico para SP e SG. Com base nesse trabalho, um *forward primer* comum, e dois *reverse primers* *rfbSP* e *rfbSG* alelo-específicos foram construídos para hibridizar com as seqüências dos genes *rfbS* de SP

e de SG, respectivamente (SHAH et al. 2005). Essa metodologia de PCR alelo-específica, usada para detectar mutações específicas, denomina-se sistema de amplificação de mutação refratária – ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*). Este método demonstrou ser simples, rápido e de confiança para a detecção de qualquer mutação que envolva mudanças simples de bases ou deleções pequenas (FERRIE et al. 1992; LAMPEL et al. 1996; CABELLO, 2005).

Mutações conhecidas podem ser identificadas pelo desenho de três *primers*. Um específico para o alelo mutante, um segundo específico para o alelo selvagem e o terceiro específico da região flanqueadora (conservada) do *exon* e que será o *primer* que vai encaminhar a amplificação da fita no sentido direto. O desenho é feito de maneira que o *primer* específico para o alelo mutante termine com a base alterada na extremidade 3' e o *primer* específico para o alelo selvagem termine com a base normal em sua extremidade 3', funcionando como uma sonda alelo-específica (CABELLO, 2005).

Em 2004, observando as diferenças entre SP e SG no que diz respeito ao sequenciamento do gene *rfbS*, SHAH et al. (2005) desenvolveram um método de PCR alelo-específico e o testaram com o DNA de vários sorotipos de *Salmonella*, além de outras bactérias. O método revelou-se de extrema especificidade para o gene *rfb* de SG, fato que não ocorreu com o gene *rfb* de SP. Em relação ao gene *rfbS*, duas regiões polimórficas encontradas, uma na posição 598 e outra na posição 237, mostraram-se viáveis para a aplicação da metodologia de PCR alelo-específica. Realizada no continente asiático para a posição 598, mostrou-se 100% específica para SG e eficaz na diferenciação entre SG e SP, contudo, o *primer rfbSP*, além das amostras de SP, também gerou *amplicons* em amostras de *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhi.

Como não foi obtido 100% de especificidade para SP na posição 598, um outro trabalho foi realizado posteriormente para a posição 237 do gene *rfbS*. A técnica de PCR alelo-específico demonstrou ser rápida, simples e barata. Além disso, foi considerada Pullorum-específica, uma vez que não gerou *amplicons* com amostras de outras bactérias nem com outras cepas de *Salmonella* analisadas, como *Salmonella*

Gallinarum, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Typhimurium (DESAI et al. 2005).

Genes relacionados com a assimilação de ornitina (*speC* e *speF*) também seriam de interesse na diferenciação de SP e SG, tendo-se em vista que a expressão da enzima ornitina descarboxilase (ODC) difere entre os dois sorovares.

CUNNINGHAM-RUNDLES & MAAS (1975) observaram colônias mutantes de *Escherichia coli* que não apresentavam crescimento satisfatório, por não serem capazes de sintetizar a enzima ornitina descarboxilase (ODC). O gene envolvido com tal função foi designado *speC*. Os mesmos autores demonstraram que a suplementação de putrescina ou espermidina era capaz de reverter o quadro anterior, permitindo que o crescimento celular ocorresse normalmente.

Posteriormente, KYRIAKIDIS et al. (1978) demonstraram a existência de substâncias que modulam a reação da enzima ODC, tanto favoravelmente quanto inibindo sua ação. A presença de substâncias como putrescina em altas concentrações, estágio do crescimento bacteriano e pH, podem ativar ou inibir a ODC.

A putrescina é uma amina presente em células vivas e desempenha um importante papel como precursor de espermidina. Estas duas substâncias estão relacionadas com o estímulo ao crescimento celular e sua regulação. Exceto para certos mutantes, todos os organismos estudados são capazes de sintetizar a putrescina, a maior parte pela ação de uma enzima denominada ornitina descarboxilase a qual converte ornitina em putrescina (WRIGHT & BOYLE, 1982).

WRIGHT & BOYLE (1984) compararam o gene *speC* (responsável pela biossíntese de ODC) de *Escherichia coli* e de outras bactérias e encontraram seqüências homólogas de DNA em amostras de *E. coli* e de *Salmonella*. Segundo estes autores existem três classes de *E. coli*, com relação aos genes para síntese e degradação de ODC: a primeira classe que possui o gene *speC* ativo, a segunda que possui um gene ativo e um inativo para a degradação de ODC e a terceira que possui um gene ativo tanto para síntese quanto para degradação de ODC. Entre as amostras comparadas, as de *Salmonella* apresentaram resultados compatíveis com a terceira classe, expressando atividade degradativa bem maior que sintética para ODC. Segundo

PANAGIOTIDIS et al. (1987), a função degradativa parece estar relacionada ao aumento do pH do meio, necessário quando as células estão se multiplicando e o pH está ácido.

Genes relacionados com a descarboxilação da ornitina (*speC* e *speF*) estão presentes tanto em SP quanto em SG. Quanto ao tamanho, eles são similares nos sorotipos Pullorum, Gallinarum, Typhimurium e diferem de *S. Typhi* (McCLELLAND et al. 2001). Observa-se que em SP os genes *speC* e *speF* são expressos e a bactéria apresenta reação bioquímica positiva para a ornitina. Já em SG não ocorre expressão dos genes e a bactéria apresenta reação negativa para a ornitina. (TRABULSI & EDWARDS, 1962; CHRISTENSEN, et al. 1992; LI, et al. 1993). Este é o padrão de resultado esperado. Entretanto, com a constatação de reações atípicas em SP e SG quanto à assimilação deste aminoácido, a diferenciação dos dois sorovares tem sido dificultada. TRABULSI & EDWARDS (1962) consideram a prova da ODC a única confiável para realizar a diferenciação entre SP e SG, mas o comportamento bioquímico atípico prejudicaria a separação das duas.

Embora sejam semelhantes, os genes *speC* e *speF* de SP e SG poderiam apresentar diferenças no que concerne aos sítios de clivagem por ação de enzimas de restrição (McCLELLAND et al. 2001; SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Na rotina laboratorial tem-se deparado com isolados de campo que apresentam comportamento bioquímico atípico. Tal fato na maioria das vezes dificulta a separação entre *S. Pullorum* de *S. Gallinarum*, culminando com a demora na tomada de decisões. Sendo assim, neste sentido e com o propósito de abreviar o tempo necessário ao diagnóstico definitivo, os genes *rfbS*, *speC* e *speF* serão objeto deste trabalho.

IV- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Amostras utilizadas

Foram utilizadas estirpes de salmonelas provenientes de aves comerciais do Brasil, obtidas junto a centros de referência do Brasil por meio do Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro-SP), órgão que coordena os exames de aves pelo PNSA, e estirpes mantidas e/ou isoladas no laboratório de Ornitopatologia da FCAV / UNESP – Jaboticabal. Também foram utilizadas duas cepas ATCC (*American Type Collection Culture*), uma de SG (ATCC nº 9184) e outra de SP (ATCC nº 9120).

As amostras foram identificadas na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) e no Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP), com base no comportamento bioquímico e provas antigênicas com soros anti-antígenos somáticos (poli e monovalente) e flagelar (polivalente) de salmonela.

Foram utilizadas 35 amostras de salmonela, sendo 21 de *S. Gallinarum* e 14 de *S. Pullorum*, as quais estavam mantidas em ágar nutritivo (DIFCO -213000) e foram identificadas com numeração de 01 a 21 e de 22 a 35 respectivamente. Dentre estas, a cepa ATCC de SG foi identificada com o nº 10 e a cepa ATCC de SP com o nº 33. Durante toda a fase de padronização dos testes, a escolha das amostras foi aleatória.

4.2 - Diferenciação de *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* por meio da técnica de PCR do gene *rfbS*

Avaliou-se a PCR alelo-específica baseada em duas regiões polimórficas encontradas no gene *rfbS*: a da posição 598 e a da posição 237, utilizando o sistema de amplificação de mutação refratária (ARMS), o qual baseia-se no princípio do método de PCR alelo-específico.

Para a posição 598 do gene *rfbS*, foi construído um *forward primer* capaz de hibridizar tanto os genes de *S. Gallinarum* quanto de *S. Pullorum* (*rfbSF*). O *reverse primer rfbSG* permite a amplificação apenas do gene *rfbS* de *S. Gallinarum* e o *rfbSP* apenas do gene *rfbS* de *S. Pullorum*. Para esta posição, os *primers rfbSF*, *rfbSG* e *rfbSP*, foram preparados conforme a descrição de SHAH et al. (2005).

O diagrama a seguir permite a visualização de tais ampliações:

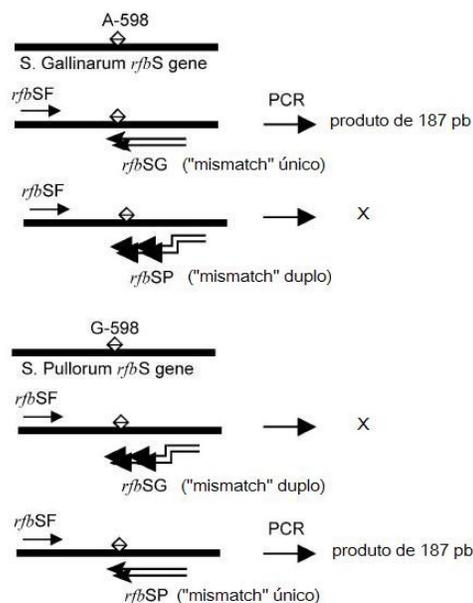


Fig. 1. Diagrama mostrando o princípio do método PCR alelo-específico. *rfbSF* (*forward primer* capaz de hibridizar os genes de SG e de SP). *rfbSG* (*reverse primer* que apresenta *mismatch* único com o gene *rfbS* de SG e dois *mismatches* com o gene *rfbS* de SP). *rfbSP* (*reverse primer* com dois *mismatches* para SG e um para SP). Apenas *mismatches* únicos permitem a amplificação de PCR.

Para a posição 237, foi construído um *forward primer* (*rfbSFP*) e um *reverse primer* (*rfbSPP*), ambos capazes de hibridizar somente o gene *rfbS* de *S. Pullorum*. Para o desenho dos *primers*, seguiu-se o trabalho descrito por DESAI et al. (2005).

4.2.1- Obtenção do DNA

O DNA utilizado nas provas moleculares foi obtido por dois métodos: um segundo SOUMET et al. (1994) e o outro, a partir da colônia bacteriana segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998), com as descrições a seguir.

4.2.1.1- Extração de DNA segundo SOUMET et al. (1994)

Considerando este método, foram feitas algumas modificações e o DNA das amostras de SP e SG foi extraído seguindo as etapas do protocolo a seguir:

1. As amostras de SP e SG foram cultivadas em caldo LB (Invitrogen 12780-052), *overnight* a 37°C, sob agitação;
2. Posteriormente, 1mL da cultura em caldo LB foi colocada em tubo tipo *eppendorf* de 1,5mL e depois centrifugado a 13.000 *g* por 3 min. (Centrífuga Mini Spin – *Eppendorf*);
3. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensão com 500µL de solução salina Tris EDTA (TE) pH 8,0;
4. Repetiram-se as etapas de centrifugação e descarte do sobrenadante mais uma vez;
5. O sedimento foi ressuspensão em 100µL de água bidestilada estéril;
6. Em seguida, o tubo foi submetido a fervura por 8 min;
7. O material foi resfriado à temperatura ambiente, colocado à temperatura de 4 a 8°C por 30 min e posteriormente estocado de -18 a -20°C.

4.2.1.2- Extração de DNA a partir da colônia bacteriana segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998)

Com relação a estes métodos, também foram feitas algumas modificações e o DNA das amostras de SP e SG foi extraído seguindo as etapas do protocolo a seguir:

1. As amostras de SP e SG foram cultivadas em caldo LB *overnight* a 37°C, sob agitação;
2. Posteriormente as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar LB, incubadas a 37°C *overnight*;
3. Uma colônia foi tocada suavemente e imersa diretamente em tubo tipo *eppendorf* de 1,5mL contendo 300µL de TE pH 8,0;
4. Procedeu-se a homogeneização do material em *vortex*. Em seguida, o tubo foi submetido a fervura por 10 min e depois centrifugado a 12.000 *g* por 3 min;
7. Foram transferidos 250µL para novo tubo, descartando-se o sedimento com o volume restante;
8. Após a extração, as amostras foram estocadas de -18 a -20°C.

4.2.2- Composição da solução empregada na PCR do gene *rfbS*, das regiões polimórficas nas posições 598 e 237.

A solução empregada na PCR do gene *rfbS*, posição 598 foi similar à da posição 237, seguindo os trabalhos de SHAH et al. (2005) e DESAI et al. (2005) e em ambas, utilizou-se os reagentes nas seguintes concentrações: 23µL de uma solução contendo 200nM d-NTPs; 25pmol de cada *primer* ; 2,5U de Super-*Taq* DNA *polymerase*; 10mM de Tris (pH 9,0); 50mM de KCl; 1,4mM de MgCl₂; 1% Triton X-100 e 2µL de DNA (aproximadamente 100ng), com volume final de 25µL.

Para a PCR da região 598, os *primers* empregados em amplificações SP-específicas foram denominados *rfbSF* e *rfbSP* e em amplificações SG-específicas utilizou-se o *primer rfbSG* no lugar do *primer rfbSP*

Com relação à PCR da região 237, empregou-se os *primers rfbSFP* e *rfbSPP*

4.2.3- Composições alternativas empregadas na PCR do gene *rfbS*, das regiões polimórficas nas posições 598 e 237

Foram preparadas composições alternativas, tanto para a posição 598 como para a posição 237, visando a padronização da reação molecular.

Nesta etapa, utilizou-se uma solução padrão de reagentes, denominado *X-Mix*, o qual era composto por: 19,21µL de H₂O; 2,51µL de Tampão (10x *Buffer*); 0,76µL de MgCl₂ (50mM); 2,51µL de dNTP, para o volume final de 25,0µL. Para a padronização dos testes manteve-se constante a concentração dos *primers*, alterando-se as concentrações do *X-Mix*, da *Taq* DNA Polimerase, do DNA e do volume final para a reação (Quadro 1).

Quadro 1. Composições alternativas da solução empregada na PCR do gene *rfbS* (posições 598 e 237), utilizando *X-Mix*

Componentes da reação	TESTE 1'	TESTE 2'	TESTE 3'
<i>X-Mix</i>	28,5 µL	23,2 µL	25,0 µL
<i>primer</i>	0,5 µL (x2)	0,5 µL (x2)	0,5 µL (x2)
<i>Taq</i> DNA Polimerase	0,5 µL	0,8 µL	0,8 µL
DNA	5,0 µL	5,0 µL	3,2 µL
Total	35,0 µL	30,0 µL	30,0 µL

Testes adicionais foram realizados visando melhorar a nitidez da imagem a ser observada durante a eletroforese. Nesta etapa, cada componente da reação (H₂O, Tampão, MgCl₂, dNTP, *primer*, *Taq* DNA Polimerase e DNA) foi acrescentado à solução em concentração variada em cada teste, como pode ser observado no quadro 2.

Quadro 2. Composições alternativas da solução empregada na PCR do gene *rfbS* (posições 598 e 237)

Componentes da reação	TESTE A	TESTE B	TESTE C	TESTE D
H ₂ O	19,2 µL	22,0 µL	15,0 µL	16,8 µL
Tampão	2,5 µL	2,2 µL	2,0 µL	2,0 µL
MgCl ₂	0,8 µL	0,6 µL	1,0 µL	0,8 µL
dNTP	2,5 µL	1,0 µL	0,7 µL	0,7 µL
<i>primer</i>	0,5 µL (x2)	0,4 µL (x2)	0,5 µL (x2)	0,5 µL (x2)
<i>Taq</i> DNA Polimerase	0,8 µL	0,4 µL	0,8 µL	0,5 µL
DNA	3,2 µL	3,0 µL	4,5 µL	3,2 µL
Total	30,0 µL	30,0 µL	25,0 µL	25,0 µL

4.2.4- PCR do gene *rfbS*, utilizando a amplificação da região polimórfica de posição 598

4.2.4.1- Primers utilizados

Os *primers* que foram utilizados nas reações moleculares seguiram as descrições de SHAH et al. (2005), conforme quadro a seguir.

Quadro 3. *Primers* utilizados na PCR do gene *rfbS*, posição 598

Identificação do <i>primer</i>	Região amplificada	Seqüência 5' → 3'
<i>rfbSF</i> (<i>forward primer</i>)	431-451	5'- GTA TGG TTA TTA GAC GTT GTT -3'
<i>rfbSP</i> (<i>reverse primer</i>)	617-597	5'- TAT TCA CGA ATT GAT ATA <u>ICC</u> -3'
<i>rfbSG</i> (<i>reverse primer</i>)	617-597	5'- TAT TCA CGA ATT GAT ATA <u>CTC</u> -3'

As bases sublinhadas são aquelas alteradas que foram incluídas na seqüência do *primer* e não complementam as seqüências publicadas anteriormente, já as bases em negrito complementam aquelas apresentadas nas seqüências de SP e SG.

4.2.4.2- Amplificação do gene *rfbS*, da posição 598

O termociclador (MyCycler - Thermal cycler - Bio-Rad) foi preparado com o mesmo parâmetro de ciclos para ambas as PCRs alelo-específicas (para SP e SG), seguindo o trabalho de SHAH et al. (2005).

As etapas consistiam de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida pelas seguintes reações repetidas por 30 vezes: 94°C por 1min para desnaturação, 60°C por 1min para pareamento, 72°C por 1min para extensão e extensão final a 72°C por 5min.

4.2.4.3- Análise dos produtos de amplificação do gene *rfbS*, da posição 598

As amostras foram submetidas, juntamente com o marcador de peso molecular, à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen – 15510-019), sob uma corrente elétrica de 80V por 1h (aparelho Powerpac HC – Bio-Rad). O gel foi então colocado sob

luz ultravioleta e visualizado por fluorescência do brometo de etídio, utilizando-se fotodocumentador (GELDOC 2000 – Bio-Rad).

4.2.5- PCR do gene *rfbS*, utilizando a amplificação da região polimórfica de posição 237

4.2.5.1- Primers utilizados

Os *primers* que foram utilizados nas reações moleculares seguiram as descrições de DESAI et al. (2005), conforme quadro a seguir.

Quadro 4. *Primers* utilizados na PCR do gene *rfbS*, posição 237

Identificação do <i>primer</i>	Região amplificada	Seqüência 5' → 3'
<i>rfbSFP (forward primer)</i>	111-131	5'- GAT CGA AAA AAT AGT AGA ATT -3'
<i>rfbSPP (reverse primer)</i>	237-216	5'- GCA TCA AGT GAT GAG ATA A <u>T</u> C -3'

As bases sublinhadas são aquelas alteradas que foram incluídas na seqüência do *primer* e não complementam as seqüências publicadas anteriormente.

4.2.5.2- Amplificação do gene *rfbS*, da posição 237

O termociclador (MyCycler - Thermal cycler - Bio-Rad) foi preparado com o parâmetro de ciclos, seguindo o trabalho de DESAI et al. (2005).

As etapas consistiam de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida pelas seguintes reações repetidas por 30 vezes: 94°C por 1min para desnaturação, 62°C por 1min para pareamento, 72°C por 1min para extensão e extensão final a 72°C por 5min.

4.2.5.3- Análise dos produtos de amplificação do gene *rfbS*, da posição 237

As amostras foram submetidas, juntamente com o marcador de peso molecular, à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen – 15510-019), sob uma corrente elétrica de 80V por 1h (aparelho Powerpac HC – Bio-Rad). O gel foi então colocado sob

luz ultravioleta e visualizado por fluorescência do brometo de etídio, utilizando-se fotodocumentador (GELDOC 2000 – Bio-Rad).

4.3- Diferenciação de *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* por meio da técnica de PCR dos genes *speC* e *speF*

Avaliou-se a PCR dos genes *speC* e *speF* em amostras de SP e SG. Para tanto, foram construídos *primers* utilizando a seqüência destes genes obtida em *S. Typhimurium* (McCLELLAND et al. 2001). Posteriormente, foi empregada a técnica de restrição enzimática.

4.3.1- Obtenção do DNA para PCR sem prévia extração segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001)

Para este método, o DNA das amostras de SP e SG foi obtido seguindo as etapas do protocolo a seguir:

1. As amostras de SP e SG foram cultivadas em caldo LB *overnight* a 37°C, sob agitação;
2. Posteriormente as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar LB e incubadas a 37°C *overnight*;
3. Uma colônia foi tocada suavemente e imersa diretamente em tubo tipo *eppendorf* de 1,5mL, o qual continha os reagentes de PCR.

4.3.2- *Primers* utilizados

Com base nos genes *speC* e *speF* encontrados em *Salmonella Typhimurium* (McCLELLAND et al. 2001), foram elaborados os *primers* para serem utilizados nas reações de PCR, conforme quadro a seguir.

Quadro 5. *Primers* utilizados na PCR dos genes *speC* e *speF*

Identificação do <i>primer</i>	Região amplificada	Seqüência 5' → 3'
<i>speC</i> 1(<i>forward primer</i>)	(3 - 22)	5'- GAA ATC AAT GAA TAT TGC CG -3'
<i>speC</i> 4(<i>reverse primer</i>)	(2100-2078)	5'- ATC GGC ATC GGT CTC GCT ATA TA -3'
<i>speF</i> 1(<i>forward primer</i>)	(23 - 43)	5'- TTA GCC GTC ATT GCC CGG ATT -3'
<i>speF</i> 4(<i>reverse primer</i>)	(2160 - 2141)	5'- ACG AGG TTT AAT GAC GTA GC -3'

4.3.3- Composição da solução empregada na PCR dos genes *speC* e *speF*

Utilizou-se uma solução padrão de reagentes, denominado *X-Mix*, o qual era composto por: 916µL H₂O milli-Q, 120µL 10X *buffer*, 120µL dNTP (2mM), 36µL MgCl.

A solução empregada na PCR foi preparada com 30µL *X-Mix*; 0,5µL de cada *primer*; 0,4µL *Taq* DNA polimerase (Invitroven 10342-020) e o material da colônia bacteriana.

4.3.4- Amplificação dos genes *speC* e *speF*

O termociclador (MyCycler - Thermal cycler - Bio-Rad) foi preparado com o parâmetro de ciclos, seguindo SAMBROOK & RUSSEL, (2001).

As etapas consistiam de desnaturação inicial a 92°C por 3 min, seguida pelas seguintes reações repetidas por 24 vezes: 92°C por 20 s para desnaturação, 50°C por 1min para pareamento, 72°C por 3min para extensão e extensão final a 72°C por 5min.

4.3.5- Análise dos produtos de amplificação dos genes *speC* e *speF*

As amostras foram submetidas, juntamente com o marcador de peso molecular, à eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen – 15510-019), sob uma corrente elétrica de 80V por 3h (aparelho Powerpac HC – Bio-Rad). O gel foi então colocado sob luz ultravioleta e visualizado por fluorescência do brometo de etídio, utilizando-se fotodocumentador (GELDOC 2000 – Bio-Rad).

4.3.6- Digestão enzimática do produto amplificado, segundo SAMBROOK & RUSSEL, (2001)

Para a análise dos genes relacionados à metabolização da ornitina (*speC* e *speF*) nos sorotipos Pullorum e Gallinarum, testou-se aleatoriamente, as enzimas:

Eco R I (Invitrogen 15202-013) ----- (Reconhece: 5'- G↓AATT C-3')

Sal I (Invitrogen 15217-011) ----- (Reconhece: 5'- G↓TCGA C-3')

Xba I (Invitrogen 15226-012) ----- (Reconhece: 5'- T↓CTAG A-3')

Quadro 6. Quantidade dos reagentes utilizados na etapa de digestão enzimática

Enzima	Tampão	H ₂ O milli-Q	Produto de PCR
<i>Eco</i> RI - 1µL	Tampão 3 - 1µ L	3µL	5 µL
<i>Sal</i> I - 1µL	Tampão 10 - 1µL	3µL	5 µL
<i>Xba</i> I - 1µL	Tampão 2 - 1µL	3µ L	5 µL

Cada solução enzimática foi incubada a 37°C por 1h e 30min, conforme instruções do fabricante (Invitrogen). A digestão foi interrompida adicionando-se 2 µL de *Stop Solution* (20mL glicerol puro; 8mL EDTA 0,5 M pH 8,0; TRIS 1M pH 8,0; 2mL azul de bromofenol 1%) a cada tubo de reação.

4.3.7 Análise dos produtos de amplificação dos genes *speC* e *speF*, após a digestão enzimática

As amostras após a digestão enzimática foram submetidas, juntamente com o marcador de peso molecular, à eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen – 15510-019), sob uma corrente elétrica de 80V por 1h e 30 min (aparelho Powerpac HC – Bio-Rad). O gel foi então colocado sob luz ultravioleta e visualizado por fluorescência do brometo de etídio, utilizando-se fotodocumentador (GELDOC 2000 – Bio-Rad).

4.4- Estudo bioquímico das amostras segundo HOLT et al. 1993 e BRASIL, 1994:

Após a etapa de reações moleculares, as cepas foram encaminhadas ao IAL-SP para confirmação do sorotipo, sendo analisadas quanto ao comportamento bioquímico segundo as provas de uréia, indol, triptofano desaminase, H₂S, motilidade, sacarose, glicose, produção de gás, dulcita, maltose, mucato, salicina, celobiose, lisina, ornitina, d-tartarato, tartarato de Jordan, gelatina, citrato e malonato. A seguir, os procedimentos adotados e interpretações de cada prova:

a) Utilização de uréia

Inoculou-se no caldo uréia, o qual continha indicador de pH, a cultura da amostra a ser testada e incubou-se na temperatura de 35 a 37°C por 18 a 24 horas.

Observou-se a coloração do meio: em reações positivas há alteração da cor original do meio (alcalinização), indicando a utilização de uréia pela bactéria e em reações negativas o meio permanece inalterado.

b) Produção de H₂S, prova de indol e de motilidade

Inoculou-se o meio SIM (Meio Sulfureto Indol Motilidade) por picada central, uma alíquota da amostra atingindo 1cm de profundidade e incubou-se na temperatura de 35 a 37°C por 18 a 24 horas.

Observa-se a produção de H₂S pela bactéria (reação positiva), quando há escurecimento do meio no ponto ou ao redor da picada e em reações negativas o meio permanece com a coloração original.

Para a pesquisa de indol adiciona-se 5 gotas do reativo de *Kovac's* na superfície do meio. A imediata formação de um anel vermelho indica reação positiva e de um anel amarelo indica reação negativa.

Na prova de motilidade, observa-se a multiplicação da bactéria no meio: quando limitada ao ponto da picada significa que a bactéria é imóvel e quando é difusa que a mesma apresenta motilidade.

c) Triptofano desaminase

Semeou-se uma alíquota da cultura bacteriana no meio de triptofano e incubou-se na temperatura de 35 a 37°C por 18 a 24 horas.

A constatação de que a superfície do meio encontra-se verde escuro indica que a bactéria utiliza o triptofano e portanto a reação é positiva e a superfície azulada, amarela ou inalterada indica reação negativa.

d) Utilização dos carboidratos sacarose, dulcita, maltose, salicina, mucato, celobiose, glicose e produção de gás

Inoculou-se com uma gota de suspensão tênue bacteriana o tubo contendo meio base com o carboidrato a ser testado, além do indicador de pH e incubou-se na temperatura de 35 a 37°C, por 18 a 24 horas.

A alteração de cor do meio indica que a bactéria utilizou o carboidrato e ocorreu acidificação, enquanto que o meio inalterado indica reação negativa. Na prova da utilização da glicose observa-se a produção ou não de gás pela formação de bolha no tubo de Durham.

e) Utilização dos aminoácidos lisina e ornitina

Inoculou-se o caldo *Muller* contendo o aminoácido lisina ou ornitina. Incluiu-se o tubo controle, o qual não continha aminoácido. Cobriu-se asépticamente, a superfície dos mesmos com 4 a 5mm de óleo mineral estéril e incubou-se na temperatura de 35 a 37°C, por até 96 horas.

Para que ocorra a utilização do aminoácido, primeiramente ocorre acidificação do meio (devido à utilização de glicose presente) e posteriormente a utilização ou não do aminoácido. Portanto, a simples acidificação do meio indica reação negativa e a realcalinização indica a utilização do aminoácido (reação positiva). No tubo controle deve ser observada a acidificação para validar o teste.

f) d-Tartarato

Inoculou-se com uma gota de suspensão bacteriana o meio de d-tartarato e incubou-se na temperatura de 35 a 37°C por no mínimo 24 horas. Adicionou-se 0,5mL de uma solução saturada de acetato de chumbo ao meio e homogeneizou-se.

O aparecimento de precipitado indica que a reação é positiva e a simples turvação que a reação é negativa. A leitura é sempre realizada no primeiro dia e, se o resultado for negativo, procede-se a leituras adicionais com 3 e 7 dias.

g) Tartarato de Jordan

Inoculou-se o meio tartarato de *Jordan* por picada central da amostra e incubou-se na temperatura de 35 a 37°C por 24 a 48 horas.

A alteração de cor da superfície do meio indica que a bactéria utilizou o tartarato presente no mesmo e a reação é considerada positiva. Meio inalterado indica reação negativa.

h) Gelatina

Semeou-se o inóculo com agulha, realizando picadas no meio gelatina. Incubou-se na temperatura de 36 °C por 48 horas e posteriormente, colocou-se o meio em geladeira por 2 horas .

Se a bactéria for capaz de utilizar a gelatina por ação da enzima gelatinase (reação positiva), irá hidrolisar a gelatina e liquefazer o meio. Caso contrário, o meio permanecerá com a mesma consistência e a reação será negativa.

i) Caldo malonato e ágar citrato

Semeou-se pequeno inóculo no caldo malonato e em estrias na superfície do ágar citrato e incubou-se na temperatura de 35 a 37 °C por até 72 horas.

A alcalinização do meio (alteração de cor) indica que a bactéria é capaz de utilizar o meio (reação positiva) e em reações negativas o meio permanece inalterado.

V- RESULTADOS

5.1- Diferenciação de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* pela análise do gene *rfbS*

5.1.1. Amplificação da região polimórfica de posição 598

Segundo o trabalho de SHAH et al. (2005), nas reações com *primers* SP e amostras de *S. Pullorum* é possível visualizar uma banda de 187pb, enquanto nas mesmas reações com *S. Gallinarum* nenhum produto de amplificação é observado. Já nas reações com *primers* SG e amostras de *S. Gallinarum*, a banda também é de 187pb, enquanto nas mesmas reações com *S. Pullorum* nenhum produto de amplificação é visualizado.

5.1.1.1- DNA obtido pelo método de extração segundo SOUMET et al. (1994

Foram utilizadas as amostras de SG n^{os} 01 a 12 e 21; além das amostras de SP n^{os} 24, 25, 26 e 35. A escolha das amostras foi aleatória, exceto para a de 21 que foi escolhida devido ao comportamento bioquímico atípico apresentado.

Utilizando as amostras de *S. Gallinarum* (n^{os} 1 a 12) e os testes 1' e 2', não foi possível observar produtos de amplificação, tanto na presença do *Mix* SG quanto do *Mix* SP.

Entretanto, no teste 3' realizado com as amostras de n^{os} 24, 25, 26 e 35 (todas de *S. Pullorum*, sendo que a última diluída pelo acréscimo de 150µL de H₂O aos 100µL iniciais), foi observado um produto de amplificação de 187pb, quando em presença do *Mix* SP e nenhum produto frente ao *Mix* SG (Figura 2).

No teste anterior, para a amostra de SG n^o 21 não foi possível observar *amplicons*, independente do *Mix* utilizado (Figura 2).

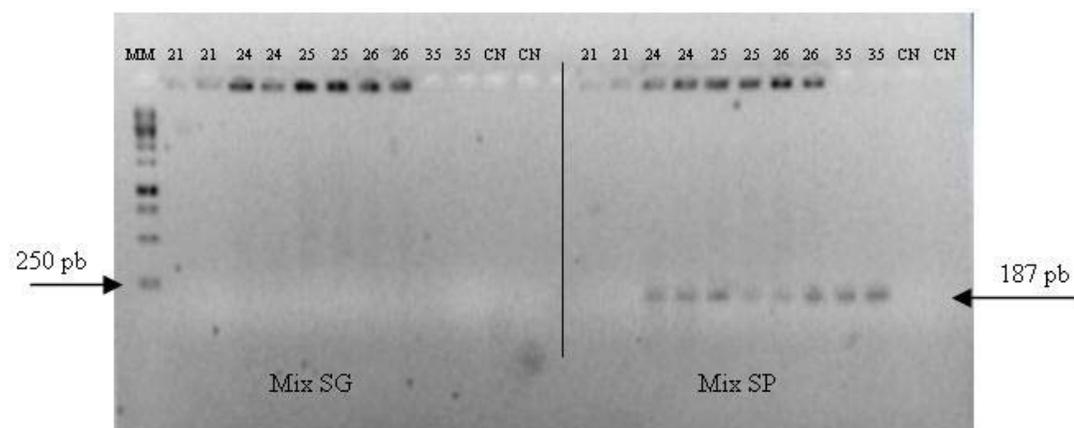


Fig. 2. Eletroforograma do Teste 3'. Amostra de SG (21). Amostras de SP (24, 25, 26 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

Dando continuidade, as amostras de *S. Gallinarum* (n^{os} 01 e 21) e *S. Pullorum* (n^{os} 24 e 35) diluídas com o acréscimo de 150µL de H₂O aos 100µL iniciais foram submetidas à PCR.

Os resultados referentes aos testes A e B são similares, sendo que os produtos de amplificação de 187pb foram observados em amostras de SP, quando da utilização do Mix SP. Entretanto, a amostra n^o 35 apresentou banda com maior nitidez, quando comparada à de n^o 24. Já para as amostras de SG não foi possível a visualização de *amplicons* (Figuras 3 e 4).

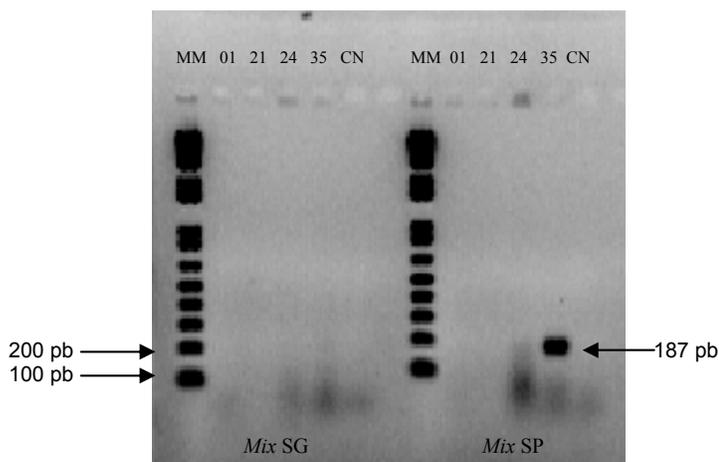


Fig. 3. Eletroforograma do Teste A. Amostras de SG (01 e 21). Amostras de SP (24 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

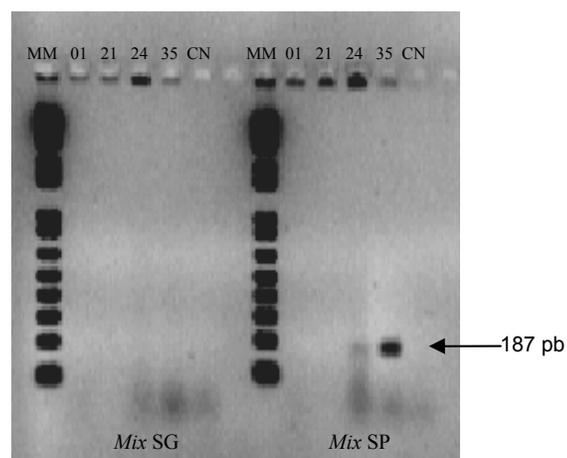


Fig. 4. Eletroforograma do Teste B. Amostras de SG (01 e 21). Amostras de SP (24 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

Nos testes C e D, os produtos de amplificação em amostras de SP utilizando *Mix* SP apresentaram 187pb. Com a utilização do *Mix* SG, apenas para a amostra de SG nº 01 foi visualizado o *amplicon* que era esperado, mas no teste C também foram constatadas bandas inespecíficas para as amostras de SP e *Mix* SG (Figuras 5 e 6).

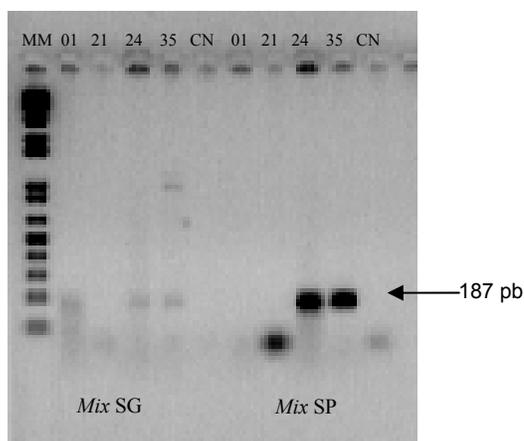


Fig. 5. Eletroforograma do Teste C. Amostras de SG (01 e 21). Amostras de SP (24 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

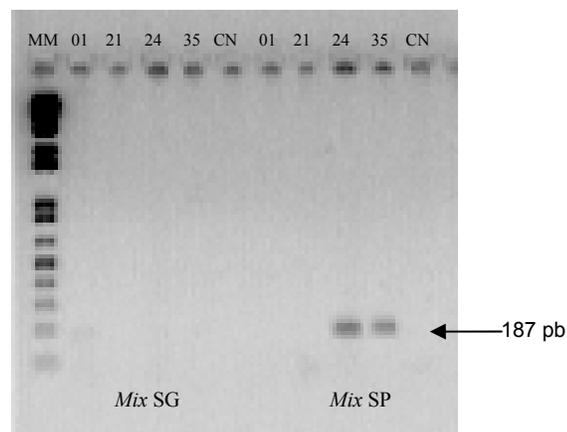


Fig. 6. Eletroforograma do Teste D. Amostras de SG (01 e 21). Amostras de SP (24 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

5.1.1.2. DNA obtido pelo método de extração a partir da colônia bacteriana segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998)

Foram utilizadas as amostras de SG n^{os} 01, 10, 11 e 21; além das de SP n^{os} 24, 31, 32 e 35. A escolha das amostras foi aleatória, exceto para os n^{os} 21, 31 e 32 que foram escolhidos devido ao comportamento bioquímico atípico apresentado.

Realizou-se a PCR seguindo a composição de cada solução presente nos testes A, B, C e D, conforme pode ser observado nas figuras 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

Nos testes A e B, as reações com *Mix SP* apresentaram amplificação específica para amostras de SP. Dentre as reações com *Mix SG*, apenas a amostra 10 apresentou *amplicon*, com a diferença que no teste A, as bandas visualizadas apresentaram-se mais nítidas do que os observados no teste B (Figuras 7 e 8).

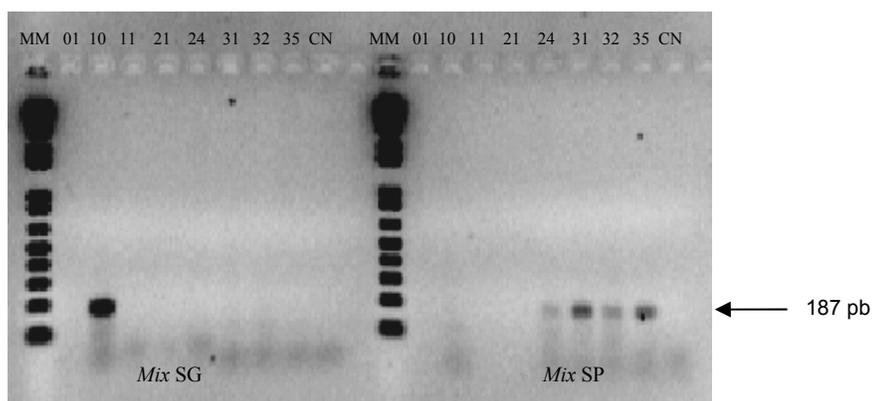


Fig. 7. Eletroforograma do Teste A. Amostras de SG (01, 10, 11 e 21). Amostras de SP (24, 31, 32 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

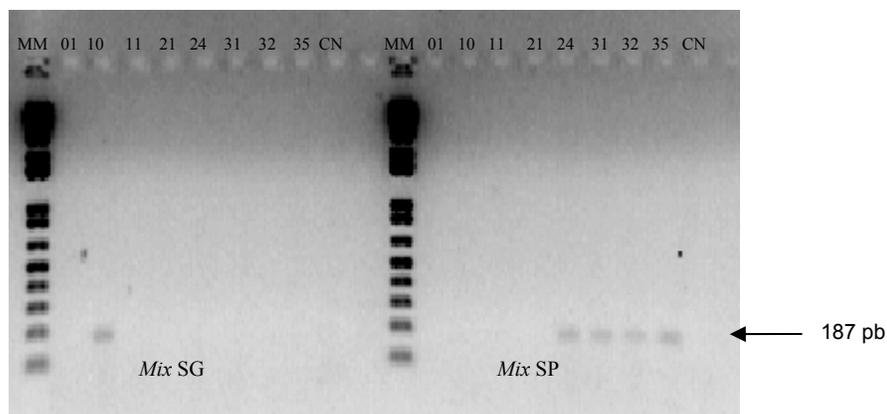


Fig. 8. Eletroforograma do Teste B. Amostras de SG (01, 10, 11 e 21). Amostras de SP (24, 31, 32 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

Para os testes C e D, as reações com *Mix SP* apresentaram a banda de 187pb para amostras de SP, mas também ocorreu amplificação inespecífica para a amostra de SG nº 10. Em relação às reações com *Mix SG*, para todas as amostras de SG foi possível a visualização de bandas específicas, apesar da presença de amplificações inespecíficas para todas amostras de SP. Entretanto, como pode ser observado, as amplificações inespecíficas ocorreram em menor intensidade no teste D do que no teste C (Figuras 9 e 10).

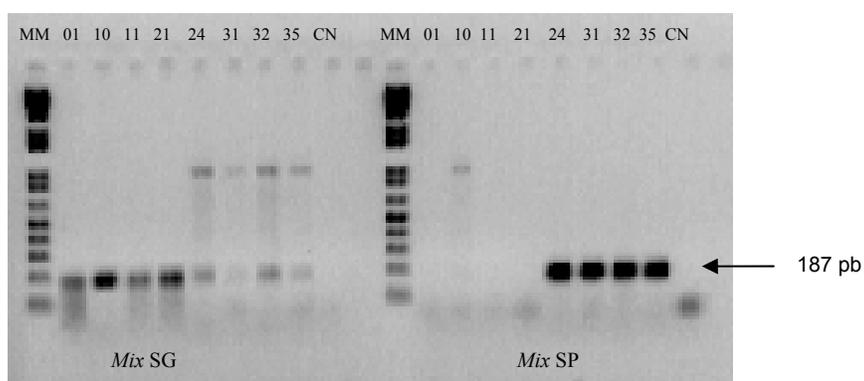


Fig. 9. Eletroforograma do Teste C. Amostras de SG (01, 10, 11 e 21). Amostras de SP (24, 31, 32 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

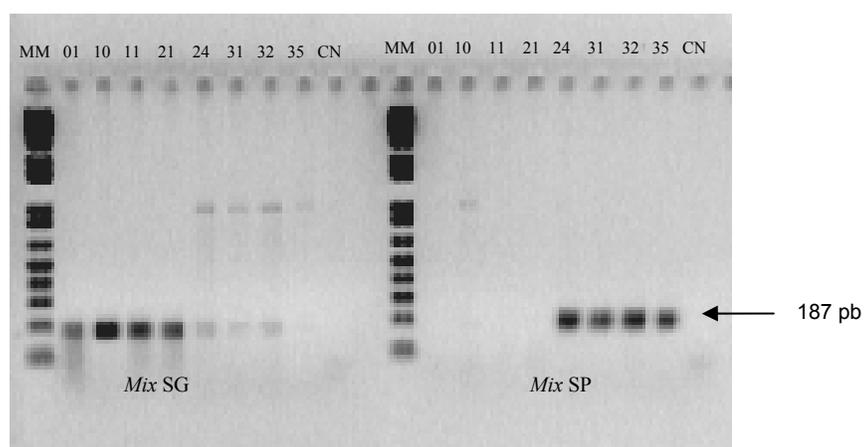


Fig. 10. Eletroforograma do Teste D. Amostras de SG (01, 10, 11 e 21). Amostras de SP (24, 31, 32 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

Em relação ao teste D apresentado na Figura 11, observa-se que as amostras de SG apresentaram produto de amplificação de 187pb em reações com *reverse primer* SG-específico e as amostras de SP em reações com *reverse primer* SP-específico. Em adição, não foram observadas bandas inespecíficas.

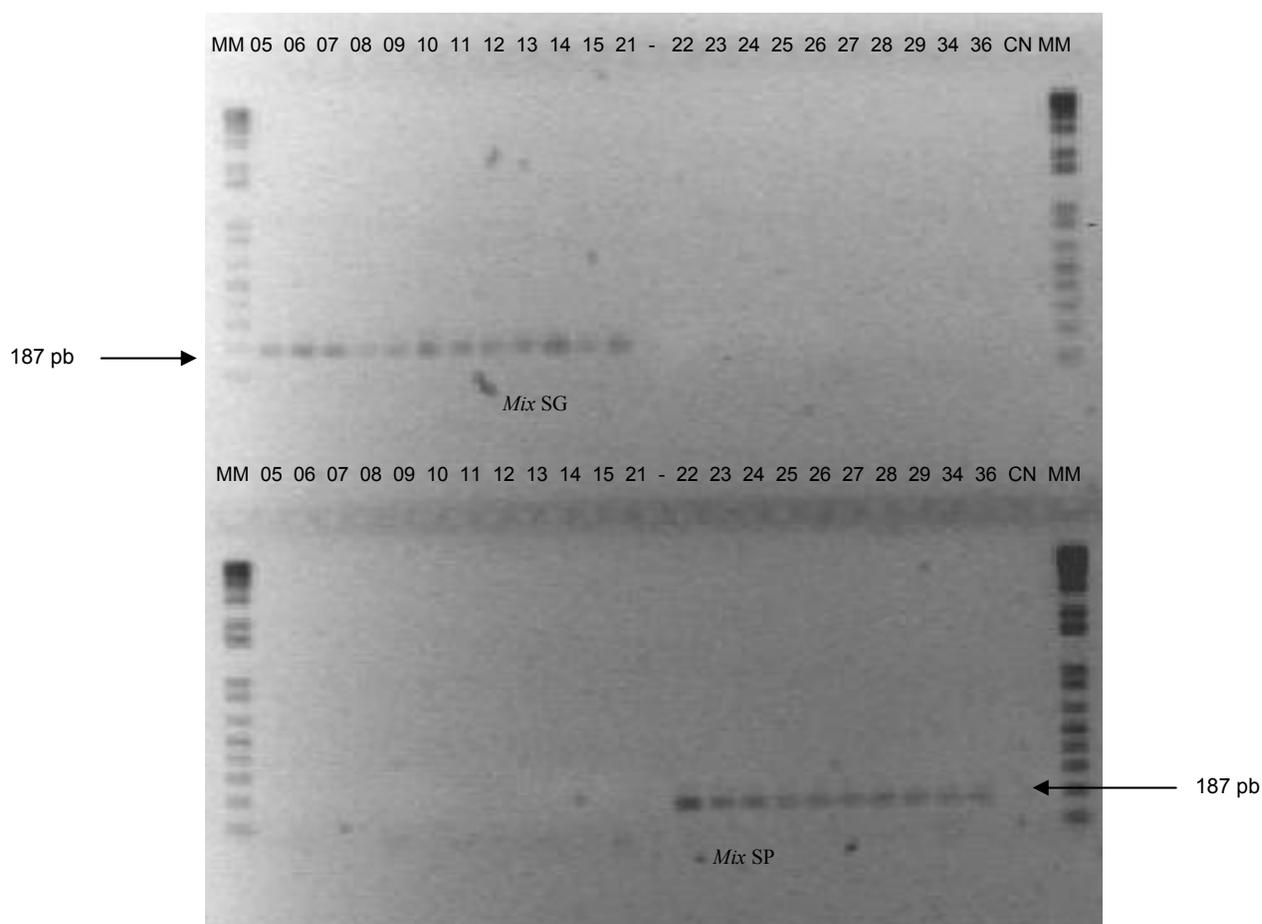


Fig. 11. Eletroforograma do Teste D. Amostras de SG (05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 21). Amostras de SP (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 34 e 36). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura).

Na Figura 12 estão os resultados relativos ao teste D, onde observa-se que as amostras de SG apresentaram produto de amplificação de 187pb em reações com *reverse primer* SG-específico. Com relação às amostras de SP, inclusive as de n^{os} 31 e 32 que apresentam comportamento bioquímico atípico (ODC-), foi possível observar bandas de tamanho idêntico ao relatado anteriormente, em reações com *reverse primer* SP-específico.

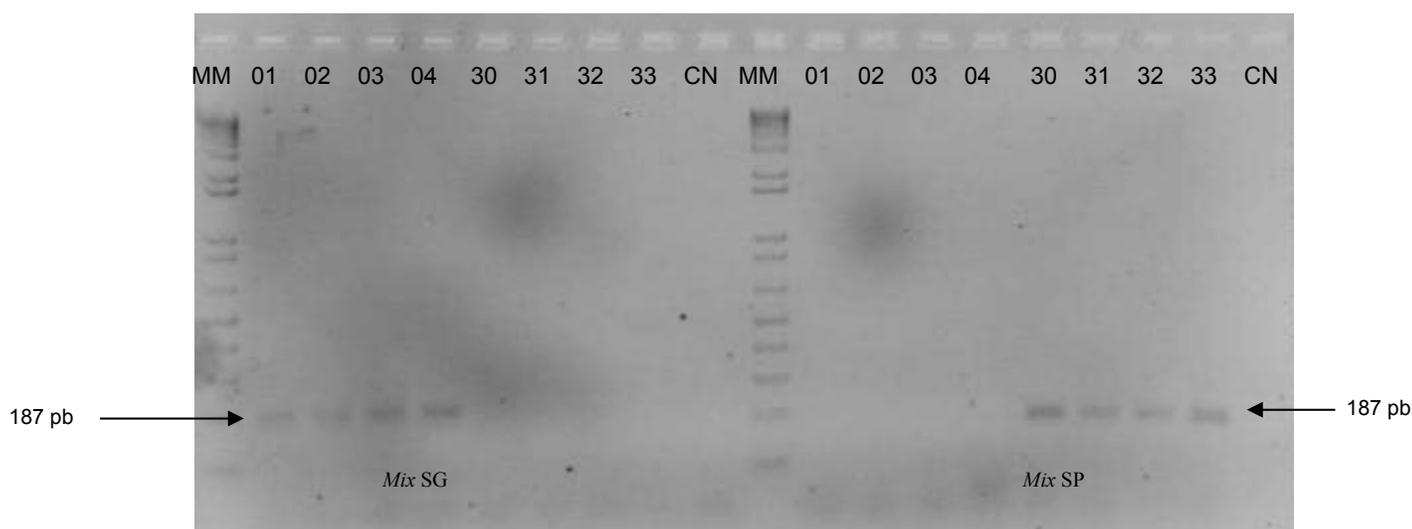


Fig. 12. Eletroforograma do Teste D. Amostras de SG (01, 02, 03, 04). Amostras de SP (30, 31, 32, 33). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura).

5.1.2. Amplificação da região polimórfica de posição 237

Segundo DESAI et al. (2005), nas reações com *primer* SP e amostras de *S. Pullorum*, é possível visualizar uma banda de 147pb, originária da amplificação do gene *rfbS* na posição 237.

5.1.2.1- DNA obtido pelo método de extração segundo SOUMET et al. (1994)

Utilizando seis amostras de *S. Pullorum* e três de *S. Gallinarum* e os testes de otimização 2' e 3', não foi possível observar produtos de amplificação.

Entretanto, utilizando os testes C e D e as amostras 01 e 21 (SG), 24 e 35 (SP), todas diluídas com acréscimo de 150 μ L de H₂O aos 100 μ L iniciais, foi possível observar os produtos de amplificação das amostras de SP com o *Mix SPP* (Figuras 13 e 14).

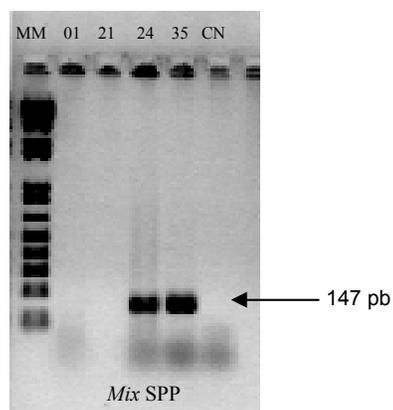


Fig. 13. Eletroforograma do Teste C. Amostras de SG (01 e 21). Amostras de SP (24 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

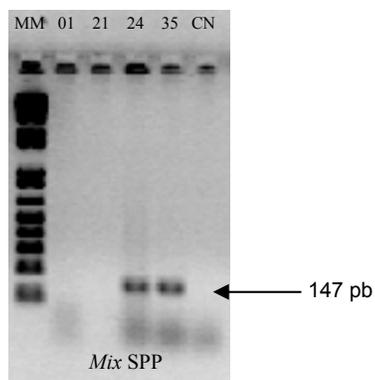


Fig. 14. Eletroforograma do Teste D. Amostras de SG (01 e 21). Amostras de SP (24 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

5.1.2.2. DNA obtido pelo método de extração de DNA a partir da colônia bacteriana segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998)

Foram utilizadas as amostras 01, 10, 11 e 21 de SG; além das amostras 24, 31, 32 e 35 de SP. As amostras 31 e 32 foram escolhidas por apresentarem comportamento bioquímico atípico. As demais amostras foram escolhidas aleatoriamente para os testes de otimização.

No teste C, as reações com *Mix SPP* apresentaram uma banda de 147pb para as amostras de SP, sendo que também ocorreu amplificação inespecífica para a amostra 10 (SG) (Figura 15).

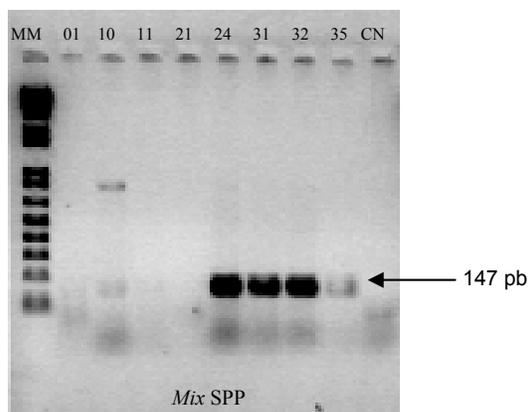


Fig. 15. Eletroforograma do Teste C. Amostras de SG (01, 10, 11 e 21). Amostras de SP (24, 31, 32 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

No teste D, as reações com *Mix SPP* apresentaram a amplificação esperada para amostras de SP, sendo que não houve amplificação inespecífica evidente para a amostra 10 (Figura 16).

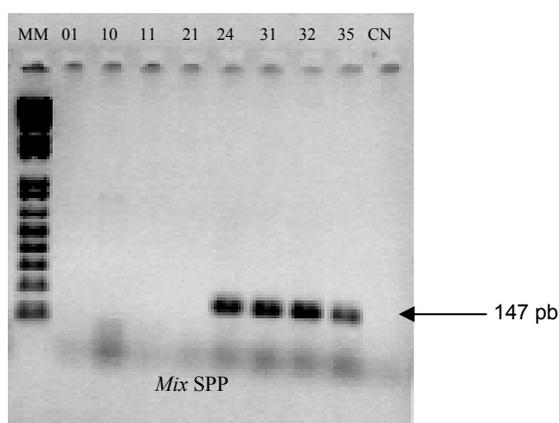


Fig. 16. Eletroforograma do Teste D. Amostras de SG (01, 10, 11 e 21). Amostras de SP (24, 31, 32 e 35). MM (1 Kb). CN (H₂O destilada ultrapura)

5.2- Diferenciação de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* pela análise dos genes *speC* e *speF*

5.2.1- Padronização da PCR

Inicialmente, realizou-se a amplificação dos dois genes em algumas amostras de SG e SP e os resultados foram analisados. Para o gene *speC*, o padrão de bandas observado foi de 2098pb, tanto em amostras de SG quanto de SP. Para o gene *speF*, foi possível observar uma banda específica, de 2138pb e outra inespecífica, maior que a anterior (Fig. 17).

Na tentativa de diferenciar os dois sorovares, os trabalhos foram conduzidos com o estudo do gene *speC*

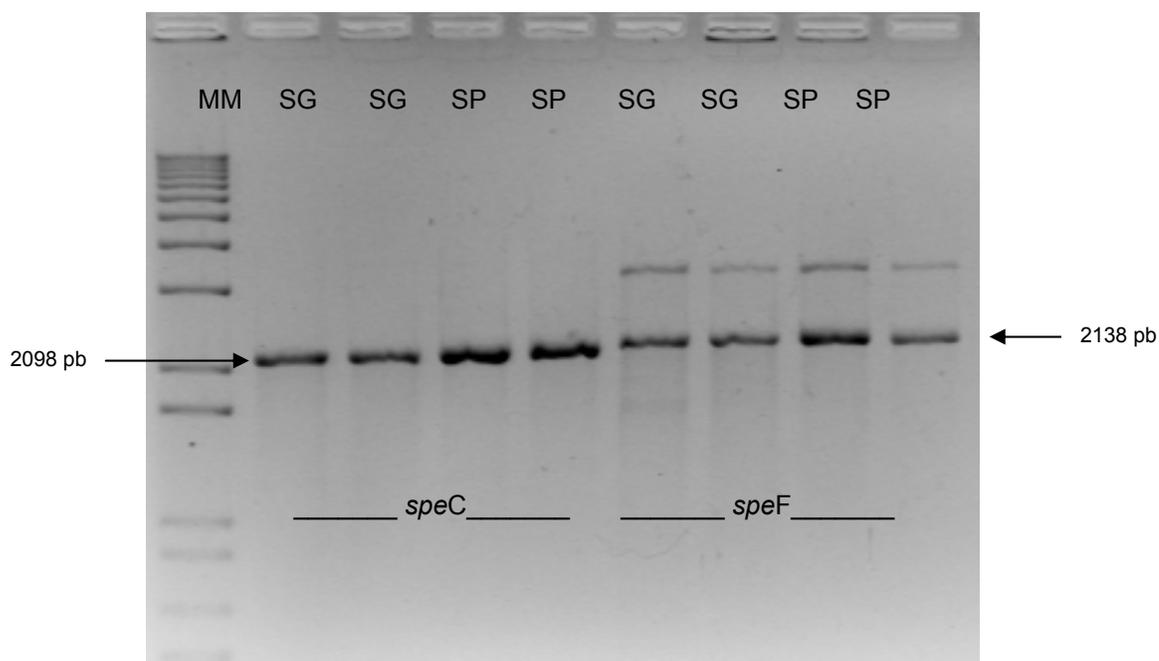


Fig. 17. Eletroforograma demonstrando a amplificação dos genes *speC* e *speF* em amostras de SP e SG. Banda 1: MM (1 Kb), bandas 2 e 3: amostras de SG e gene *speC*, bandas 4 e 5: amostras SP e gene *speC*. Bandas 6 e 7 e Bandas 8 e 9: idem para o gene *speF*.

5.2.2- Tratamento enzimático do produto de PCR (genes *speC* e *speF*)

Mesmo tendo sido eleito o gene *speC* para os estudos futuros, ambos (*speC* e *speF*) foram utilizados nesta etapa. A análise eletroforética revelou que a enzima *Sal* I não permitiu a diferenciação entre os dois sorovares, pois as bandas visualizadas em SG e SP são idênticas. Com relação aos perfis gerados pela digestão com as enzimas *Xba* I e *Eco* R I, observa-se que ambas permitiram a diferenciação entre SP e SG pela análise dos fragmentos obtidos (Fig.18). Considerando o custo referente à metodologia de tratamento enzimático, a enzima *Eco* RI foi a escolhida.

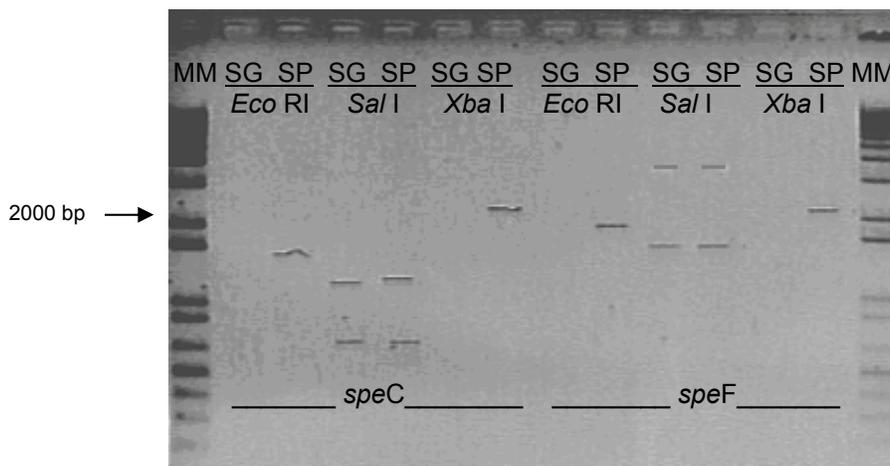


Fig. 18. Eletroforograma após tratamento enzimático dos genes *speC* e *speF* em amostras de SP e SG, utilizando as enzimas *Eco* RI, *Sal* I e *Xba* I. MM (1Kb),

5.2.3- Amplificação do gene *speC* e tratamento com a enzima *Eco* RI nas amostras estudadas

A eletroforese em gel de agarose revelou que os fragmentos gerados são idênticos nos sorovares Pullorum e Gallinarum, mesmo quando se analisa amostras atípicas (*S. Pullorum* 31 e 32) (Fig. 19).

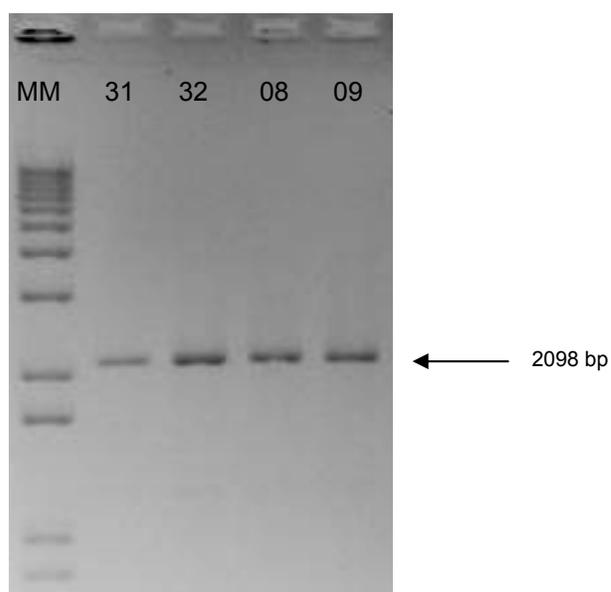


Fig.19. Eletroforograma: PCR das amostras 31 e 32 (SP atípicas); amostras 08 e 09 (SG); MM (1 Kb).

Após o tratamento enzimático, as amostras puderam ser visualizadas por eletroforese, como demonstra a figura 18. Amostras de *S. Pullorum* apresentaram uma banda, enquanto que em *S. Gallinarum* não foi observada banda visível (Fig 20).

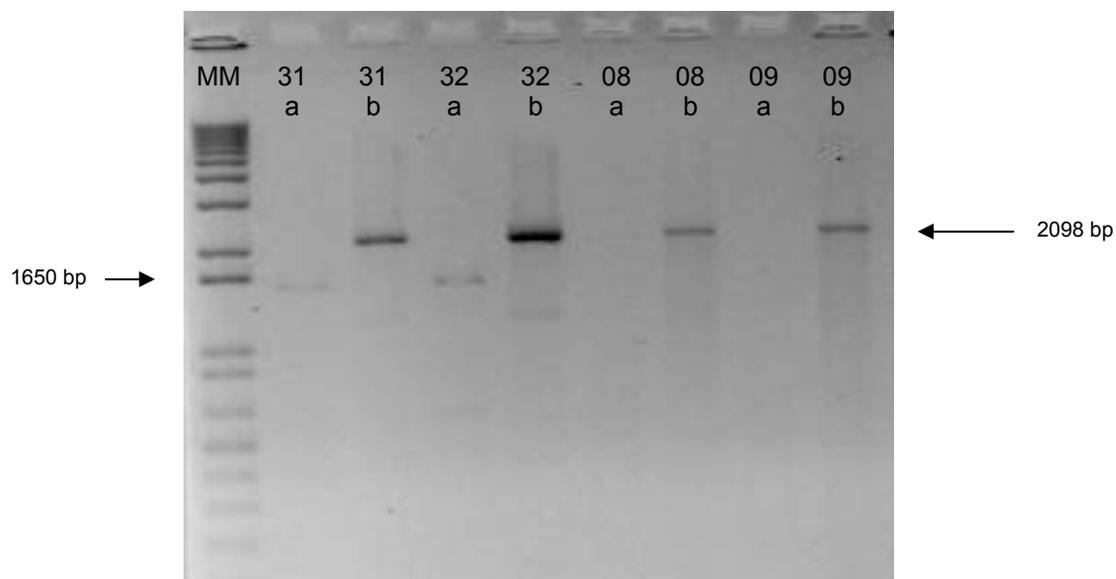


Fig.20. Eletroforograma: MM (1 Kb); amostras 31 e 32 (SP atípicas); amostras 08 e 09 (SG); após tratamento enzimático (a) e PCR do gene *speC* (b).

Amostras de *S. Pullorum* que apresentam comportamento bioquímico típico puderam ser visualizadas no gel de agarose, após o tratamento com a enzima *Eco* RI (Figura 21).

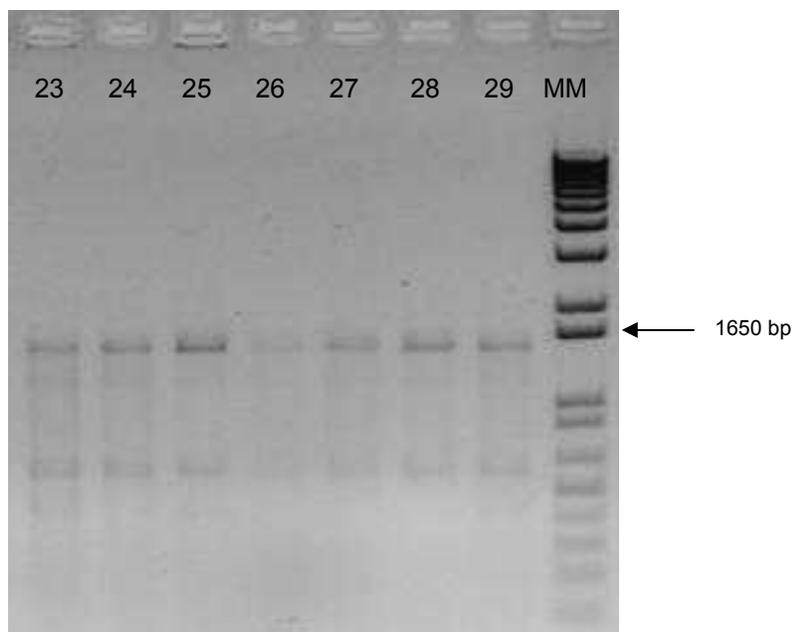


Fig.21. Eletroforograma: amostras 23 a 29 (SP com reação bioquímica típica) após o tratamento enzimático; MM (1 Kb).

A eletroforese da amostra 21 de *S. Gallinarum*, a qual apresenta reação bioquímica atípica e demais amostras de SG, as quais apresentam reação bioquímica típica (Fig.22).

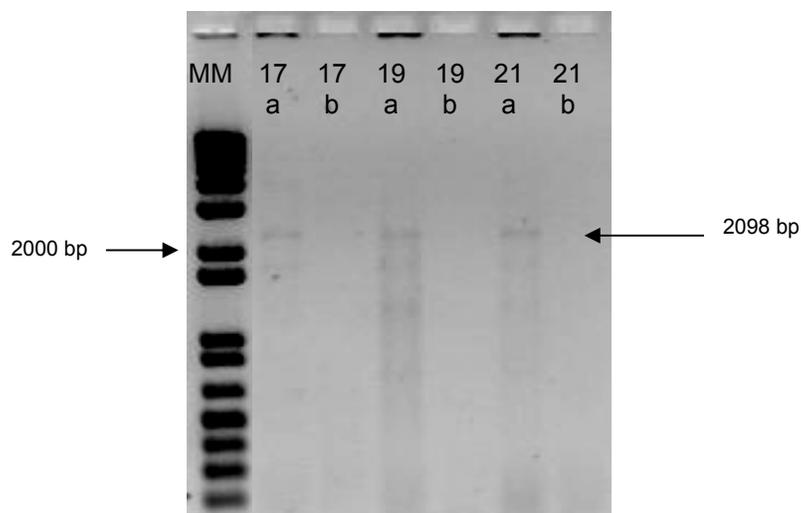


Fig.22. Eletroforograma: amostra 21 (SG atípica); demais amostras (reações típicas); PCR do gene *speC* (a); após tratamento enzimático (b); MM (1 Kb),

5.3- Caracterização bioquímica

As 35 amostras foram caracterizadas em *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, levando em consideração reações bioquímicas observadas em cada meio de cultura.

Nas provas de indol, triptofano, motilidade, sacarose, glicose, citrato, malonato, lisina, maltose, dulcita, salicina, celobiose, tartarato, gelatina e mucato, todas as 14 amostras de SP e as 21 de SG apresentaram resultado compatível com o sorotipo em questão (Quadro 8a).

Entretanto, na prova de descarboxilação da ornitina, foi constatada reação bioquímica atípica em duas amostras de SP (negativas) e em uma de SG (positiva), identificadas no quadro 8b.

Quadro 8a. Comportamento bioquímicos das 35 amostras de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*

	uréia	ind.	trip.	mot.	sac.	gás	gli.	H ₂ S*	citr.	malon.	lis.	mal.	dul.	salic.	celob.**	tart.	gel.	muc
SP	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SG	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

indol (ind.), triptofano (trip.), motilidade (mot.), sacarose (sac.), glicose (gli.), citrato (citr.), malonato (malon.), lisina (lis.), maltose (mal.), dulcita (dul.), salicina (salic.), celobiose (celob.), tartarato (tart.), gelatina (gel.), mucato (muc.).
 (*) positividade tardia; (**) positividade aos 7 dias; (-) resultado negativo; (+) resultado positivo.

Quadro 8b. Resultados bioquímicos das 35 amostras de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* quanto à assimilação de ornitina

AMOSTRAS ANALISADAS QUANTO À ASSIMILAÇÃO DA ORNITINA			
S. Pullorum		S. Gallinarum	
Resultado típico	Resultado atípico	Resultado típico	Resultado atípico
12 (+)	2 (-)	20 (-)	1 (+)

(-) resultado negativo; (+) resultado positivo.

VI- DISCUSSÃO

A Pularose e o Tifo Aviário (causados pela *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* respectivamente), acarretam prejuízos econômicos à produção avícola, razão pela qual exigem controle permanente. Os agentes etiológicos possuem estruturas antigênicas semelhantes e a diferenciação de ambos baseia-se em provas bioquímicas. Às vezes, os resultados bioquímicos não oferecem a segurança desejada.

NOBREGA (1935), utilizando procedimentos laboratoriais da época, já se referia à dificuldade em separar SP de SG. Até mesmo o esquema de Kauffmann-White, descrito em 1934 e atualizado recentemente (POPPOFF, 2001), tão amplamente utilizado na identificação dos sorovares de *Salmonella*, atualmente não permite realizar tal diferenciação.

Considerando que estirpes de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* atípicas quanto ao comportamento bioquímico, são muitas vezes isoladas, fato que dificulta e atrasa a identificação do sorotipo, torna-se imprescindível a utilização de outra ferramenta para este mesmo propósito, para que medidas sanitárias cabíveis sejam adotadas. Levando em consideração estas dificuldades, o presente trabalho foi delineado na tentativa de contribuir para a diferenciação dos dois sorovares, utilizando técnicas moleculares.

Estudos envolvendo o gene *rfbS*, presente em salmonelas do grupo D (incluindo os sorovares *Pullorum* e *Gallinarum*), foram inicialmente conduzidos por VERMA et al. (1988). Este trabalho serviu de embasamento para a padronização de um sistema de amplificação de mutação refratária, o qual foi desenvolvido por SHAH et al. (2005). Esses autores utilizaram um *kit* genérico de purificação de DNA (Dneasy Tissue Kit – Quagen, USA). No presente estudo, em substituição a este *kit*, foram utilizados dois métodos de extração de DNA das amostras de SP e SG, sendo um deles preconizado por SOUMET et al. (1994), com algumas modificações.

Inicialmente, os trabalhos foram desenvolvidos de acordo com as recomendações de SHAH et al, (2005) para amplificar a região polimórfica do gene *rfbS* na posição 598. Entretanto, face à dificuldade em reproduzir os resultados obtidos pelos

autores, tentou-se a padronização da técnica, variando-se as concentrações dos reagentes.

Em uma fase preliminar, utilizando-se testes com diferentes concentrações de *X-Mix*, *Taq* e DNA e conforme o método de extração segundo SOUMET et al. (1994), apenas a PCR de amostras de SP e *Mix* SP, empregando o teste que continha a menor quantidade de DNA, apresentou o resultado esperado, ou seja, um produto que originava uma banda de 187pb (Figura 2). Comparando-se os resultados obtidos nesta etapa, observa-se que em apenas uma amostra (nº 35), da qual o DNA foi previamente diluído, obteve-se a melhor visualização do *amplicon* e a menor quantidade de DNA retida no poço de aplicação. Os resultados deixaram antever que o excesso de DNA estava prejudicando a visualização do fragmento obtido. Assim sendo, passou-se a diluir o DNA das amostras previamente, para dar prosseguimento ao trabalho.

Durante a padronização da PCR, os componentes foram individualmente acrescentados, tendo-se como base o teste A. Em comparação com o teste A, no teste B a concentração de todos os componentes foi diminuída, mantendo-se o volume final. No teste C, as concentrações de *primer* e *Taq* permaneceram constantes, aumentaram-se as concentrações da solução de $MgCl_2$ e de DNA e diminuiu-se a concentração dos demais componentes. No teste D, o qual é uma variação do teste C, as concentrações de $MgCl_2$, *primer* e DNA permaneceram constantes e os demais reagentes foram alterados. Prosseguindo, ainda conforme o método de extração segundo SOUMET et al. (1994) e utilizando os testes previamente descritos, os resultados foram um pouco melhores, mas ainda inconsistentes. Nos testes A, B e C os resultados foram similares, sendo observado um fragmento de 187pb em reações com as amostras de SP e *Mix* SP (Figuras 3, 4 e 5). No teste C, também foi possível visualizar em uma amostra de SG frente ao *Mix* SG, o aparecimento do *amplicon* esperado, contudo, as reações entre SG e o *Mix* SP também apresentaram uma banda de 187pb, tornando este teste indesejável. Provavelmente, o aumento na concentração do DNA foi o fator que propiciou o aparecimento de bandas inespecíficas. Já no teste D não foram encontradas reações

inespecíficas e as amostras de SP apresentaram o resultado esperado (Figura 6). Apenas em uma amostra de SG observou-se traços de amplificação, demonstrando assim, que as concentrações dos componentes utilizados neste teste poderiam estar próximas da ideal.

Diante dos resultados obtidos e tendo-se em vista que não se observou o padrão de bandas que era esperado para as amostras de SG, mesmo com o emprego de diversas concentrações de reagentes, decidiu-se pela utilização do método de extração térmica a partir da colônia bacteriana seguindo as recomendações de SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998). Estes autores sugerem a realização da PCR a partir do cultivo de *Salmonella* em meio semi-sólido, ou seja, da colônia bacteriana pura, esperando-se que não ocorra a ação de substâncias interferentes, como pode ocorrer quando a amostra apresenta-se em meio de cultura líquido. Com o DNA obtido por este último método de extração, os resultados foram mais consistentes. Comparando os testes A e B, o padrão de bandas foi similar, mas os produtos de amplificação no teste B apresentaram menor intensidade, o que já era esperado, pois a concentração de todos os reagentes neste teste estava diminuída (Figuras 7 e 8). Visualizou-se bandas de 187pb para amostras de SP e *Mix* SP e dentre as reações com *Mix* SG apenas uma amostra de SG apresentou amplificação. No teste C, reações entre as amostras de SP e *Mix* SP apresentaram bandas de 187pb (Figura 9). Entretanto, as mesmas amostras com o *Mix* SG também apresentaram o padrão de bandas anterior. Em relação às amostras de SG, ocorreu amplificação em todas as amostras utilizando *Mix* SG. Assim como neste teste e o método de extração anterior, o aumento na concentração do DNA provavelmente foi o item que possibilitou o aparecimento de bandas inespecíficas em amostras de SP. No teste D, os resultados foram similares aos encontrados no teste C (Figura 10). Entretanto, as amplificações inespecíficas ocorreram em menor intensidade, sem interferir nos resultados.

Considerando os resultados obtidos durante a fase de padronização, utilizou-se o método de extração térmica a partir da colônia bacteriana e os componentes da solução empregados no teste D para a análise das demais amostras estudadas.

Analisando as amostras objeto deste estudo, foi possível observar a amplificação do gene *rfbS*, posição 598 de SP, frente ao *Mix* SP e de SG com o *Mix* SG pela visualização de uma banda de 187pb, sem a ocorrência de reações inespecíficas. É importante salientar que as amostras com comportamento bioquímico atípico com relação à prova da ornitina, SG 21, SP 31 e SP 32, apresentaram bandas de amplificação de 187pb frente ao *Mix* específico do sorovar, semelhantemente aos resultados encontrados para as demais amostras (Figuras 11 e 12).

No trabalho de SHAH et al. (2005) a metodologia para diferenciação dos sorovares Pullorum e Gallinaum não apresentou 100% de especificidade para as amostras de SP. Diante de tais resultados, DESAI et al. (2005), posteriormente, analisando o mesmo gene *rfbS* mas na posição 237, conseguiram com sucesso a padronização da PCR, com a visualização de uma banda de 147pb em amostras de SP. Considerando que este último trabalho complementava os resultados obtidos por SHAH et al. (2005), ele também foi utilizado no intuito de diferenciar as amostras de SP e SG em questão.

Com a extração de DNA seguindo o método adotado por SOUMET et al. (1994), observou-se que tanto no teste C quanto no D, as reações com *Mix* SPP apresentaram a amplificação esperada de um fragmento de 147pb, na presença de SP, enquanto que com as amostras de SG não houve amplificação, como era de se esperar (Figuras 13 e 14). Por outro lado, utilizando a extração do DNA pelo método de extração térmica a partir da colônia bacteriana segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998), o padrão de bandas foi distinto daqueles observados anteriormente (Figuras 15 e 16). No teste C foi possível observar que o fragmento de 147pb estava presente na PCR de amostras de SP, mas amplificações inespecíficas também foram observadas com SG.

À semelhança do encontrado no trabalho de DESAI et al. (2005), a PCR realizada para a amplificação da posição 237 do gene *rfbS*, utilizando os dois métodos de extração de DNA e com a concentração dos reagentes do teste D, apresentou as amplificações desejadas, sem o aparecimento de reações inespecíficas. Os mesmos

resultados também foram observados em amostras de SP atípicas, ou seja, um fragmento de 147pb.

A diferenciação de SP e SG também foi tentada com base na amplificação dos genes *speC* e *speF*. Estes genes estão relacionados com a metabolização da ornitina e sendo esta uma das provas discriminatórias entre SP e SG, a amplificação dos mesmos poderia revelar diferenças entre os dois sorovares. Além disso, tendo-se em vista que amostras de SP e SG apresentando comportamento bioquímico atípico são objeto deste estudo, a análise dos genes *speC* e *speF* destas amostras poderia ser útil na distinção entre os dois sorovares.

Durante a padronização da PCR, utilizou-se as informações contidas em SAMBROOK & RUSSEL (2001) sobre a concentração dos componentes, as etapas da amplificação e da análise dos fragmentos, visto que ainda não se tinha informações sobre a PCR para amplificação destes genes.

Inicialmente, foram utilizadas aleatoriamente algumas amostras de SP e SG para a amplificação dos genes *speC* e *speF*, os quais apresentavam 2098pb e 2138pb, respectivamente (Figura 17). O fragmento de 2098pb foi observado após a amplificação do gene *speC*, tanto em amostras de SP quanto de SG. Em contrapartida, para o gene *speF*, além da banda de 2138pb, outro fragmento inespecífico e bem maior que o do próprio gene também foi visualizado nas amostras de SP e SG. Os resultados obtidos nesta etapa subsidiaram os trabalhos posteriores, utilizando apenas o gene *speC*.

Levando em consideração que o sequenciamento de *speC* em SP e SG não estava disponível, os trabalhos foram conduzidos à medida que os resultados iam sendo obtidos, embasados no fato de que a expressão de tal gene em *S. Pullorum* é oposta da observada em SG. Com relação ao gene *speC*, o qual está relacionado com a descarboxilação da ornitina e o resultado para esta prova é diferente em SP e em SG (SP positivo e SG negativo), poderia inferir-se que a seqüência de bases nitrogenadas do gene *speC*, presente em cada sorovar também seria distinta. Neste sentido, o uso de enzimas de restrição poderia ser um instrumento útil na diferenciação de SP e SG, visto que o sítio de clivagem em cada uma das duas salmonelas poderia revelar fragmentos de tamanhos diferentes após a ação da enzima de restrição.

Foram utilizadas as enzimas *Sal* I, *Xba* I e *Eco* RI aleatoriamente, por não se ter conhecimento da ação das mesmas sob o gene *speC* (Figura 18). Os resultados obtidos após a metodologia de tratamento enzimático com a enzima *Sal* I não permitiu diferenciar os dois sorovares e sendo assim, a mesma foi descartada. Com relação às enzimas *Xba* I e *Eco* RI, ambas apresentaram potencial para diferenciação entre *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* e devido à disponibilidade e ao custo de cada uma, a enzima *Eco* RI foi escolhida para utilização neste trabalho.

A análise das 13 amostras de SP e 20 de SG isoladas no Brasil e das duas cepas de referência (ATCC) revelou que os fragmentos gerados para cada sorovar é distinto. Mesmo quando analisou-se as cepas de comportamento bioquímico atípico para a prova da ornitina (SG 21, SP 31 e SP 32), os resultados foram idênticos em cada *Salmonella* (Figuras 19 a 22).

Tendo como base as informações contidas no trabalho de SHAH et al. (2005), é de se ressaltar que o mesmo não foi reproduzido com facilidade, tendo em vista a necessidade de testar várias concentrações de reagentes, no intuito de padronizar a reação. Entretanto, após definir a concentração dos reagentes a ser utilizada na reação de PCR, o sistema de amplificação de mutação refratária para o gene *rfbS*, posição 598 foi extremamente útil na diferenciação entre amostras de SP e SG, mesmo quando estas apresentavam reações atípicas quanto à assimilação da ornitina. O mesmo comentário pode ser feito para o trabalho de DESAI et al. (2005), o qual refere-se também ao gene *rfbS*, mas na posição 237. Portanto, ambos são factíveis, dentro das condições do experimento.

Neste trabalho, os genes *speC* e *speF* relacionados com a assimilação da ornitina também foram objeto de estudo, devido às características distintas entre SP e SG para esta prova. Foi possível demonstrar que estes genes apresentam suas seqüências de bases diferentes, fato demonstrado após o uso de enzimas de restrição. Após a padronização da técnica, o gene *speC* das amostras de SP e SG foi submetido à ação da enzima *Eco* RI, possibilitando a diferenciação entre elas, inclusive quando amostras com comportamento atípico na prova da ornitina eram analisadas. Tais resultados subsidiam trabalhos posteriores no intuito de sequenciar o gene em questão

e com estas informações disponíveis, elaborar *primers* específicos para a região de seqüência distinta, comparando as duas salmonelas. À semelhança dos trabalhos realizados por SHAH et al (2005) e DESAI et al (2005), é provável que a construção destes *primers* possam substituir o uso de enzimas de restrição e assim, diminuir o custo da técnica e o trabalho para realizá-la.

É importante esclarecer que os resultados bioquímicos encontrados em algumas amostras não condiziam com a identificação original. Por este motivo, foi necessária a confirmação no IAL, fato que propiciou o esclarecimento quanto à tipificação das mesmas.

Desta forma, justifica-se a utilização dos protocolos descritos aqui no intuito de aprimorar a distinção entre *Samonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, realizando-a com rapidez e assim, contribuir para a correta tomada de decisão visando a adoção de medidas para o controle em áreas endêmicas, onde a pulorose / tifo aviário está presente em criações avícolas.

VII- CONCLUSÕES

Dentro do modelo experimental adotado, concluiu-se que:

- A diferenciação entre *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* pode ser realizada pela análise do gene *rfbS* na posição 598, utilizando a extração térmica de DNA segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998) e a concentração de reagentes descrita no teste D;

- A análise do gene *rfbS* na posição 237, utilizando a extração térmica de DNA segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001) e TURNER et al. (1998) e segundo SOUMET et al. (1994), e a concentração de reagentes descrita no teste D, mostrou-se também eficaz no intuito de diferenciar os dois sorovares;

- A digestão enzimática do gene *speC*, utilizando a enzima *Eco* RI demonstrou ser uma técnica molecular eficiente na diferenciação dos sorotipos *Pullorum* e *Gallinarum*, mesmo quando se analisa amostras atípicas quanto à assimilação da ornitina;

- A utilização dos protocolos descritos neste trabalho pode ser adotado no intuito de contribuir para a tomada de decisão no campo, uma vez que há redução no tempo necessário para que se tenha em mãos o diagnóstico definitivo;

- Estudos futuros devem ser realizados dentro do propósito de sequenciar o gene *speC* e construir *primers* específicos da região diferenciada em SP e SG. Desta forma, é possível que a PCR deste gene seja ainda mais aperfeiçoada e assim apresente maior rapidez e menor custo.

VIII- REFERÊNCIAS

BERCHIERI JR., A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000, p. 185-196.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, Compton, v. 30, n.1, p. 229-239, 2001.

BRASIL. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Portaria 193. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília – DF, 19 set 1994. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como Livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e livres ou controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. Atos legais. Instrução Normativa 78. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília – DF, 03 nov 2003. Seção 1, p 1-9.

BUCHALA, F. G.; ISHIZUKA, M. M.; MATHIAS, L. A.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; KANASHIRO, A. M. I. Ocorrência de reação sorológica contra *Salmonella* Pullorum em aves de “fundo de quintal” do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 1-5, 2006.

CABELLO, G. M. K. **PCR alelo-específico (teste de ARMS)**. Laboratório de Genética Humana, Departamento de Genética, IOC, FIOCRUZ. Disponível em: <<http://www.ghente.org/ciencia/genetica/>>. Acesso em: 18 set. 2005.

CHRISTENSEN, J. P.; OLSEN, J. E.; HANSEN, H. C.; BISGAARD, M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar gallianrum and pullorum by plasmid profiling and biochemical analysis. **Avian Pathology**, Compton, v. 21, n. 1, p. 461-470, 1992.

COHEN, N. D.; NEIBERGS, H. L.; MCGRUDER, E. D.; WHITFORD, H. W.; BEHLE, R. W.; RAY, P. M.; HARGIS, B. M. Genus-specific detection of Salmonellae using the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 5, n. 1, p. 368-371, 1993

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MAAS, W. K. Isolation, characterization, and mapping of *Escherichia coli* mutants blocked in the synthesis of ornithine decarboxylase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 124, n. 2, p. 791-799, 1975.

DESAI, A. R.; SHAH, D. H.; SHRINGI, S.; LEE, M. J.; LI, Y. H.; CHO, M. R.; PARK, J. H.; E. O, J. H.; CHAE, J. S. An allele-specific PCR assay for the rapid and serotype-specific detection of *Salmonella Pullorum*. **Avian Diseases**, Athens, v. 49, n. 1, p. 558-561, 2005.

FERRIE, R. M.; SCHWARZ, M. J.; ROBERTSON, N. H.; VAUDIN, S.; SUPER, M.; MALONE, G.; LITTLE, S. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutation in the CFTR gene. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 251-262, 1992.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 25, n.2, p. 541-554, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 182.

GAMBIRAGI, A. P. O. M.; SALLES, R. P. R.; OLIVEIRA, W. F.; MACIEL, W. C.; ROMÃO, J. M.; TEIXEIRA, R. S. C. *Salmonella* sp em frangos de corte de um dia de idade na região metropolitana de Fortaleza-CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, n. 3, p. 149-153, 2003.

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: _____. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. In: 9th ed. Maryland: Williams & Wilkins, 1993. p. 215-216.

ITOH, Y.; HIROSE, K.; MIYAKE, M.; KHAN, A. Q.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T. Amplification of *rfbE* and *fliC* genes by polymerase chain reaction for identification and detection of *Salmonella* Serovar Enteritidis, Dublin and Gallinarum-Pullorum. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 41, n. 10, p.791-794, 1997.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6th ed. Gaithersburg: Aspen Publication, 2000. p. 679.

KAMPELMACHER, E. H. Poultry disease and public health. **British Poultry Science**, London, v. 28, n. 1, p. 3-13, 1987.

KYRIAKIDIS D. A.; HELLER, J.; CANELLAKIS, E. S. Modulation of ornithine decarboxylase activity in *Escherichia coli* by positive and negative effectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 75, n. 10, p. 4699-4703, 1978.

LAMPEL, K. A.; KEASLER, S. P.; HANES, D. E. Specific detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis using polymerase chain reaction. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 137-145, 1996.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; ARAÚJO, L. M. G. Comportamento bioquímico e composição antigênica de culturas de *Salmonella gallinarum* e *S. pullorum* isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4, p. 149-154. 1982.

LI, J.; SMITH, N. H.; NELSON, K.; CHICHTON, P.; OLD, D. C.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. **Journal of Medical Microbiology**, Livingstone, v. 38, n. 1, p. 129-139, 1993.

LIU, D.; VERMA, N. K.; ROMANA, L. K.; REEVES, P. R. Relationships among the rfb regions of *Salmonella* serovars A, B, and D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 15, p. 4814-4819, 1991.

LUK, J. M. C.; KONGMUANG, U.; REEVES, P. R.; LINDBERG, A. A. Selective amplification of arabinose and paratose synthetase (rfb) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 8, p. 2118-2123, 1993.

LUK, J. M. C.; KONGMUANG, U.; TSANG, R. S. W.; LINDBERG, A. A. An enzyme linked immunosorbent assay to detect PCR products of the rfbS gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 3, p. 714-718, 1997.

MAKINO, S.; KURAZONO, H.; CHONGSANGUAM, M.; HAYASHI, H.; CHEUN, S. S.; SHIRAHATA, T. Establishment of the PCR System Specific to *Salmonella* spp. And Its Application for the Inspection of Food and Fecal Samples. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Seoul, v. 61, n. 11, p. 1245-1247, 1999.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; HELMUTH, R. Standardization for the detection of *Salmonella* by PCR. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM *SALMONELLA* AND *SALMONELLOSIS*, 2002, Saintt-Malo. Abstracts..., p. 61-65.

McCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S. W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU S.; LAYMAN D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SIM, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R. K. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, London, v. 413, n. 6858, p. 852-856, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger. **Princípios de bioquímica**. 3th ed. São Paulo: Sarvier, 2002, p. 887.

NOBREGA, P. Diferenciação entre “*S. pullorum*”, e “*S. gallinarum*”. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 71-84, 1935.

OLIVEIRA, G. H.; FERNANDES, A. C.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Estudo sobre a epidemiologia de *Salmonella* Gallinarum em aves de postura comercial. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.1, supl. 3, p. 89, 2001.

OLSEN, J. E.; SKOV, M. N.; CHRISTENSEN, J. P.; BISGAARD, M. Genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 45, n. 1, p. 413-418, 1996.

PANAGIOTIDIS, C. A.; BLACKBURN, S.; LOW, K. B.; CANELLAKIS, E. S. Biosynthesis of polyamines in ornithine decarboxylase, arginine decarboxylase, and agmatine ureohydrolase deletion mutants of *Escherichia coli* strain K-12. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n. 1, p. 4423-4427, 1987.

PARK, M. K.; CHOI, K. S.; KIM, M. C.; CHAE, J. S. Differential diagnosis of *Salmonella* Gallinarum e *S. Pullorum* using PCR-RFLP. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 2, n. 3, p. 213-219, 2001.

PEREIRA, V. L. A.; SILVA, G. M.; LEMOS, M. Presença de *Salmonella* em frangos de corte aparentemente sadios em unidades de criação industrial na região de São José do Vale do Rio Preto – RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 6, n. 3, p. 156-161, 1999.

POMEROY, B. S; NAGARAJA, K. V. Fowl typhoid. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.;

BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, W. H. Ed. In: _____. **Diseases of Poultry**. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 1991, p. 87-99.

POPPOFF, M. Y. **Antigenic formulas of the Salmonella serovars**, 8th ed. Geneva: World Health Organization, 2001.

PROUX, K.; HUMBERT, F.; JOUY, E.; HOUDAYER, C.; LALANDE, F.; OGER, A.; SALVAT, G. Improvements required for the detection of Salmonella Pullorum and Gallinarum. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Ontario, v. 66, n. 1, p. 151-157, 2002.

RILEY, M.; ANILIONIS, A. Conservation and variation of nucleotide sequences within related bacterial genomes: Enterobacteria. **Journal of Bacteriology**, New York, v. 143, n. 1, p. 366-376, 1980.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3th ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, New York, 2001. v. 1.

SHAH, D. H.; PARK, J.; CHO, M.; KIM, M.; CHAE, J. Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing Salmonella gallinarum from Salmonella pullorum: serotype-specific *rfbS* sequence polymorphism. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 169-177, 2005.

SHIVAPRASAD, H. L. Pullorum disease and fowl typhoid. In: CALNEK, B. W. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1997, p. 82-96.

SILVA, J. M. L. Salmonelose aviária. In: ENCONTRO EMPRESARIAL DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA AVÍCOLA, 1991, SALSBURY, Campinas. **Anais...**, p. 59-69.

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. **Applied Microbiology**, Washington, v. 19, n.1, p. 294-298, 1994.

STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; MCVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. Combined PCR - oligonucleotide ligation assay for rapid detection of *Salmonella* serovars. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 11, p. 2888-2893, 1995.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K.

Changing patterns of Salmonella serovars: Increase of Salmonella Enteritidis in São Paulo Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 315-322, 1996.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M., ZANATTA, G. F., KANASHIRO, A. M. I. Incidência de *Salmonella ssp.* em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 279-281, 2003.

TRABULSI, L. R.; EDWARDS, P. R. The differentiation of *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum* by biochemical methods. **Cornell Veterinarian**, Ythaca, v. 52, n. 1, p. 563-569, 1962.

TUCHILI, L. M.; KODAMA, H.; IZUMOTO, Y.; MUKAMOTO, M.; FUKATA, T. Detection of Salmonella Gallinarum and S. Typhimurium DNA in Experimentally Infected Chicks by Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Seoul, v. 57, n. 1, p. 59-63, 1995.

TURNER, A. K.; Lovell, M. A.; Hulme, S.; ZHANG-BARBER, L.; BARROW, P. A. Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2099-2106, 1998.

VERMA, N.; REEVES, P. Identification and sequence of rfbS and rfbE, which determine antigenic specificity of group A and group D Salmonellae. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, n.10, p. 5694-5701, 1989.

VERMA, N.; QUIGLEY, N. B.; REEVES, P. R. O-Antigen Variation in Salmonella spp.: rfb Gene Clusters of Three Strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, n.1, p. 103-107, 1988.

XIANG, S. H.; HAASE, A. M.; REEVES, P. R. Variation of the rfb gene clusters in Salmonella enterica. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, n.15, p. 4877-4884, 1993.

XIANG, S. H.; HOBBS, M.; REEVES, P. R. Molecular analysis of the rfb gene cluster of a group D2 Salmonella enterica strain: evidence for its origin from an insertion sequence-mediated recombination event between group E and D1 strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 14, p. 4357-4365, 1994.

WRIGHT, J. M.; BOYLE, S. M. Negative control of ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase by adenosine-3':5'-cyclic monophosphate in *Escherichia coli*. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 186, n.1, p. 482-487, 1982.

WRIGHT, J. M.; BOYLE, S. M. Intergeneric Homology of the *spec* Gene Encoding Biosynthetic Ornithine Decarboxylase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 159, n. 3, p. 1074-1076, 1984.

WU, K.; LIU, G.; LIU, W.; WANG, A. Q.; ZHAN, S.; SANDERSON, K. E.; JOHNSTON, R. N.; LIU, S. The Genome of *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum: distinct insertions/deletions and rare rearrangements. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 14, p. 4720-4727, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)