UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

INFECÇÃO DE AVES POR MUTANTES DE *Salmonella* SOROTIPOS GALLINARUM, PULLORUM E ENTERITIDIS COM DELEÇÃO NOS GENES *cob*S E *cbi*A

Jacqueline Boldrin de Paiva
Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL
Fevereiro de 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

INFECÇÃO DE AVES POR MUTANTES DE *Salmonella* SOROTIPOS GALLINARUM, PULLORUM E ENTERITIDIS COM DELEÇÃO NOS GENES *cob*S E *cbi*A

Jacqueline Boldrin de Paiva
Orientador: Prof. Dr. Ângelo Berchieri Junior

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Unesp Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL
Fevereiro de 2010

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Jacqueline Boldrin de Paiva- Nascida em 07 de março de 1984, natural de São José do Rio Pardo Estado de São Paulo, Brasil. Concluiu licenciatura em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP de Jaboticabal em 2006 e o bacharelado em Ciências Biológicas modalidade Biotecnologia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP de Jaboticabal em 2007. Foi bolsista de Iniciação Científica duas vezes pela Fapesp entre os anos de 2005 e 2007.

Quem conduz e arrasta o mundo
não são as máquinas, mas as idéias.
Vitor Hugo

Nada é mais perigoso que a certeza de ter razão.
É preciso idolatrar a dúvida.
T. Todorov

AGRADECIMENTOS

À Fapesp-Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo por ter financiado este trabalho.

Ao Dr. Marteen James Warren e à Dra. Evelyn Raux-Deery, da Universidade de Kent/UK, pelo auxílio teórico e doação do Ágar de MacConkey para detecção de vitamina B_{12}.

Ao Dr. Fernando Sesma do Centro de Referência para Lactobacilos/Argentina, pela amabilidade, disponibilidade, gentileza e cumplicidade que se iniciaram durante a elaboração dos ensaios de determinação de vitamina B_{12} e que se estendem até o momento atual.

À Julina de Antonio, Adriana Nabil Abdel-Fatah Ibrahim, Viviane de Souza Morita, Fernanda Larosa Paganelli, Melina Cristina Mancini, Jaqueline Raymondi Silva. Aos Marcelo Marchi Costa, Rafael Antonio Casarin Penha Filho e Tiago Rinaldi Jacob, por terem sido parte integrante e atuante da minha vida antes e durante a confecção deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, por ter me proposto o desafio de estudar a mais fascinante, excitante e apaixonante molécula do mundo da ciência: a cobalamina.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....vii

SUMMARY.....vii

I. INTRODUÇÃO.....01

II. REVISÃO DE LITERATURA.....04

2.1. Salmoneloses aviárias.....04
2.1.1. *Salmonella* Pullorum.....05
2.1.2. *Salmonella* Gallinarum.....06
2.1.3. *Salmonella* Enteritidis.....07
2.1.4. Fisiologia bacteriana da infecção.....09

2.2. Vitamina B_{12}.....11
2.2.1. Histórico.....11
2.2.2. Estrutura.....12
2.2.3. Classificação das reações dependentes de vitamina B_{12}.....14
2.2.4. Biossíntese e utilização de vitamina B_{12}.....15
2.2.5. Origem da vitamina B_{12}.....16
2.2.6. Reações dependentes de vitamina B_{12} em *Salmonella* Typhimurium.....18
2.2.7. Análise genética da síntese de vitamina B_{12} em *Salmonella* Typhimurium.....21
2.2.8. Transporte de vitamina B_{12}.....23
2.2.9. Regulação da biossíntese de vitamina B_{12} em *Salmonella* Typhimurium.....25

2.2.10. Significado biológico da síntese de vitamina B_{12} para *Salmonella* spp.....26

III. OBJETIVOS.....30

IV. MATERIAL E MÉTODOS.....31

4.1. Preparo dos mutantes.....31
4.1.1. “Primers” utilizados.....31
4.1.2. Preparo do gene alterado (defectivo).....32
4.1.3. Inserção do gene no plasmídio p-Gem T.....33
4.1.4. Extração do plasmídio p-Gem T de *E. coli* JM109.....34
4.1.5. Digestão enzimática.....34
4.1.6. Adição do gene que confere à bactéria resistência ao antibiótico e transformação do vetor.....35
4.1.7. Extração do plasmídio p-Gem easy vector de *E. coli* JM109 e digestão enzimática.....35
4.1.8. Ligação do gene defectivo no plasmídio.....36
4.1.9. Preparo de células de *Escherichia coli* DH5α.....36
4.1.10. Eletro- transformação.....36
4.1.11.Transferência de p-JCB12 (C^r e Can^r ou Spc^r) para *E. coli* S17.1 λ pir.....37
4.1.12. Conjugação do gene defectivo (Can^r ou Spc^r) com as cepas receptoras de $SGNal^r$, $SPNal^r$ e $SENal^r$.....37
4.1.13. Transdução.....37
4.1.14.Caracterização final dos mutantes.....39

4.2. Ensaios *in vivo.* Avaliação da infecção.....40
4.2.1. *Salmonella* Gallinarum Δ*cob*SΔ*cbi*A: Avaliação da mortalidade..... 40

4.2.2 *Salmonella* Gallinarum Δ*cob*SΔ*cbi*A: Avaliação da infecção sistêmica.....40
4.2.3. *Salmonella* Pullorum Δ*cob*SΔ*cbi*A: Avaliação da mortalidade.....41
4.2.4. *Salmonella* Pullorum Δ*cob*SΔ*cbi*A: Avaliação da infecção sistêm.....41
4.2.5. *Salmonella* Enteritidis Δ*cob*S Δ*cbi*A: Avaliação da excreção fecal e mortalidade.....42
4.2.6. *Salmonella* Enteritidis Δ*cob*S Δ*cbi*A: Avaliação da infecção sistêmica.....42

4.3. Análise dos resultados 43

4.4. Detecção da produção de vitamina B_{12}.....43
4.4.1.Ensaio qualitativo.....43
4.4.2. Ensaio quantitativo 44

V. RESULTADOS.....46
5.1. Preparo das cepas mutantes.....46
5.2. Resultados *in vivo* 50
5.2.1. *Salmonella* Gallinarum 50
5.2.2. *Salmonella* Enteritidis.....53
5.2.3. *Salmonella* Pullorum.....57
5.3. Detecção de vitamina B_{12}.....60
5.3.1. Método quantitativo.....60
4.3.2. Método qualitativo.....62

VI. DISCUSSÃO.....65

VII. CONCLUSÕES.....71

VIII. REFERÊNCIAS.....72

ESTUDO SOBRE A INFECÇÃO DE AVES POR MUTANTES DE

***Salmonella* Sorotipos Gallinarum, Pullorum e Enteritidis Δ*cob*SΔ*cbi*A**

Resumo- *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium sintetiza cobalamina (Vitamina B_{12}) apenas sobre condições anaeróbicas. Dois porcento do genoma da *S.* Typhimurium é dedicado a reações dependentes de vitamina B_{12} como cofator, sua síntese e absorção. Neste estudo nós preparamos mutantes de *Salmonella* sorotipos Enteritidis, Gallinarum e Pullorum duplo defectivos na biossintese de cobalamina, cepas Δ*cobS*Δ*cbiA*. A virulência destes mutantes foi comparada com as respectivas cepas selvagens e, nenhuma deficiência na capacidade de causar doença foi observada para as cepas de *S*. Enteritidis Δ*cobS*Δ*cbiA* e *S.* Pullorum Δ*cobS*Δ*cbiA. S.* Gallinarum Δ*cobS*Δ*cbiA* por sua vez, mostrou atenuação total. Posteriormente nós testamos a produção de B_{12} pelas cepas mutantes e selvagens já descritas, e incluímos neste estudo a cepa de *S.* Typhimurium Δ*cobS*Δ*cbiA*, e sua respectiva cepa selvagem. Todas as cepas mutantes não tiveram produção de B_{12} detectada. As cepas selvagens mostraram produção de vitamina B_{12} em ambos os ensaios utilizados, com exceção da *S*. Gallinarum que não apresentou produção de cobalamina *in vitro*. Como conclusão, a produção de vitamina B_{12} *in vitro* diferiu entre os sorotipos de *Salmonella* testados, a deleção dos genes *cbiA* e *cobS* produziu alteração na relação parasita hospedeiro em diferentes níveis entre os sorotipos de *Salmonella* estudados, sendo que esta foi muito maior entre o sorotipo Gallinarum e as aves.

Palavras-chave: cobalamina, mutantes, *Salmonella*, *cobS*, *cbi*A, aves.

STUDY ABOUT INFECTION OF CHICKENS WITH MUTANTS OF S*almonella* Serotypes Gallinarum, Pullorum and Enteritidis Δ*cob*SΔ*cbi*A

Summary- *Salmonella enterica* serovar Typhimurium only synthesizes cobalamin (Vitamin B_{12}) during anaerobiosis. Two-percent of the *S.* Typhimurium genome is devoted to the synthesis and uptake of Vitamin B_{12} and to B_{12}-dependent reactions. In order to understand the requirement from cobalamin synthesis better, we constructed *Salmonella* serovar Gallinarum, *Salmonella* serovar Enteritidis and *Salmonella* serovar Pullorum mutants that are double-defective in cobalamin biosynthesis (Δ*cobS*Δ*cbiA*). We compared the virulence of these mutants to that of their respective wild type strains and found no impairment in *S*. Enteritidis Δ*cobS*Δ*cbiA* and *S.* Pullorum Δ*cobS*Δ*cbiA* ability to cause disease in chickens. *S.* Gallinarum Δ*cobS*Δ*cbiA* mutant showed attenuated for chickens. We then assessed B_{12} production by these mutants and their respective wild type strains, as well as *S.* Typhimurium Δ*cobS*Δ*cbiA*, and their respective wild type strain. All mutants were unable to produce detectable B_{12}. B_{12} was detectable in wild type strains, but, *S*. Gallinarum demonstrated no *in vitro* cobalamin production. In conclusion, the production of vitamin B_{12} *in vitro* differed across the *Salmonella* serotypes that were tested. Furthermore, the deletion of the *cbiA* and *cobS* genes resulted in an alteration in the relationship between the serotype Gallinarum and the birds more stronger than did to the others serotypes.

Key-words: cobalamin, mutants, *Salmonella*, *cobS*, *cbi*A, birds.

I. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da avicultura industrial, muitos patógenos ganharam importância, pois a aglomeração de animais, associado ao clima tropical, favorece a multiplicação e a disseminação de agentes infecciosos. Os países importadores estão cada vez mais exigentes impondo barreiras sanitárias cada vez mais rígidas, abrangendo desde a matéria-prima utilizada na alimentação das aves até o controle microbiológico do produto final destinado ao consumidor.

A importância das salmonelas neste cenário situa-se no fato de que, além de perdas econômicas relacionadas à criação das aves, alguns sorotipos são agentes causadores de enfermidades sistêmicas e gastroentéricas em seres humanos (WEISS *et al.,* 2002). São conhecidos em torno de 2500 sorotipos de *Salmonella*, mas apenas 10% têm sido isolados de aves.

O Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) calcula que infecções por *Salmonella* ocasionem 1,4 milhões de doentes (0,5% da população), 15000 hospitalizações e 400 mortes por ano nos EUA (VOETSCH *et al*., 2004), sendo os produtos derivados de aves as fontes mais freqüentes de *Salmonella*.

Entre 1985 e 1999, aproximadamente, 80% dos surtos de salmonelose humana nos EUA foram atribuídos a *Salmonella* Enteritidis e a principal fonte de contaminação identificada foram os ovos (PATRICK *et al*., 2004). Estima-se que 182 mil norte-americanos se contaminaram com *Salmonella* Enteritidis no ano 2000 ao ingerirem ovos e carne de frango contaminados (KIMURA *et al.,* 2004).

Salmonella Enteritidis está entre os sorovares paratíficos para aves. É inespecífica quanto ao hospedeiro e a infecção de aves não provoca, necessariamente, o aparecimento de sinais clínicos da doença, tornando necessário o constante monitoramento dos lotes. Caracteriza-se por intensa colonização intestinal e devido ao seu potencial invasivo, através da via do sistema retículo endotelial, pode alcançar outros órgãos, inclusive o ovário.

Salmonella Gallinarum é um sorotipo hospedeiro-específico de aves, altamente invasivo, que provoca uma enfermidade septicêmica, com alta mortalidade, gerando enormes prejuízos para a indústria avícola. *Salmonella* Pullorum também é hospedeiro-específica, é o agente da Pulorose, enfermidade septicêmica, que produz um quadro de diarréia branca, alta mortalidade e alta morbidade em aves jovens.

O controle de *S.* Pullorum, *S*. Gallinarum e *S*. Enteritidis nos lotes de aves é muito complexo, uma vez que essas bactérias podem atingir toda a escala de produção (aves de corte, galinhas poedeiras e aves reprodutoras). Para *S.* Gallinarum prevalece como principal via de transmissão a horizontal, para *S.* Pullorum destaca-se a transmissão vertical, enquanto que a transmissão de *S.* Enteritidis pode ser tanto vertical quanto horizontal.

Para sobreviver, as bactérias precisam se adaptar às condições disponíveis que encontram; seja no meio ambiente, seja em organismos vivos. O sistema respiratório bacteriano é modulado para alterar rapidamente o seu funcionamento, conforme as condições encontradas e a disponibilidade de substratos para a obtenção de energia. O conhecimento a respeito do processo de respiração em anaerobiose é importante no sentido de que a sobrevivência de *Salmonella* intracelular ou no trato entérico, ocorre em ambiente anaeróbico. A via alternativa de aceptores de elétrons é a principal forma de obtenção de energia para o crescimento das bactérias que se encontram em ambiente anaeróbico. Assim sendo, além dos mecanismos de patogenicidade, sua sobrevivência depende da capacidade de utilizar os substratos disponíveis para se manter viva. A elucidação do metabolismo bacteriano pode ser útil para conhecer melhor o mecanismo utilizado pela bactéria para invadir, sobreviver e se multiplicar no hospedeiro.

A cobalamina é um dos cofatores mais antigos evolutivamente e uma das maiores e estruturalmente mais complexas biomoléculas descritas. Constitui um nutriente essencial para muitos animais e deve ser obtida pela ingestão. Acredita-se que plantas e fungos não sintetizam nem utilizam cobalamina. Bactérias são os produtores primários desta biomolécula.

Virtualmente todos os isolados de *Salmonella* sintetizam vitamina B_{12} em condições anaeróbicas. A síntese *de novo* de vitamina B_{12} requer a expressão de um único *operon* de 20 genes que inclui 17 genes *cbi* e 3 genes *cob* (ROTH *et al*., 1993). A habilidade para sintetizar e importar vitamina B_{12} requer mais de 35 genes conhecidos; aproximadamente 1% do genoma de *Salmonella* e outro 1% adicional relacionado ao metabolismo dependente de vitamina B_{12} (ROTH *et al*., 1996). No entanto, mutações que eliminem a síntese de vitamina B_{12} de células selvagens não causam prejuízo ao crescimento sobre condições laboratoriais de cultivo aeróbico ou anaeróbico (Price-CARTER *et al*., 2001). A manutenção de uma fração tão significativa do genoma para biossíntese de uma molécula é resultado de um processo evolutivo de seleção. Fica claro que condições ambientais devem existir para as quais a síntese anaeróbia de vitamina B_{12} é imprescindível para o crescimento da *Salmonella,* embora ainda não esteja claro que condições seriam estas (PRICE-CARTER *et al*., 2001).

CbiA é a primeira glutamina amino-transferase na via biossintetica anaeróbica de vitamina B_{12}. O gene *cbi*A tem papel direto na repressão do operon *cob* (RICHTER-DAHLFORS *et al*., 1994). A enzima CobS está localizada na membrana celular e catalisa o penúltimo passo da produção de cobalamina (MAGGIO-HALL *et al.*, 2004). A via biossintética é completamente dependente desta enzima (MAGGIO-HALL & ESCALANTE-SEMERENA, 1999; ANDERSON *et al.*, 2007). A deleção dos genes *cob*S e *cbi*A impede a síntese de qualquer uma das formas de cobalamina (Adenosil-, Ciano-, Metil- ou Hidroxi-B_{12}) em condições anaeróbicas por mutantes de *Salmonella* (Richter-Dahlfors *et al*., 1994).

Estudos relacionados ao conhecimento fisiológico de salmonelas devem ajudar a conhecer melhor a relação parasita-hospedeiro com as aves. Embora os sorotipos de *Salmonella* Gallinarum, Pullorum e Enteritidis, tenham muitas características em comum, a relação parasita-hospedeiro com as aves difere muito entre eles.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Salmoneloses aviárias

Salmonella spp. permanece como um sério problema de saúde pública e uma das principais causas de perdas para o setor avícola. Não só pela patogenicidade, mas também pela habilidade de se adaptar a diversos hospedeiros e permanecer no meio ambiente, o que dificulta sobremaneira o controle (MACIOROWSKI *et al*., 2004).

São conhecidos mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* sp, sendo que, cerca de 80 a 90, são os mais comuns em casos de infecção de seres humanos e animais. Do ponto de vista da patogênese e biologia da infecção, o gênero *Salmonella* pode ser dividido em dois grupos. Um compreendendo a vasta maioria de sorotipos reconhecidos pela habilidade de colonizar o trato alimentar das aves ou de suínos, muitas vezes, na ausência de manifestações clinicas da doença. Estes sorotipos contaminam as carcaças durante o processamento, obtendo assim acesso à cadeia alimentar humana e podendo acarretar toxinfecções alimentares. Permanecem no segundo grupo poucos sorovares, os quais produzem doença sistêmica em um estrito número de espécies hospedeiras, que inclui *Salmonella* Typhi para o homem, *Salmonella* Choleraesius em suínos, *Salmonella* Dublin em bovinos, *Salmonella* Typhimurium em ratos e *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum em aves. A invasão se dá via sistema reticulo-endotelial (DUNLAP *et al*., 1991), a via primária de infecção é a oral-fecal, mas estes sorotipos estarão presentes no trato gastrointestinal apenas durante a fase severa da enfermidade (BARROW *et al*., 1987;1994). Assim sendo, raramente adentram a cadeia alimentar humana a partir de seus hospedeiros primários.

Salmonella enterica é a única espécie bacteriana que inclui exemplos de patotipos hospedeiro-específicos e patotipos com ampla gama de hospedeiros (THOMSON *et al*., 2008).

Nas aves, as enfermidades acarretadas por *Salmonella* se dividem em três tipos, a Pulorose causada pela *Salmonella* Pullorum, o Tifo Aviário causado pela *Salmonella* Gallinarum e o Paratifo Aviário causado por qualquer outro sorotipo, que não os anteriores.

2.1.1. *Salmonella* Pullorum

Salmonella enterica subespecie enterica sorotipo Pullorum (SP) é um patógeno que à semelhança de *Salmonella* Gallinarum é imóvel, hospedeiro-específico, adaptado ao parasitismo em aves. SP têm acarretado prejuízos para o setor avícola, por produzir doença sistêmica severa nas aves, com alta morbidade, alta mortalidade e redução na produção de ovos (Shivaprasad, 2000). A Pulorose tem sido amplamente erradicada dos plantéis avícolas de muitos países por meio, principalmente, da detecção e erradicação de lotes contaminados, por meio de testes de soro aglutinação rápido que podem ser feitos em larga escala com o sangue total, seguido de sacrifício do plantel de aves positivas. Esse programa simples e eficiente tem sido prejudicado pela inviabilização do teste sorológico em planteis reprodutores vacinados com bacterina oleosa contendo células de *S.* Enteritidis, devido à reação cruzada provocada pela vacina e pelo atual sistema de criação de aves segundo o modelo de “free range”, que vem ganhando espaço (BERCHIERI JR, *et al*., 2000; 2001a).

A Pulorose é uma enfermidade que pode acometer aves de qualquer idade, no entanto é muito mais comum em aves jovens, em especial nos primeiros vinte dias de vida. Neste período a mortalidade é alta. As aves sobreviventes, que se tornam portadoras produzem ovos contaminados, responsáveis pela manutenção do ciclo da doença (BERCHIERI JR *et al*., 2000; 2001a).

O ciclo da Pulorose deve-se primordialmente a disseminação de SP pela via vertical. Ovos contaminados pela via transovariana podem se tornar inviáveis ou produzirem pintos contaminados, os quais poderão contaminar outras aves nos primeiros dias após o nascimento. Uma porcentagem de aves que sobrevivem à doença clinica após serem infectadas nos primeiros dias de vida, demonstram poucos

sinais da infecção, mas se tornam portadoras por toda a vida (SNOEYENBOYOS, 1991; BERCHIERI JR *et al*., 2001a).

2.1.2. *Salmonella* Gallinarum

O Tifo Aviário, causado pela *Salmonella enterica subespecie enterica* sorotipo Gallinarum (SG), está sobre controle em países com produção avícola industrial, que adotam o sistema de criação em confinamento e realizam boas práticas de manejo e sanidade. Contudo, o Tifo Aviário permanece sendo um grande problema em países que têm intensificado sua produção avícola recentemente e/ou países tropicais, os quais apresentam dificuldade na aplicação de práticas adequadas de manejo e sanidade (LEE *et al*., 2003).

SG é altamente patogênica, acarreta infecção sistêmica e acomete de forma severa aves de qualquer idade, provocando mortalidade de 80 a 100%. Estudos a respeito da epidemiologia da SG consideram que a principal via de transmissão seja a horizontal, sendo os relatos de transmissão vertical escassos e antigos (BEAUDETTE, 1925, 1930; BEACH &DAVIS, 1927). A pesar de haverem relatos da presença de SG em ovos, evidências da contaminação da progênie não são evidentes (BERCHIERI JR., 2000).

No Brasil onde a produção avícola está entre as melhores e maiores do mundo, o clima tropical e o sistema de galpões abertos, favorecem a entrada do patógeno. De acordo com dados do Instituto Adolfo Lutz entre os anos de 1991 e 1995, foram identificadas 372 amostras de *Salmonella* procedentes de criações avícolas, das quais 21 correspondiam a SP e 35 a SG (TAVECHIO *et al*., 1996).

As alterações mais comuns, observadas no tifo aviário são congestão e aumento do fígado e do baço, septicemia e anemia. Na fase crônica o fígado pode apresentar coloração bronzeada com necrose focal e o coração lesões granulomatosas e inflamatórias (WHITEMAN & BICKFORD, 1998; CALNEK *et al*., 1997). A SG está primariamente associada aos fagócitos mononucleares, residindo primariamente em macrófagos de fígado e baço. A presença gastrointestinal se dá no início da infecção

como resultado da rota oral-fecal de transmissão e no final, quando as aves estão indo a óbito, apresentando hemorragia da parede intestinal (BARROW *et al*, 1994; WIGLEY *et al*, 2002).

As mais efetivas medidas de controle combinam manejo adequado e erradicação de lotes infectados (CALNEK *et al*., 1997). Para a prevenção, vacinas vivas e inativadas utilizando a cepa SG9R têm sido empregadas (GORDON *et al*., 1959). Esta cepa é rugosa e não contem os antígenos somáticos característicos de cepas de SG típicas (SMITH, 1956). Devido à perda de parte da composição dos lipopolissacarideos (LPS), ocorre redução de virulência da cepa (FEBERWEE *et al*., 2001 a,b). Vacinas inativadas apresentam sucesso variável, uma vez que a imunidade para *Salmonella* Gallinarum não é dependente apenas da resposta humoral, mas principalmente da resposta mediada por células.

O controle da infecção sistêmica depende muito da imunidade mediada por células. A eliminação da bactéria de fígado e baço coincide com alta proliferação de células T, alta atividade e expressão de T "helper"-1 (o qual eleva a resposta mediada por células) e interferon γ. Interleucinas 12 e 18 e fator de necrose tumoral também são importantes no combate à infecção sistêmica, pela ativação de macrófagos e células natural "Killer" (BEAL, 2004; WIGLEY *et al*, 2005).

Diferentemente da SP, a infecção por SG ou leva a ave a morte ou a contornar a infecção, eliminando a bactéria e não desenvolvendo assim o estado portador.

2.1.3. *Salmonella* Enteritidis

Salmonella spp tem sido o mais comum agente de infecções entéricas humanas e tem sido a principal causa de mortes entre os patógenos de intoxicações alimentares. Nos Estados Unidos *Salmonella* spp. tem um impacto econômico, estimado, de US$ 0,5 a 2,3 bilhões de dólares anuais relacionados a mortes, perdas em produtividade de pessoas enfermas, gastos com medicamentos, hospitalizações e diagnóstico laboratorial (KENNEDY *et al*., 2004). Na década de 1980, *Salmonella enterica subespecie enterica* sorotipo Enteritidis (SE) passou a ser o agente mais comum de

surtos de intoxicações alimentares em seres humanos na America do Norte e Europa (COLLARD *et al*., 2008).

A prevalência da SE no período de 1979-1987 aumentou 69% nas notificações de salmoneloses humanas em países da Europa, America do Norte, Sul e África, com um aumento de 100% na Argentina (VOETSCH *et al*., 2004). Medidas de monitoramento e controle foram introduzidas em muitos países da Europa, no entanto, a contaminação de aves permanece alta em muitos países. Na Europa Oriental, encontram-se lotes de poedeiras comerciais com taxas de 5 a 10% de contaminação, produzindo ovos com nível de contaminação entre 3 a 8%, enquanto que a média no restante da Europa é menor que 1%. Dados da União Européia apontam que 57,7% dos sorotipos de *Salmonella* isolados de lotes de aves, correspondem a SE, 9,6% *S.* Typhimurium e 6,9% *S.* Infantis. Quanto a ovos, SE é o sorotipo predominante com 72,9% dos isolamentos (TRENDS AND SOURCES OF ZOONOTIC AGENTS IN THE EUROPEAN UNION AND NORWAY, 2002).

SE é um sorotipo móvel, capaz de infectar diversos hospedeiros incluindo mamíferos e aves e persistir no ambiente por tempo indeterminado.

Nas aves é capaz de provocar infecção sistêmica, envolvendo o sistema reticulo-endotelial e de extensa colonização intestinal, conseqüentemente é capaz de se espalhar por toda a cadeia alimentar através de ovos e carne de aves contaminadas. A transmissão se dá tanto pela via vertical por contaminação transovariana, ou durante a passagem do ovo pela cloaca; quanto pela via horizontal. Aves adultas são relativamente resistentes a infecção sistêmica por SE, porem, sofrem extensa colonização intestinal na ausência de sintomatologia clinica, podendo eliminar o patógeno intermitentemente (GAST & HOLT, 1998; GAMA *et al*., 2003). A doença clinica pode ser observada em pintainhos infetados logo após o nascimento (BARROW, 2000).

A infecção por SE induz à produção de anticorpos específicos, por longos períodos, como conseqüência da prolongada persistência da SE no trato gastrointestinal, fenômeno este, ausente na infecção por SG (BARROW, 1991).

Para prevenir a infecção de aves por SE, visando minimizar a infecção humana, diversas estratégias precisam ser adotadas simultaneamente, em face da complexidade do controle deste patógeno. As medidas de controle devem abranger rigoroso programa de higiene e desinfecção, controle de roedores, manejo integrado de insetos, administração de probióticos e/ou prebióticos, exclusão competitiva e vacinação (HENZLER & OPITZ, 1992; CORRIER *et al*, 1991; DAVIES & WRAY, 1995; FUKATA *et al*, 1999).

No Reino Unido, a diminuição no número de casos humanos de intoxicações alimentares foi associada à introdução de vacinas inativadas para SE em poedeiras (COGAN & HUMPREY, 2003).

A vacinação contra sorotipos de *Salmonella* hospedeiro-específicos induz forte imunidade e proteção contra a infecção e manifestações clínicas da doença (BARROW & WALLIS, 2000). Entretanto, quando se trata de programas de vacinação para prevenir a infecção de aves contra sorotipos de *Salmonella* que acometem diversos hospedeiros, os resultados são variáveis (BARROW 2007).

Bacterinas têm sido muito empregadas no controle da infecção de aves por sorotipos de *Salmonella* que não apresentam hospedeiro específico. Estas vacinas se constituem de organismos inativados suspensos em substância adjuvante, para aumentar a imuno-estimulação (BARROW 2007). Bacterinas contendo células de SE são consideradas seguras, estimulam a produção de anticorpos circulantes em níveis elevados, imunidade humoral de longa duração e são permitidas em muitos países. As inconveniências do seu uso situam-se no fato de serem de administração individual laboriosa, de o adjuvante mais o lipopolissacarídeo da vacina poder causar reação indesejável nas aves e, principalmente, na incapacidade de promover resposta imune celular.

São controversos os estudos sobre utilização de vacinas inativadas. Alguns têm atestado a eficiência das bacterinas para diminuir a excreção fecal e contaminação de ovos por SE (GAST *et al*., 1993; LIU *et al*., 2001; WOODWARD *et al*., 2002). Outros pesquisadores não são favoráveis ao uso, pois ressalvam que vacinas inativadas são rapidamente destruídas e eliminadas do hospedeiro, sendo pobremente imunogênicas

e não hábeis para induzir resposta mediada por células T citotóxicas (NAGAJARA & RAJASHEKARA, 1999; BARROW, 2007).

2.1.4. Fisiologia bacteriana da infecção

Para sobreviver, invadir, multiplicar e persistir no hospedeiro os microrganismos devem coordenar a expressão de genes em resposta a variadas condições ambientais durante o processo de infecção. Pouco é conhecido sobre os fatores genéticos requeridos por *Salmonella* spp. para infectar e persistir em aves (HUANG *et al*., 2007). Foi demonstrado que a regulação dos genes de invasão requer uma resposta coordenada de vários sinais ambientais. Baixa tensão de oxigênio e alta osmolaridade, por exemplo, ativam os genes da Ilha de Patogenicidade-1 (BAJAJ *et al*., 1996).

Sabe-se que componentes da cadeia de transporte de elétron, usando oxigênio como aceptor de elétron, são necessários para o crescimento bacteriano na fase estacionária (ZHANG-BARBER *et al*., 1997) e para virulência (Van Immerseel *et al*, 2004). No entanto, foi observado que mutantes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (STM), contendo alterações em genes que expressam componentes da cadeia aeróbica (*nuo*, *cyd, cyo*) colonizaram o trato digestivo tão eficientemente quanto a cepa original (TURNER *et al*., 2003). Diante dessas circunstâncias, considera-se que o metabolismo energético seja fermentativo ou que a respiração utilize uma via alternativa de aceptores de elétron.

Faz parte da habilidade, para superar as adversidades ambientais, a alteração da composição do sistema respiratório. O conhecimento do processo de respiração em anaerobiose, suas enzimas, substratos e cofatores são importantes no sentido de que a sobrevivência de S*almonella* spp. intracelular ou no trato entérico, ocorre em ambiente anaeróbico.

Estudos relacionados à fisiologia, comportamento patogênico e metabolismo intracelular anaeróbico de *Salmonella* spp. ajudam a conhecer melhor a relação parasita-hospedeiro com as aves. Embora SG, SP e SE sejam bioquímica, antigênica (grupo D: antígenos somáticos 1, 9 e 12) e genotipicamente muito semelhantes, pois são monofiléticos (descendem de um ancestral comum) (KWON *et al*., 2000), a relação

parasita-hospedeiro com as aves difere muito entre eles (BERCHIERI JR *et al*., 2001a,b).

2.2. Vitamina B_{12}

2.2.1. Histórico

Considerada a mais fascinante, atraente e complexa molécula do mundo da ciência, a vitamina B_{12} (cobalamina) foi descoberta no início da década 1920 por MINOT & MURPHY como fator anti-anemia perniciosa (STUBBE, 1994; MARTENS *et al*., 2002). A partir de então, os estudos envolvendo a cobalamina renderam uma série de Prêmios Nobel, sendo mais importante o conquistado por MINOT, MURPHY e WHIPPLE em 1934, por demonstrarem que a inclusão de fígado na dieta poderia curar pacientes com anemia perniciosa. A anemia perniciosa foi descrita pela primeira vez em 1835, sendo associada à deficiência na absorção de vitamina B_{12}, o que leva a produção de eritrócitos defeituosos e presença de megaloblastos na medula. Em 1948 duas companhias farmacêuticas, nos Estados Unidos e no Reino Unido isolaram quase que, simultaneamente, uma estrutura cristalina vermelha de fígados utilizados para curar a anemia perniciosa, a qual foi designada vitamina B_{12} (RICKES *et al*., 1948a). Em seguida, também foi isolada de leite em pó, extrato de carne e caldos para cultivo de vários gêneros de bactérias (RICKES *et al*., 1948b).

O isolamento da vitamina B_{12} estimulou pesquisas a respeito da estrutura da molécula. BARKER *et al* (1958) descobriram e cristalizaram as primeiras formas biologicamente ativas: pseudo-vitamina B_{12} e vitamina B_{12}. Posteriormente, a estrutura tri-dimensional da vitamina B_{12} (cianocobalamina) foi deduzida e cinco anos mais tarde a estrutura 3D da coenzima B_{12} (adenosilcobalamina) foi elucidada (HODGKIN *et al*. 1955, 1956, 1957; LENHERT & HODGKIN, 1961). SMITH *et al*. (1962) descobriram a segunda forma biologicamente ativa da vitamina B_{12}, a Metilcobalamina (MeCbl). GUEST *et al*. (1962) demonstraram que a vitamina B_{12} poderia atuar como cofator da enzima metionina sintase, dando suporte para que muitas enzimas dependentes de adenosilcobalamina e MeCbl pudessem ser identificadas (DRENNAN *et al*., 1994; DIXON *et al*., 1996; MANCIA *et al*., 1996).

Cobalamina é o nome genérico da vitamina B_{12}, atribuído a ela por conter o metal pesado cobalto, o qual garante solubilidade em água e coloração vermelha. A complexidade da estrutura da molécula se equivale à complexidade das reações metabólicas que ela media. A biossíntese deste nutriente essencial, também é complexa e está confinada a apenas alguns organismos procariotas, não sendo até então identificada em eucariotas. A síntese química da molécula foi conseguida por Woodward e Eschenmoser entre as décadas de 1960 e 1970, com a participação de mais de 100 cientistas em pesquisas que se estenderam por 11 anos. A síntese química foi acompanhada pela elucidação da via biossintética aeróbica da cobalamina em *Pseudomonas denitrificans* em 1993 em um projeto denominado "O Everest da Cobalamina" (BATTERSBY, 1994; BLANCHE *et al*., 1995; SCOTT 1998; THIBAUT *et al*., 1998). Acreditava-se naquele momento, na existência de uma via biossintética anaeróbica, mas esta permaneceu pobremente compreendida. A rota anaeróbica desconhecida para síntese de *corrin,* mas que existe na natureza há 4 bilhões de anos, foi elucidada em 1996 (SCOTT *et al*., 1996). Hoje a produção industrial de cobalamina se dá exclusivamente por processo biossintético fermentativo, utilizando microrganismos selecionados e otimizados por engenharia genética como cepas de *Pseudomonas denitrificans.*

2.2.2. Estrutura

Vitamina B_{12} é o nome utilizado para descrever compostos que contem cobalto e pertencentes à família dos corrinóides, em particular, aqueles do grupo das cobalaminas. O produto final da síntese natural é o 5'-deoxi-adenosil cobalamina (coenzima B_{12} ou AdoCbl) e Metilcobalamina (MetCbl), enquanto que a vitamina B_{12} é por definição, cianocobalamina (CNCbl), a qual representa a forma manufaturada pela indústria e não a encontrada na natureza. O grupo CN é resultante de adição química durante processo de extração pelo qual a cobalamina é removida da cultura bacteriana.

A coenzima B_{12} tem massa molecular de 158 KDa. A molécula é dividida em três partes: um anel central de *corrin* o qual contém quatro ligantes para o íon cobalto, um ligante inferior (alfa) chamado DMB e um superior (beta) correspondente a um grupo

adenosil ou metil. Em muitas bactérias anaeróbicas o ligante alfa pode ser substituído por adenina, por diferentes bases ou estar ausente formando a pseudo-coenzima B_{12} (Figura 1).

As formas MeCbl e 5' deoxi-adenosil-cobalamina são conhecidas pela sensibilidade a luz, sendo facilmente convertidas à hidroxicobalamina (HOCbl), em temperatura ambiente e em solução aquosa (SPALLA *et al*., 1989). A forma mais estável, CNCbl, é gerada na presença de cianeto. Estes corrinóides parecem ser isofuncionais. Uma vez que haja fotólise, quebra da ligação superior (adenosil ou metil), *Salmonella enterica* é hábil para promover adenosilação ou metilação interna, assim como converter a forma comercial CNCbl nas formas biológicas ativas (BARBIOR *et al*., 1966) .

O componente central da vitamina B_{12} é o anel de *corrin*, composto planar, com quatro unidades pirróis, da mesma família das porfirinas, nicotinas, clorinas, grupos heme e clorofilas.

A ligação carbono-cobalto foi a primeira ligação carbono metal descrita em moléculas biológicas; essa ligação é fraca, facilmente rompível (FINKE, 1998).

2.2.3. Classificação das reações dependentes de vitamina B_{12}

Duas formas de vitamina B_{12} contribuem para atividades catalíticas nos seres vivos: Adenosilcobalamina (AdoCbl) e Metilcobalamina (MeCbl). As enzimas dependentes de B_{12} se distribuem em três classes de reações:

i. Isomerases dependentes de B_{12}: empregam AdoCbl (coenzima B_{12}) como cofator. Nessas reações, a fraca ligação cobalto-carbono é explorada através da clivagem homolítica gerando um radical que é usado para promover uma série de rearranjos associados aos processos anaeróbios fermentativos de 1,2-propanediol, etanolamina, glicerol e aminoácidos como lisina, leucina, glutamato e ornitina (ROTH *et al*., 1996; OBRADORS *et al*., 1998). Nesta classe incluem-se ainda as reações com metilmalonil-CoA mutase e ribonucleotídeo redutases dependentes de B_{12}.

ii. Metiltransferases dependentes de B_{12}: compreendem metionina sintases que catalisam a síntese de metionina e metiltransferases envolvidas na produção de

metano em bactérias metanogênicas e acetato em bactérias acetogênicas, ambas anaeróbias estritas. Na metanogênese metil corrinóides são requeridos para a transferência de grupos metil a partir de vários substratos como metanol (KELTJENS & VOGELS, 1993) e acetato (FERRY, 1992), processo altamente exergônico que gera grande força proton-motora. Na acetogênese a formação do acetato se dá a partir de CO_2 e depende de metil corrinóides.

iii. Dehalogenases redutoras dependentes de B_{12}: enzimas com mecanismo de catalise distinto das anteriores, no entanto, o papel da B_{12} nas reações de dehalogenação ainda não foi elucidado (BANERJEE & RAGSDALE 2003).

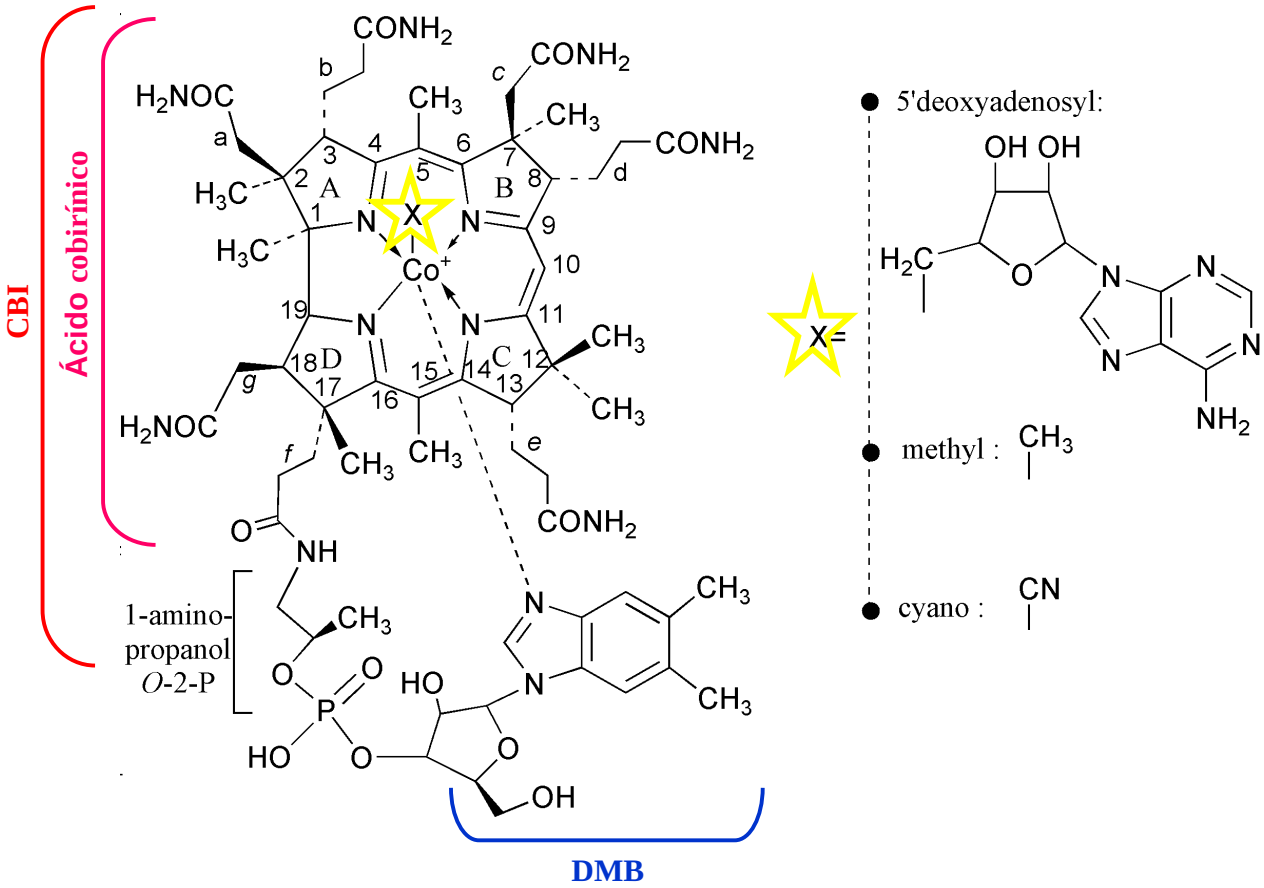

Figura 1. Estrutura de uma molécula do grupo das cobalaminas, evidenciando as três porções; DMB: dimetilbenzimidazole; CBI: cobinamide; radical X, a variação deste ligante caracteriza a forma de cobalamina (MARTENS *et al*., 2002).

2.2.4. Biossíntese e utilização de vitamina B_{12}

É exclusiva à vitamina B_{12}, em relação às outras vitaminas, a característica de ser sintetizada *de novo* apenas por um restrito número de representantes *Archaea* e *Bacteria.* Projetos de seqüenciamento de genomas têm revelado que genes envolvidos na biossíntese de cobalamina foram encontrados em 1/3 das bactérias seqüenciadas até o momento.

Animais e protistas requerem cobalamina, mas aparentemente não a sintetizam. A vitamina B_{12} é um fator de crescimento essencial para os animais e tem papel no metabolismo das células, em especial às do trato gastrointestinal, medula óssea e tecido nervoso (JAMES *et al*., 1995). Em seres humanos a vitamina B_{12} é requerida em quantidade diminuta, algo em torno de 1 a 2µg/dia, sendo obtida por alimentos de origem animal e assiste à ação de apenas duas enzimas: metionina sintase e (R)-metilmalonil-CoA mutase envolvida no catabolismo de ácidos graxo.

Plantas e fungos parecem não sintetizar e tampouco requerer esta vitamina, por utilizarem para síntese de metionina, a forma da enzima metionina sintase MetE, a qual não requer vitamina B_{12} como cofator (DUDA *et al*., 1967). Alguns relatos de produção de vitamina B_{12} por fungos e leveduras são encontrados (WATANABE *et al*., 1991, 1993), entretanto, consideram que a produção de vitamina B_{12} estaria associada à contaminação bacteriana (MARTENS *et al*., 2002). Algas como todos os eucariotos não sintetizam vitamina B_{12} *de novo*, no entanto, correspondem a uma das principais fontes desta vitamina. É sabido que metade das espécies de algas requerem vitamina B_{12} de fontes externas como cofator da enzima MetH, a metionina sintase dependente de vitamina B_{12}; a outra metade utiliza a enzima MetE para a síntese de metionina (CROFT *et al*., 2005). É interessante que os níveis de cobalamina livre no meio ambiente não são capazes de suportar o crescimento das algas e há evidências de que bactérias vivam em simbiose com essas algas fornecendo vitaminas em troca de carbono fixado. Estas observações levam a crer que não tem havido pressão seletiva para manutenção de MetE em populações de algas.

Acredita-se que a capacidade de biossíntese de vitamina B_{12} entre os seres vivos é resultante de um processo de pressão evolutiva. Durante o curso da evolução animal a habilidade para biossíntese de vitaminas foi perdida, dando lugar a um elaborado mecanismo de percepção e absorção. Procariotos, em especial as enterobactérias, são os únicos supridores de cobalamina na cadeia alimentar. Dentre os animais, apenas os ruminantes são hábeis para absorver a vitamina B_{12} produzida por sua microbiota entérica, os demais devem obtê-la através da dieta.

2.2.5. Origem da vitamina B_{12}

Alguns autores têm sugerido que a vitamina B_{12} foi sintetizada em um momento anterior ao aparecimento da vida ("pré-bioticamente") (BENNER *et al*., 1989; ROTH *et al*., 1996) e poderia ser importante para catálise em um "mundo de RNA" primitivo. Esta teoria é suportada pelo fato de que em muitas bactérias, a síntese de vitamina B_{12} ainda começa com uma molécula de aminoacil-RNAt, além disso, o fato de moléculas de RNA exercerem íntimo papel na regulação dos genes de biossíntese e absorção de vitamina B_{12} em bactérias modernas reforça esta teoria. Por essa teoria a vitamina B_{12} teria sido sintetizada por reações não enzimáticas energeticamente favoráveis (HODGSON & PONNAMPERUMA, 1968; ESCHENMOSER, 1988). De acordo com ROTH *et al*. (1996), a função ancestral da vitamina B_{12}, que foi mantida em algumas bactérias modernas, poderia ser a de suportar a fermentação de pequenas moléculas para gerar um composto oxidável e um gradiente de elétrons usado para balanço redox das reações, na ausência de um aceptor de elétrons exógeno. Em um ambiente biótico prematuro, o surgimento do processo fermentativo teve importância central para a produção de energia. Outras formas de produção anaeróbica de energia, tais como metanogênese e fermentação de vários aminoácidos, também requerem vitamina B_{12}. Acredita-se que a vitamina B_{12} esteja ligada aos processos metabólicos anaeróbicos clássicos (ROTH *et al*., 1996).

A sua biossíntese fornece ainda evidências para uma função ancestral de tetrapirróis. A rota inicial de biossíntese, a partir do ácido 5-aminolevulinico, é idêntica para clorofila, heme, siroheme e vitamina B_{12}, até a formação do primeiro tetrapirrol

macrocíclico, o uroporfirogênio III (RAUX *et al*., 1999). Isto pode sugerir a possibilidade de que a via biossintética total foi inicialmente "inventada" para a síntese de B_{12} e os ramos para síntese de clorofila e grupos heme foram adicionados mais tarde (ROTH *et al*., 1996). Recentemente, essa teoria pode ser confirmada, a via biossintética ancestral de grupos heme postulada como originária de um dos ramos da via biossintética de vitamina B_{12}, ramo dos tetrapirróis, permaneceu em *Desulfovibrio vulgaris* até os dias atuais e pode ser descrita (ISHIDA *et al*. 1998).

Em resumo, estas observações sugerem que a vitamina B_{12} emergiu em um "mundo de RNA" primitivo (Benner *et al*., 1989) selecionada inicialmente, pela habilidade de suportar a fermentação de pequenas moléculas. Posteriormente, o desenvolvimento de siroheme permitiu o uso de íons inorgânicos simples como aceptores de elétrons, o que mais tarde daria origem a nitrito e sulfito redutases. Finalmente, o estabelecimento da clorofila e a biossíntese de grupos heme permitiram a produção e utilização do oxigênio molecular atmosférico, respectivamente (ROTH *et al*., 1996). Como os níveis de oxigênio atmosférico aumentaram, a dependência metabólica da cobalamina diminuiu. No entanto, funções secundárias para a vitamina B_{12} foram desenvolvidas, tais como transferência de grupos metil ou redução de nucleotídeos. O original e principal papel de fermentação anaeróbica da cobalamina ficou restrito a determinados nichos ecológicos. Fotossíntese e respiração de oxigênio permitiram o desenvolvimento de plantas e animais os quais não sintetizam vitamina B_{12}. Mas, permaneceu o requerimento desta, para funções secundárias, não mais relacionadas à fermentação em animais e humanos, como o caso da enzima metionina sintase importante primariamente para reciclagem de folato e secundariamente para produção de metionina (ALLEN *et al*., 1993) e (R)-metilmalonil-Coa mutase cuja função principal é remover produtos tóxicos da quebra de lipídios (LEDLEY, 1990).

2.2.6. Reações dependentes de B_{12} em *Salmonella* Typhimurium

i. Metionina sintase

Metionina (Met) é um aminoácido essencial requerido não só para síntese de proteínas, mas principalmente, para a formação de adenosilmetionina (AdoMet), um

doador universal de elétrons e elemento chave do ciclo de metilação (HANSON & ROJE, 2001; RAVANEL *et al*., 2004). Cerca de 80% da Met livre nas células, é destinada a este ciclo, cuja função é suprir de AdoMet as dezenas de metiltransferases presentes em todas as células e que por sua vez, realizam a transferência de grupos metil da AdoMet para uma série de substratos para a síntese de numerosos compostos, tais como, lipídios e vitaminas (RAVANEL *et al*., 2004). Outras funções das metiltransferases são a regulação da expressão gênica, a metilação do DNA e regulação e reparo de proteínas (SURTEES *et al*., 1991; TOLSTYKH *et al*., 2000).

Em enterobactérias há dois tipos de metionina sintase, cuja atividade depende da presença de cobalamina como cofator. A forma independente de cobalamina corresponde a da enzima MetE e a forma dependente de cobalamina e folato é a da enzima MetH (CROFT *et al*., 2005). MetH catalisa a transferência de um grupo metil a partir do metil-tetra-hidrofolato para a homocisteína (PEJCHAL & LUDWIG 2005). Praticamente a mesma reação é catalisada por MetE, e ambas as enzimas enfrentam o mesmo desafio, a transferência energeticamente desfavorável do grupamento metil. A diferença entre as enzimas está no fato de que MetE faz a transferência do grupo metil diretamente, ao passo que, MetH utiliza a cobalamina como receptor intermediário do grupo metil. O emprego da cobalamina parece tornar a reação mais favorável (GONZALEZ *et al*., 1992). Esta teoria baseia-se na observação de que em *E. coli*, na ausência de cobalamina, a enzima MetE atinge níveis de 3% do total de proteínas celulares (GONZALEZ *et al*., 1992). *S.*Typhimurium induz preferencialmente a expressão de *met*H, expressando *met*E apenas quando vitamina B_{12} está indisponível (WU *et al*., 1992).

ii. Epoxyqueosine redutase

Esta enzima catalisa o último passo na formação da base hipermodificada de RNAt, queosine, encontrado em $RNAt^{tyr}$, $RNAt^{his}$, $RNAt^{asn}$, $RNAt^{asp}$ (FREY *et al*., 1988). Esta base modificada não é essencial para o crescimento bacteriano em condições de laboratório (NOGUCHI *et al*., 1992). No entanto, a reação final de síntese de queosine requer B_{12} (FREY *et al*., 1988). *E. coli* a qual não produz vitamina B_{12} também sintetiza queosine anaerobicamente. ROTH *et al*. (1996) acreditam que a síntese da base pode

ser estimulada por vitamina B_{12} indiretamente *in vivo*, mas pode ser catalisada sem o cofator.

iii. Etanolamina amônia liase

A utilização de etanolamina como fonte única de carbono e energia requer B_{12} para ambas as funções: indutor da via catabólica e cofator da enzima etanolamina amônia liase (ROOF & ROTH 1988, 1989). Etanolamina amônia liase é a primeira enzima da via que converte etanolamina a acetaldeído e amônia; acetaldeído serve como fonte de carbono e energia ao ser convertido em acetil-coA e a amônia serve como fonte de nitrogênio (ROTH *et al*., 1996). A etanolamina é facilmente encontrada na natureza, pois está presente nos fosfolipídios das membranas celulares a fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (SCARLETT & TURNER, 1976). O operon *eut* de *Salmonella enterica* codifica enzimas para o uso de etanolamina. Apenas quatro dos 17 genes do *operon eut* têm correlação com a atividade enzimática necessária para a utilização de etanolamina (BRINSMADE & ESCALANTE-SEMERENA, 2004). O quinto gene do *operon* codifica uma proteína regulatória (EutR) que ativa a expressão de todo o *operon eut* em resposta a presença simultânea de etanolamina e AdoCbl (ROOF & ROTH, 1992). Sobre condições aeróbicas, *Salmonella enterica* pode crescer em etanolamina, apenas se o ambiente fornecer adenosilcobalamina ou um precursor viável, uma vez que a síntese *de novo* de AdoCbl por *Salmonella enterica* só se dá em anaerobiose. Um sexto gene do *operon eut* codifica uma adenosil-transferase (EutT) que promove adenosilação: do precursor de AdoCbl o cobinamide; das formas biológicas ativas AdoCbl e MetCbl que sofreram fotolise (quebra da ligação do carbono central com o alfa ligante, adenosil ou metil, pela luz) e se inativarem; ou CNCbl a forma comercial da vitamina B_{12}, que se suprida no meio, necessita ser convertida na forma biológica ativa AdoCbl. EutT atua ainda como um regulador do circuito catalítico ao regular os níveis do indutor do *operon* a Adenosilcobalamina (SHEPPARD *et al*., 2004).

O crescimento anaeróbico de STM em etanolamina utilizando B_{12} sintetizado endogenamente só é possível se tetrationato estiver disponível no meio como aceptor final de elétrons (PRICE-CARTER *et al*., 2001).

iv. Propanediol desidratase

Salmonella enterica utiliza 1,2 propanediol (1,2-Pd) como fonte de carbono e energia por uma via que requer coenzima B_{12} (JETER, 1990). 1,2-Pd é o principal produto da fermentação de duas metilpentoses muito comuns: rhamnose e fucose, importantes fontes de carbono, disponíveis em ambientes anaeróbicos tais como o trato intestinal de animais. Rhamnose e fucose são encontradas em glicoconjugados das células epiteliais intestinais e na parede de células vegetais (OBRADORS *et al.,* 1988; BRY *et al*., 1996).

Em teoria, todos os isolados naturais de *Salmonella* degradam 1,2-Pd. Estudos *in vivo* utilizando camundongos sugerem que a degradação desses açúcares pode ser importante para a interação de *S. enterica* com o organismo hospedeiro (CONNER *et al*., 1998; HEITHOFF *et al*., 1999).

A via de degradação começa com a conversão de 1,2-Pd a propionaldeído pela enzima dependente de vitamina B_{12}, propanediol-desidratase (BOBIK *et al*., 1997). Subseqüentemente, propionaldeído é convertido em propanol e propionato. Estes passos geram um ATP por fosforilação ao nível do substrato, um gradiente de elétrons (1-propanol) para regeneração de NAD e um intermediário (propionil-CoA) que pode servir como fonte de carbono e energia pela via do metil-citrato (HORSWILL & ESCALANTE-SEMERENA, 1997). A via de degradação de 1,2-Pd parece um tanto simples, mas o catabolismo de pequenas moléculas é de fato um processo muito elaborado (HAVEMANN & BOBIK, 2003).

Estudos recentes têm mostrado que *Salmonella enterica* forma organelas poliedrais envolvidas na degradação, dependente de vitamina B_{12}, de 1,2-Pd (SAMPSON, 2004). Estas organelas poliédricas têm de 100 a 150nm de diâmetro e consiste de um centro protéico circundado por uma concha, composta ao menos de 15 diferentes polipeptídios, incluindo quatro enzimas essenciais para degradação de 1,2-Pd, constituindo assim, de um dos mais elaborados complexos multi-proteícos encontrados nos procariotas (HAVEMANN & BOBIK, 2003; SAMPSON, 2004). O entendimento que se tem dessas estruturas incomuns é limitado. Estudos conduzidos até o momento sugerem que o papel delas é abrandar a toxicidade do propionaldeído, um intermediário obrigatório da via catabólica de 1,2-Pd, através do controle da

disponibilidade de vitamina B_{12} (HAVEMANN *et al*., 2002; HAVEMANN & BOBIK, 2003; LEAL *et al*., 2003).

Em *S. enterica* os genes requeridos para degradação de 1,2-Pd consistem de 21 genes do locus *pdu* que é adjacente ao operon *cob* mas transcrito divergentemente (JETER 1990; CHEN *et al*., 1995). A degradação de 1,2-Pd é dependente de seis dos 21 genes do operon (*pdu*CDEPQW) (LEAL *et al*., 2003). Sete genes são requeridos para formação do corpo poliedral (*pdu*ABJKNTU) (BOBIK *et al*., 1999). Sob condições anaeróbicas *S. enterica* pode sintetizar AdoCbl, necessário para degradação *de novo* de 1,2-Pd; no entanto, na presença de oxigênio, precursores exógenos são requeridos (JETER *et al*., 1984). O gene *pdu*O codifica uma cobalamina-adenosiltransferase e o gene *pdu*S codifica uma cobalamina redutase. Ambas as enzimas atuam na conversão de precursores (HOCbl e CNCbl) em AdoCbl (JOHNSON *et al*., 2001; SAMPSON *et al*., 2005). A função dos outros quatro genes ainda não foi esclarecida (*pdu*LMVX) (BOBIK *et al*., 1999).

2.2.7. Análise genética da síntese de vitamina B_{12} em STM

A síntese *de novo* de AdoCbl em *Salmonella enterica* ocorre apenas em anóxia, mas a utilização de AdoCbl exógeno ou precursores complexos ocorre aeróbica ou anaerobicamente. A utilização de precursores corrinóides requer a adição apropriada do ligante superior ao átomo central de cobalto do anel de *corrin*, o que requer numerosos passos enzimáticos (VITOLS *et al*., 1965; HUNNEKENS *et al*., 1982).

S. Typhimurium possui genes para síntese e transporte de cobalamina. A maioria dos genes para a biossíntese estão localizados em um *operon* simples de 20 genes (ROTH *et al*., 1993). Mutações podesem ser atribuídas a qualquer uma das três porções da via anaeróbica de biossíntese de $B_{12,}$ designadas I, II e III (Figura 2) (ROTH *et al*., 1996). Mutantes na porção I da via podem sintetizar vitamina B_{12} se cobinamide (Cbi) for suprido (ROTH *et al*., 1996). Mutantes na porção II podem sintetizar vitamina B_{12} se dimetilbenzimadozole (Dmb) for provido (TRZEBIATOWSKI *et al*., 1994; CHEN *et al*., 1995). Mutantes na porção III perdem a capacidade de ligar Cbi e Dmb e não

conseguem sintetizar vitamina B_{12}, mesmo se ambos os precursores forem providos (ESCALANTE-SEMERENA *et al*., 1992; O'TOOLE *et al*., 1993).

Mutações na porção I da via afetam um dos 17 genes denominados *cbi* (designados de A até P). Ácido cobirínico a,c-diamide sintetase (CbiA) de STM é a primeira glutamina amino-transferase da via biossintética aneróbica de vitamina B_{12} e catalisa a síntese ATP dependente de ácido a,c diamide, a partir de ácido cobirínico, usando glutamina ou amônia como fonte de nitrogênio (FRESQUET *et al*., 2004). CbiA catalisa a hidrólise de glutamina na ausência de qualquer outro substrato. A enzima CbiA é organizada em dois domínios, glutaminase e sintetase. Cada um deles contém um sítio ativo independente para hidrólise de glutamina e síntese do corrinóide amidado, respectivamente (FRESQUET *et al*., 2004). A enzima equivalente a CbiA da via aeróbica é CobB.

Mutações na porção III afetam dois genes: *cob*U e *cob*S. O último passo da síntese de adenosilcobinamide é catalisado por uma enzima cobalamina sintase codificada pelo gene *cob*S em *Salmonella* (MAGGIO-HALL *et al*., 2004). Esta enzima é uma proteína integral localizada na membrana interna da bactéria e considerada essencial para a síntese de vitamina B_{12} (MAGGIO-HALL *et al*., 2004). A ligação do Ado-Cbi ao nucleosídeo Dmb é realizada em dois passos catalizados por *cob*V em *P.* denitrificans (síntese aeróbia) ou *cob*S em *S*. Typhimurium (MAGGIO-HALL & ESCALANTE-SEMERENA, 1999).

Mutações no ultimo gene do operon (*cob*T) geram defeito na porção II da via (TRZEBIATOWSKI *et al*., 1994; CHEN *et al*., 1995). A proteína CobT parece ter múltiplas atividades e atuar nas porções II e III da via (ROTH *et al*., 1996).

Outra mutações (*cob*A, *cob*B, *cob*C, *cob*D e *cys*G) foram localizadas, no entanto, fora do *operon* principal. Estes genes parecem não contribuir para a biossíntese, mas para a assimilação de precursores exógenos ou ainda desenvolver um papel secundário em algum processo diferente da biossintese *de novo*. O *operon cob*, portanto, contém apenas genes necessários para a síntese *de novo* de vitamina B_{12}. Os genes relacionados à cobalamina que se encontram fora do *operon* principal

apresentam funções adicionais importantes quando B_{12} não está sendo sintetizada *de novo*, mas a exata função destes genes ainda não foi esclarecida (ROTH *et al*., 1996).

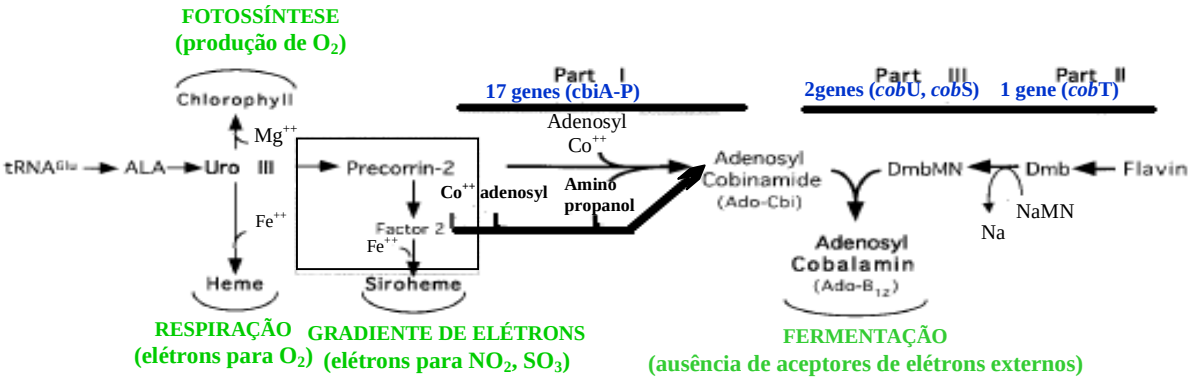

Figura 2. Visão geral da via biossintética de vitamina B_{12} (ROTH *et al*., 1996)

2.2.8. Transporte de vitamina B_{12}

A membrana externa das bactérias gram-negativas constitui uma barreira que restringe a passagem tanto de nutrientes quanto de agentes tóxicos (KADNER, 1977). A maioria dos nutrientes que atravessa a membrana para o espaço periplasmático o faz por difusão através de poros específicos (CADIEUX *et al*., 2002).

O transporte de cobalamina para dentro da célula bacteriana possui dois problemas (ROTH *et al*., 1996). Primeiro, o tamanho da molécula excede o limite para passagem através dos poros da membrana externa das bactérias entéricas. Dessa forma, a entrada de vitamina B_{12} requer um sistema especifico de transporte. O segundo problema é que a cobalamina pode se apresentar em quantidades extremamente baixas no meio ambiente (ROTH *et al*., 1996). Para transportar quantidade significativa do cofator, este sistema de transporte pela membrana externa, deve ser hábil para encontrar vitamina B_{12} com alta afinidade e movê-la para o espaço periplasmático; a partir daí, outros sistemas devem passar a atuar e movê-la através da membrana interna (Figura 3) (ROTH *et al*., 1996). *E.coli* tem sido o organismo modelo para o estudo do mecanismo de transporte da cobalamina, uma vez que não apresenta

síntese *de novo* deste cofator, mas o requer para assistir algumas enzimas (BRADBEER, 1991; CADIEUX *et al*., 2002).

O transporte através da membrana externa requer a proteína transportadora BtuB que está associada fisicamente a proteína TonB, um transportador trans-periplasmático substrato-específico (KADNER & LIGGINS, 1973; BRADBEER, 1991; LUNDIGRAN *et al*., 1991). Este sistema tem alta afinidade por vitamina B_{12} e derivados dela como AdoCbl e cobinamide (BRADBEER *et al*., 1978; KENLEY *et al*., 1978). Sem esse sistema, BtuB/TonB, B_{12} penetra pela membrana externa com eficiência extremamente baixa (ROTH *et al*., 1996). Uma vez ligada à proteína BtuB, a vitamina B_{12} é movida para o periplasma em um processo dependente de energia e que requer a proteína TonB, além disso, o co-transporte de cálcio é requerido para a passagem de B_{12} através da membrana externa (BRADBEER & GUDMUNDSDOTTIR, 1990; BRADBEER, 1993).

O transporte através da membrana interna, em *E.coli*, é realizado pelas proteínas de membrana BtuC e BtuD (FRIEDRICH *et al*., 1986). Mutantes *btu*C e *btu*D, tem o fenótipo corrigido quando há um aumento sutil de vitamina B_{12} externa (DI GIROLAMO *et al*., 1971). BtuF é uma proteína periplasmática com alta afinidade para se ligar a cobalamina e que realiza o transporte através da membrana citoplasmática (CADIEUX *et al*., 2002). O gene *btu*F de *E. coli* e STM codifica um ligante periplasmático para cobalamina e uma proteína transportadora de cobalamina (CADIEUX *et al*., 2002). A possível função para BtuF é o auxílio na liberação de vitamina B_{12} ligada a BtuB. O transporte de vitamina B_{12} do ambiente para o citoplasma segue cinco passos seqüenciais em *E. coli* e STM (Figura 3).

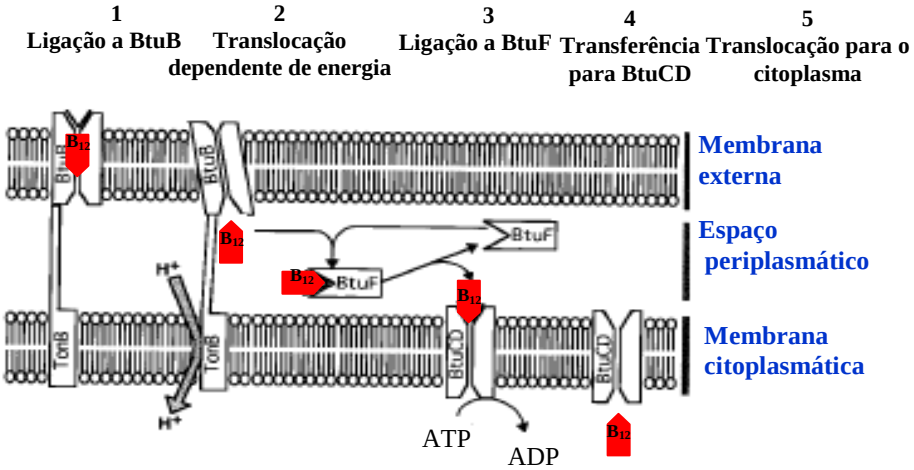

Figura 3. Transporte de cobalamina em *E. coli* e STM. Os números indicam a seqüência de eventos. ROTH *et al*., 1996.

2.2.9. Regulação da biossintese de vitamina B_{12} em STM.

O operon *cob* está adjacente ao operon *pdu* no cromossomo de *Salmonella* Typhimurium (Chen *et al*., 1995). Os dois operons são induzidos por propanediol e utilizam a mesma proteína regulatória (PocR), o que indica que o principal papel da vitamina B_{12} em STM é suportar o catabolismo de propanediol (BOBIK *et al*., 1992; CHEN *et al*., 1994). Estudos demonstraram que propanediol induz a transcrição do operon *cob* em células crescendo em fonte pobre de carbono (RONDON & ESCALANTE-SEMERENA, 1992; CHEN *et al*.,1994). Mutações introduzidas entre o operon *cob* e *pdu* eliminam a indução de ambos *operons* por propanediol(ROTH *et al*., 1996).

Dois sistemas regulatórios (Crp/Cya e ArcA/ArcB) afetam o potencial de indução dos *operons cob* e *pdu* (ESCALANTE-SEMERENA & ROTH, 1987; AILION *et al*., 1993). Os dois *operons* são ativados aerobicamente e anaerobicamente pela proteína Crp e anaerobicamente por pela proteína ArcA. A indução máxima dos operons é vista durante o crescimento anaeróbico de STM em fontes pobres de carbono, pois as proteínas Crp e ArcA atuam aditivamente. O controle do *regulon* depende de cinco promotores, todos localizados na região central entre os *operons cob* e *pdu*, quatro destes promotores são ativados pela proteína PocR (CHEN *et al*., 1995). Estes promotores são ativados sempre que a proteína PocR e propanediol estão presentes. O

controle global dos dois *operons* é exercido por quantidades variáveis da proteína PocR. O gene *poc*R é transcrito por três promotores (P_1, P_2, P_3) controlados pelas proteínas regulatórias globais e por auto-indução (CHEN *et al*., 1995). A transcrição de P_2 é claramente auto-regulada por PocR, e em adição, requer a proteína ArcA, a qual sinaliza redução no interior da célula (CHEN *et al*., 1995). O controle do promotor P_1, pode estar envolvido seja com a proteína Fnr (a qual responde a redução no interior celular) seja com a proteína Crp (que responde à escassez de carbono e energia) em adição ao ativador PocR.

ROTH *et al*. (1996) propõem a seguinte analogia: considera-se que o *regulon* dos *operons cob* e *pdu* apresente três estados: no modo “desligado”, que seria durante o crescimento aeróbico em glicose, todos os promotores estão no nível mais baixo; a proteína reguladora PocR é produzida pela expressão de níveis basais dos promotores P_1, P_2 e Ppoc. O “regulon” em “modo de espera” é resultado do crescimento das células sobre qualquer conjunto de condições globais de indução, mas sem propanediol. Estas condições globais de indução seriam crescimento aeróbico em fontes pobres de carbono e/ou crescimento sem oxigênio. Estas condições estimulam a expressão de PduF e PocR, mas os *operons cob* e *pdu* permanecem não induzidos. As duas proteínas induzidas no “modo de espera” (PduF e PocR) são necessárias para perceber o propanediol. Se o propanediol aparece, os promotores P_1 e P_2 são induzidos, aumentando os níveis da proteína PocR, o *regulon* passa então ao modo “ligado” . Altos níveis do complexo PocR/propanediol induzem a expressão dos *operons cob* e *pdu* (ROTH *et al*., 1996).

Este modelo de regulação sugere algumas coisas a respeito do papel da vitamina B_{12} na fiosiologia de *Salmonella* spp. A indução do *operon cob* por propanediol e a co-indução do *operon pdu* sugerem que a degradação de propanediol poderia ser a principal função da cobalamina em *Salmonella* spp. (SAMPSON, 2004). O controle global Crp/AMPc sugere que a vitamina B_{12} auxilia a prover uma fonte de carbono ou energia compatível com a importância da vitamina B_{12} para a degradação de propanediol. O controle por ArC (e talvez Fnr) sugere que sua expressão em anaerobiose seja importante (ROTH *et al*., 1996).

Independente dos mecanismos descritos até então, a transcrição do *operon cob*, mas não do *operon pdu* é reduzida na presença do produto final: adenosilcobalamina (LUNDRIGAN & KADNER, 1989). Este mecanismo de controle partilha muitas características com aquele de repressão do gene *btu*B (transporte de vitamina B_{12} através da membrana externa) em resposta a AdoCbl. Este mecanismo de controle esta ainda por esclarecer, mas parece utilizar uma seqüencia de RNAm líder para perceber AdoCbl e efetuar ambos controles, transcricional e traducional (LUNDRIGAN *et al*., 1991; RICHTER-DAHLFORS *et al*., 1994). No *operon cob* de STM e no gene *btu*B de *E. coli*, o controle da tradução do primeiro gene (*cbi*A) parece ser parte de um mecanismo de controle integral (RICHTER-DAHLFORS & ANDERSSON, 1992; RICHTER-DAHLFORS *et al*., 1994). Uma interação direta ocorreria entre o efetor (AdoCbl) e o RNAm líder. Esta interação induziria dobras no RNAm líder, que se estabilizaria em forma de grampo, bloqueando o inicio da tradução da região codificadora adjacente. A seqüência não traduzida poderia levar a mensagem de término até um sítio dentro gene estrutural, exercendo assim, o controle transcricional (LUNDRIGAN *et al*., 1991; ROTH *et al*., 1996).

2.2.10. Significado biológico de vitamina B_{12} para *Salmonella* spp.

S. enterica pode obter AdoCbl por síntese *de novo* ou captar do ambiente (Jeter *et al*., 1984). Pode também, transportar precursores corrinóides tais como hidroxicobalamina (HOCbl) e cianocobalamina e convertê-los em Ado-Cbl (ESCALANTE-SEMERENA *et al*., 1990).

Aproximadamente 1% do genoma da STM é dedicado a síntese ou importação de vitamina B_{12}, no entanto, mutantes defectivos na síntese de cobalamina não apresentam defeitos no crescimento aeróbio ou anaeróbio sobre condições laboratoriais (ROTH *et al*., 1996). São descritos até o momento, 26 genes envolvidos na síntese de cobalamina e seis genes para importação (ROTH *et al*., 1993). Visto que o cromossomo da STM abriga em torno de 4000 genes, 1% deste genoma é dedicado a aquisição de vitamina B_{12}. Em adição, o genoma inclui dois grandes *operons* que codificam enzimas necessárias para a utilização dependente de vitamina B_{12} de propanediol e

etanolamina. Juntos, estes *operons* parecem incluir 30 genes; se for incluído o gene *met*H, um total de 63 genes estarão envolvidos na síntese e utilização de vitamina B_{12}, representando um enorme investimento genético (ROTH *et al*., 1993, 1996).

As duas principais vias catabólicas que requerem vitamina B_{12} (propanediol e etanolamina) parecem não prover forte pressão seletiva para sua síntese, uma vez que a síntese de vitamina B_{12} se dá apenas em anaerobiose e a utilização de etanolamina e propanediol como fontes de carbono e energia só é possível aerobicamente. É sabido que nitrato e fumarato não atuam como aceptores alternativos de elétrons em anaerobiose para etanolamina e propanediol. PRICE-CARTER *et al*. (2001) demonstraram que tetrationato suporta o crescimento anaeróbico em ambos os substratos, no entanto, não se sabe sobre a disponibilidade de tetrationato ou outros polissulfitos no organismo hospedeiro, de forma, que não se pode afirmar que o tetrationato suporte o crescimento anaeróbico em propanediol ou etanolamina *in vivo*.

Para alguns pesquisadores está claro que se os genes para síntese de vitamina B_{12} em condições naturais não estivessem sobre pressão de seleção, inevitavelmente seriam perdidos por mutações cumulativas (ROTH et al., 1996). A manutenção de tamanha coleção de genes envolvidos na síntese e utilização de vitamina B_{12} requer uma forte pressão seletiva imposta sobre populações naturais de *Salmonella* spp. e relacionada ao estilo de vida desta bactéria. Considerando que fenótipos mutantes para síntese de vitamina B_{12} trabalhados em laboratório até o momento não indicaram qual seleção poderia ser esta, acredita-se que esta pressão seletiva esteja estritamente relacionada ao parasitismo da *Salmonella* spp e sua relação com o hospedeiro. O entendimento de como *Salmonella* spp. se desenvolve no hospedeiro daria subsídio para o entendimento de quais funções a cobalamina desempenha neste processo.

Salmonella e *E.coli* são microrganismos relacionados, no entanto, *E. coli* não sintetiza vitamina B_{12} *de novo* e também não degrada propanediol. O sistema de regulação do *operon cob* sugere que a utilização vitamina B_{12}-dependente de propanediol, permanece até o momento como principal fator de seleção para produção da vitamina B_{12}.

Salmonella enterica utiliza 1,2-Pd como fonte de carbono e energia por uma via que requer coenzima B_{12} (JETER, 1990). O principal produto da fermentação de duas metilpentoses muito comuns, rhamnose e fucose é 1,2-Pd. (SAMPSON, 2004). A habilidade para degradar 1,2-Pd pode conferir uma vantagem seletiva em determinados nichos anaeróbios como o trato intestinal do animal hospedeiro e o interior de macrófagos (LIN, 1987; OBRADORS *et al*., 1988). Há evidências de que 1,2-Pd tem participação na patogênese de *Salmonella*. Estudos *in vivo* indicaram que a degradação de 1,2-Pd seria importante para o crescimento de *Salmonella* em tecidos do hospedeiro e estudos em camundongos mostraram que mutações em *pdu* diminuíram a virulência das cepas mutantes em comparação à cepa selvagem (Conner *et al*., 1998; Heithoff *et al*., 1999).

Para a degradação de 1,2-Pd em STM são requeridos 21 genes do locus *pdu* que é adjacente ao operon *cob* (JETER 1990; CHEN *et al*., 1995). Ambos *operons* são controlados pelo sistema ArcA/ArcB durante o crescimento anaeróbico e pelo sistema Crp/AMP cíclico sobre condições de déficit de carbono e energia, aeróbica e anaerobicamente (ESCALANTE-SEMERENA & ROTH, 1987; AILION *et al*., 1993; CHEN *et al*., 1995). Estudos recentes estabeleceram que a expressão de genes encontrados no operon *pdu* (*pdu*A e *pdu*C) foi diminuída pela metade em mutantes *crs*A (LAWHON *et al*., 2003). A proteína CrsA é um regulador pós-traducional que controla a expressão de genes da Ilha de Patogenicidade I, sistema de secreção tipo III e *operons* de síntese do flagelo (WEI *et al*., 2000; BAKER *et al*., 2002; LAWHON *et al*., 2003). A Alteração negativa da expressão de *csr*A afeta a expressão de genes da SPI-1 e diminui a habilidade de bactérias mutantes de invadir culturas de células epiteliais (LAWHON *et al*., 2003). A expressão de genes *cob*, *cbi* e de genes de utilização de etanolamina (*eut*) também é negativamente afetada em mutantes *crs*A (LAWHON *et al*., 2003). A regulação de CsrA em *Salmonella* spp. parece seguir de perto, o controle de funções especificas da bactéria, no ambiente intestinal, em especial àquelas envolvidas com a virulência (LAWHON *et al*., 2003).

III. **OBJETIVOS**

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho foi elaborado para estudar a relação parasita-hospedeiro entre mutantes de *Salmonella* sorotipos Gallinarum, Pullorum e Enteritidis contendo os genes *cob*S e *cbi*A inoperantes.

3.2. Objetivos específicos

Preparar mutantes de *Salmonella* sorotipos Gallinarum, Pullorum e Enteritidis defectivos nos genes *cob*S e *cbi*A.

Avaliar comparativamente o efeito deles *in vivo*, inoculando-os em aves susceptíveis.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo dos mutantes

Foram preparadas cepas mutantes de *Salmonella enterica subspecie enterica* sorotipos Enteritidis (SE), Pullorum (SP) e Gallinarum (SG) com alteração nos genes *cob*S e *cbi*A oriundos de *Salmonella* Typhimurium (STM), conforme procedimento para preparo de genes defectivos contidos no manual de técnicas de biologia molecular (Sambrook & Russel, 2001) e no trabalho de Turner *et al*. (1998).

4.1.1. "Primers" utilizados

Foram desenhados "primers" para os genes *cbi*A e *cob*S. Aos "primers" adicionaram-se seqüências de nucleotídeos relativas aos sítios de restrição das enzimas necessárias para que os mesmos pudessem ser incorporados aos plasmídios e para a inserção dos marcadores. Inseriu-se o gene de resistência à canamicina (Kan^r) como marcador do gene *cbiA* e o gene de resistência à espectinomicina (Spc^r) como marcador do gene *cob*S.

Nos "primers" externos (1 e 4) adicionou-se a seqüência de bases para o corte pela enzima *Xba*I (tctaga) (Gibco 15226), nos "primers" internos (2 e 3) adicionou-se a seqüência de bases para o corte pela enzima *Kpn*I (ggtacc)(Gibco 15232) para o gene de resistência á canamicina (Kan) e pela enzima *BamH*I (ggatcc) (Gibco 15201) para o gene de resistência à espectinomicina (Spc).

cobS:

"Primer" 4: agtctagaacagacccagcagaaagatc

"Primer" 3: ccgctaggtaccctgctgaccggtggttttca

"Primer" 2: cagcagggtacctagcggaataccacaccagg

"Primer" 1: gagatctagaacgaatctgctgtttgcgct

*cbi*A :

“Primer” 4: tgtctagacagccagtgctgcaacattt

“Primer” 3: gccattggtaccatacggtgatgttaaaacat

“Primer” 2: ccgtaaggtaccaatggcatttttgaggagct

“Primer” 1: catctagaaaggcatcacgcatttattc

4.1.2. Preparo do gene alterado (defectivo)

Inicialmente, foram produzidos dois fragmentos de cada gene, sendo o fragmento A obtidos com os “primers” 1 e 2 e fragmento B obtido pelos “primers” 3 e 4. Para obtenção desses fragmentos, empregou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como substrato, cromossomo de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium resistente ao ácido nalidíxico (STM Nal^r). O termociclador foi preparado com a seguinte programação: estágio 1: ciclo único de 95ºC/1minuto; estágio 2: 95ºC/20segundos, 50ºC/1minuto e 72ºC/1minuto, repetidos 25 vezes; estágio 3: ciclo único de 72ºC/5minutos.

As soluções submetidas à PCR consistiam de:

50 µL de Mix (106 µL de H_2O, 15 µL de 10X buffer, 15 µL de dNTP 100mM e 4,5 µL $MgCl_2$ 50mM)

0,5 µL dos “primers” 1 e 2 ou 0,5 µL dos “primers” 3 e 4

0,4 µL de Taq DNA polimerase (500U)

0,4 µL de DNA cromossomico

Amostras dos dois fragmentos amplificados (A e B), de cada gene, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para análise do tamanho dos fragmentos obtidos (Aparelho: Consort E863, 600V 250mA, cuba Horizon 11-14 CE, Life Technology). Utilizou-se 90 mL de gel composto por agarose a 1%, diluída em solução tampão TAE (4,84g de TRIS base, 1mL de ácido acético glacial, 2mL de EDTA 0,5M e H_2O qsp 1000mL, pH 8,0) acrescido de 9 µL de solução aquosa a 1% de brometo de etídio (Sigma E-4391). As amostras, mais o marcador de tamanho molecular (1µL DNA Gibco 1kb, 2µL de solução corante e 7µL água destilada) foram submetidos a uma

corrente elétrica de 80V por 1h e 30min. O gel foi colocado sob luz ultravioleta e fotografado.

Após a constatação na eletroforese de que se obteve os produtos desejados, as soluções obtidas foram purificadas em MicroSpin Columns S-400HR (Pharmacia Biotech). Posteriormente, os fragmentos A e B foram unificados através da técnica da PCR, utilizando-se as soluções purificadas de DNA e os “primers” 1 e 4. A programação descrita anteriormente foi mantida, alterando-se apenas o tempo de extensão a 72ºC, de 1 min para 1min e 30s.

4.1.3. Inserção do gene no vetor p-Gem T

Antes de o gene defectivo ser introduzido de forma definitiva em cepas de SE Nal^r, SP Nal^r e SG Nal^r (resistentes ao antibiótico ácido nalidíxico), ele foi inserido em plasmídios.

A primeira etapa consistiu da inserção do gene defectivo no vetor p-Gem T (Promega L 2001), conforme recomendação do laboratório que o produz. Preparou-se uma mistura contendo solução do p-Gem (0,5 µL), tampão ligase (2,5 µL), solução do gene amplificado por PCR (1,5 µL) e solução de ligase (0,5 µL) (Invitrogen 15224-025), a qual foi incubada a 23ºC durante 3h. Em seguida, adicionou-se 2 µL dessa mistura a 50µL de uma suspensão de células de *E. coli* cepa JM109. Depois de permanecer 20 min em gelo, a suspensão de células foi submetida a 42ºC durante 50s, ficando em repouso por 2 min em gelo. Acrescentou-se 950 µL do meio SOB (20,60g de triptona, 5g de extrato de levedura, 0,6g de NaCl, 0,19g de KCl, H_20 qsp 1000mL, pH 8,0), sendo incubada a 37ºC por 1h e 30 min. Decorrido este período, foi espalhada na superfície de cinco placas contendo ágar LB (ágar Lennox L 22700-025 Invitrogen) adicionado de solução de ampicilina (Amp) (100 µL/mL), X-gal (200 µL diluído em DMSO Promega V 3941) e IPTG (0,04g/mL H_2O, Promega V3955). As placas foram incubadas a 37ºC por 24h.

Bactérias provenientes de colônias brancas, as quais supostamente continham o vetor p-Gem T, foram submetidas à técnica da PCR, seguida de eletroforese, para confirmação.

A solução submetida à PCR consistia de:
30,0 µL de Mix (920µL de Agua Ultra pura, 120µL de 10XTampão para PCR, 36µL de $MgCl_2$ 100mM ; 120µL de dNTP 100mM); 0,5 µL de “primer” M13F; 0,5 µL de “primer” 1; 0,4 µL de Taq DNA polimerase; Colônia (+)

A programação do termociclador foi mantida a mesma, utilizada na etapa de unificação dos fragmentos.

4.1.4. Extração do vetor p-Gem T de *E. coli* JM109

Uma colônia de *E. coli* JM109 com as características desejadas, confirmada por PCR, foi selecionada e inoculada em 10 mL de caldo LB, incubado a 37ºC por 24h em agitação. A cultura foi centrifugada a 4500rpm por 12min a 4ºC. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de tampão TE (10Mm de TRIS e 1mM de EDTA, pH 8,0), transferido a um microtubo, no qual acrescentou-se 400 µL de SDS (0,45g de SDS, 3mL de NaOH 3M). Após misturar gentilmente, o tubo permaneceu em temperatura ambiente por 2 min. Prosseguindo, acrescentou-se 400 µL de KOAc (3M $KC_2H_2O_2$, 2M HOAc e 1mM EDTA) gelado e após misturar gentilmente, centrifugou-se a 4500rpm por 5min a 4ºC. O sobrenadante foi transferido a outro tubo contendo 400 µL de fenol/clorofórmio (Sigma p-2069). Após nova centrifugação a 4500rpm por 5min a 4ºC, o sobrenadante foi transferido a outro microtubo, onde se adicionou 500 µL de isopropanol, centrifugando-se novamente por 10min. A seguir, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se etanol (70%). Após a remoção do etanol, o sedimento foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE contendo 0,9 µL de RNAase (Sigma R-5500) e incubado a 37ºC por 30 min, sendo posteriormente submetido à eletroforese em gel de agarose.

4.1.5. Digestão enzimática

Nesta etapa, o produto unificado (A + B) foi preparado para receber o marcador (gene de resistência ao antibiótico). Os “primers” 2 e 3 foram desenhados contendo 6 bases relativas aos sítios de corte das enzimas *Bam*HI (espectinomicina) ou *Kpn*I

(canamicina). Os produtos A+B dos genes *cob*S e *cbi*A foram submetidos à digestão enzimática pelas enzimas *Bam*HI e *Kpn*I, respectivamente.

As soluções enzimáticas preparadas continham: 3µL da enzima; 4µL do respectivo tampão da enzima; 23µL de água ultra pura e 5µL de DNA. A solução enzimática foi incubada a 37ºC por 2h. Decorrido este período a digestão foi interrompida adicionando-se 1µL de solução de EDTA pH8 e purificada em coluna (Quiagen) sendo em seguida submetida à eletroforese para avaliação.

4.1.6. Adição do gene que confere à bactéria resistência ao antibiótico e transformação do vetor p-Gem T em *E.coli* JM109.

Após a digestão enzimática, adicionou-se o marcador ao vetor p-Gem T. Para tanto, 1,5 µL da solução do vetor mais 2,0 µL da solução do gene do marcador (Kan^r ou Spc^r), permaneceram 3 min a 55ºC e em seguida, 1 min em gelo, antes de receber 1µL de tampão ligase e 0,5 µL de solução de ligase (Invitrogen 15224-025) e ser incubado a 23ºC por 3 h. Posteriormente, adicionou-se 2 µL dessa mistura a 50 µL de uma suspensão de células de *E. coli* JM109 que permaneceu 20 min em gelo, sendo a seguir, submetida à temperatura de 42ºC por 50s, voltando a permanecer em gelo por 2min. Após receber 950µL do caldo SOB, foi incubada a 37ºC por 1h e em seguida despejada em 6 placas de ágar LB contendo ampicilina (100µg/mL) mais canamicina (30µg/mL) ou espectinomicina (50µg/mL). As placas foram incubadas a 37ºC por 24h.

Colônias bacterianas resistentes à ampicilina (Amp^r) e canamicina (Kan^r) ou Amp^r e espectinomicina (Spc^r), foram submetidas à técnica da PCR, para confirmação.

As cepas de *E.coli* JM 109 Amp^r e Kan^r foram submetidas à técnica da PCR utilizando-se os “primers” M13F + 19077, M13F + 19078, M13R + 19077 e M13R + 19078. Para os mutantes de *E. coli* JM109 Amp^r e Spc^r, utilizou-se os “primers” M13F + M13R e Spc IN. Os “primers” 19077 e 19078 identificam o marcador Kan^r e o “primer” Spc IN, o marcador Spc^r.

4.1.7. Extração do vetor p-Gem T de *E. coli* JM109 e digestão enzimática

O vetor p-Gem T foi novamente extraído de células de *E. coli* JM109 para nova digestão enzimática à semelhança do que foi feito anteriormente (4.1.4), exceto que agora, tratou-se com 1µL da enzima *Xba*I (utilizando-se o tampão desta enzima) todos os genes. A solução obtida foi submetida à eletroforese em gel de agarose para confirmar a ação enzimática.

Na etapa seguinte transferiu-se o gene defectivo para outro plasmídio (pJCB12).

4.1.8. Ligação do gene defectivo no plasmídio JCB12

Para a inserção do gene defectivo no plasmídio, misturou-se 2,5 µL da solução obtida após digestão enzimática, com 1,0 µL da solução do plasmidio JCB12, também submetido ao mesmo processo de digestão enzimática. Após tratamento térmico a 55ºC por 3min, a mistura permaneceu em gelo por 1min e adicionou-se 1,0 µL de tampão ligase e mais 0,5 µL de ligase (Invitrogen 15224-025). Após homogeneização, a mistura foi incubada a 23ºC por 2h, permanecendo a 20ºC até o momento de uso.

4.1.9. Preparo de células de *Escherichia coli* DH5α

Preparou-se uma cultura de *E. coli* DH5α em caldo LB (Invitrogen 12780-052) incubado a 37ºC por 24h. Desta cultura, transferiu-se 1 mL para 100mL de caldo LB incubado a 37ºC por 3h em agitação. A cultura foi centrifugada a 4000rpm por 14 min q 4ºC e o sedimento obtido foi ressuspenso em 50 mL de água destilada, homogeneizado e centrifugado a 3500rpm por 14 min a 4ºC. O sedimento final foi ressuspenso em 80 µL de solução de glicerol a 10% e mantido em gelo.

4.1.10. Eletro-transformação

A suspensão de células de *E.coli* DH5α (80 µL) foi misturada com 4 µL da solução do plasmídio, permaneceu 1 min em gelo e foi transferida para uma cuba de eletro-transformação, a qual, foi submetida a corrente elétrica (aparelho gene pulse Biorad, resistência 200 Kv, capacitância 25 uFD). Em seguida, acrescentou-se 1 mL de caldo LB e incubou-se a suspensão bacteriana a 37ºC por 1h. Espalhou-se a cultura sobre

placas de ágar LB acrescido de cloranfenicol (20µg/mL) e canamicina (30µg/mL) ou espectinomicina (50µg/mL), que foram incubadas a 37ºC por 24 horas.

Assim como a resitência a ampicilina era a marca da presença do vetor p-Gem T, a resistência ao cloranfenicol é a marca do plasmidio JCB12.

Colônias bacterianas resistentes a cloranfenicol (Cm^r), Spc^r ou Kan^r e Amp^s, foram purificadas e submetidas à PCR e eletroforese em gel de agarose para confirmação. São colônias de *E. coli* DH5α contendo plasmidio JCB12 (Cm^r) com o gene (Kan^r ou Spc^r), mas que não contêm mais o vetor p-Gem T (Amp^s).

A solução submetida à PCR consistia de: 30 µL de Mix (920µL de Agua Ultra pura, 120µL de 10X Tampão para PCR, 36µL de $MgCl_2$ 100mM ; 120µL de dNTP 100mM); 0,5 µL de "primer" 1; 0,5 µL de "primer" 4; 0,4 µL de Taq DNA polimerase (500U) e Colônia (+).

4.1.11. Transferência do plasmidio JCB12 (Cm^r e Kan^r ou Spc^r) para *E. coli* S17.1 λ pir.

Após a confirmação de que a cepa de *E. coli* DH5α adquiriu o plasmidio JCB12, extraiu-se o plasmídio, contendo o gene defectivo e o seu marcador (Kan^r ou Spc^r) para transferi-lo a outra cepa de *E. coli* S17.1 λ pir, conforme descrito no item 4.1.7 e 4.1.8) Neste caso, misturou-se 4 µL da solução do plasmídio com 80µL da suspensão de células de *E. coli* S17.1 λ pir, prosseguindo-se conforme descrito anteriormente, sendo a cultura semeada em ágar LB contendo cloranfenicol e canamicina ou espectinomicina.

As colônias bacterianas foram purificadas em ágar LB acrescido dos discos dos antibióticos cloranfenicol (30µg), ampicilina (25µg) e canamicina (30µg) ou espectinomicina (50µg) e avaliadas pela técnica da PCR, conforme foi utilizado para *E. coli* DH5α.

4.1.12. Conjugação do gene defectivo com as cepas receptoras de $SGNal^r$, $SPNal^r$ e $SENal^r$.

O gene defectivo contido no plasmídeo JCB-12 e hospedado em *Escherichia coli* S17.1λ pir, foi transferido para as cepas recipientes finais, resistentes ao ácido nalidíxico, SGNal^r, SENal^r, SPNal^r. Culturas de *E. coli* S17.1λ pir Δ*cbi*A Can^r ou *E.coli* S17.11λ pir Δ*cob*S Spc^r e as cepas de *Salmonella* Nal^r, foram preparadas, individualmente, em ágar LB e incubados a 37ºC. Com auxílio de uma alça bacteriológica, o crescimento das duas culturas (doadora e receptora) foram retirados e depositados na superfície de placa de ágar LB, onde foram misturados com movimentos circulares de forma que os dois tipos celulares (*E. coli* S17.1λ pir e *Salmonella* Nal^r) ficassem bem próximos, sendo as placas incubadas a 37ºC por 90 min. Usando a alça bacteriológica, o crescimento foi colhido e adicionado a 10 mL de caldo LB, que foi espalhado, também com alça bacteriológica, sobre a superfície de outra placa de ágar LB, contendo ácido nalidíxico (25µg/mL) e canamicina (30 µg/mL) para cepas com o gene Δ*cbi*A ou espectinomicina (50 µg/mL) para cepas com o gene Δ*cob*S. As placas foram incubadas a 37ºC por 24h. As colônias emergentes foram semeadas em ágar LB contendo discos impregnados com os antibióticos: ácido nalidíxico (30µg), cloranfenicol (30µg) e canamicina (30µg) ou espectinomicina (25µg).

Colônias Nal^r, Kan^r ou Spc^r e Cm^s, foram submetidas a teste de aglutinação frente ao antígeno somático anti Fator 9 e à acriflavina.

Colônias O9(+), e acriflavina (-) foram submetidas à PCR para caracterização definitiva do mutante desejado.

A PCR foi realizada utilizando-se os primers 1 e 4 de cada gene (Δ*cob*S ou Δ*cbi*A).

4.1.13. Transdução

O preparo do mutante contendo dois genes defectivos foi realizado através de transdução utilizando o bacteriófago ØP22, que foi multiplicado na cepa selvagem (*Salmonella* Nal^r). Preparou-se uma cultura em caldo LB de uma cepa de *Salmonella* Nal^r a 37ºC por 24h em agitação. Dessa cultura que continha aproximadamente 1,0 x 10^9 UFC/mL, retirou-se 1 mL, o qual foi inoculado em 10mL de um caldo LB, juntamente com 1mL de uma solução de bacteriófago. Após incubação a 37ºC por 24h

em agitação, centrifugou-se a cultura a 4000rpm por 25min a 4ºC. O sobrenadante foi filtrado em filtro 0,45µm (Millipore) e procedeu-se a contagem em ágar LB com camada de *Salmonella* Nal^r .

As cepas contendo o gene defectivo: SGΔ*cbi*A, SEΔ*cbi*A, ou SPΔ*cbi*A, foram cultivadas em 10mL de caldo LB, incubadas a 37ºC por 24h estaticamente. As culturas apresentaram, em torno de $5{,}0x10^8$UFC/mL. A essas culturas adicionou-se solução do bacteriófago ØP22 na proporção de 0,03 ØP22/1 bactéria. A mistura foi incubada a 37ºC/24h em agitação. A seguir, centrifugou-se o cultivo a 4000rpm por 20min a 4ºC, filtrou-se o sobrenadante (filtro Millipore 0,45µm) e procedeu-se à contagem das placas de lise do ØP22 em ágar LB com camada de SGΔ*cob*S, SEΔ*cob*S ou SPΔ*cob*S. Posteriormente, a solução de bacteriófago cultivada em cepas Δ*cbi*A foram adicionadas as suas respectivas culturas: SGΔ*cob*S, SEΔ*cob*S e SPΔ*cob*S, preparadas em agitação a 37ºC pro 24h, centrifugadas a 4000rpm por 20min e ressuspensas em 1mL do caldo LB. Essas cultura apresentaram, aproximadamente, $3{,}0x10^9$ UFC/mL e neste caso, a relação fago P22/*Salmonella* Δ*cob*S foi de 0,8/1,0. A mistura foi incubada a 37ºC por 30min estaticamente e depois espalhada em placas de ágar LB contendo ácido nalidíxico (25µg/mL) e canamicina (30µg/mL), que foram incubadas a 37ºC por 24h. Colônias emergentes foram purificadas em ágar LB contendo discos de antibiogramas: ácido nalidíxico (30 µg), canamicina (30 µg) e espectinomicina (25 µg) sendo incubadas a 37ºC por 24horas. As colônias foram submetidas à técnica da PCR para confirmação dos resultados.

4.1.14. Caracterização final das bactérias recombinates

Após a realização dos testes sorológicos preliminares para caracterização final das cepas obtidas, procedeu-se ensaios com PCR e eletroforeses.

Preparo da amostra: 30 µL de Mix (920µL de Agua Ultra pura, 120µL de 10XTampão para PCR, 36µL de $MgCl_2$ 100mM ; 120µL de dNTP 100mM); 0,5 µL do “primer” 1; 0,5 µL do “primer” 4; 0,4 µL de Taq DNA polimerase e colônia bacteriana

O termociclador foi preparado com a seguinte programação: Estágio 1: 94ºC/4min. Estágio 2: 94ºC/20s, 50ºC/1min e 72ºC/3min, repetidos por 24 vezes e estágio 3: 72ºC/5min.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para análise do tamanho dos fragmentos obtidos. O gel continha 90 mL de agarose a 1% diluída em solução tampão TAE e 9uL de solução aquosa a 1% de brometo de etídeo. As amostras, mais o marcador de tamanho molecular de 1Kb foram submetidos a uma corrente elétrica de 80V. Após 2 horas, o gel foi colocado sob luz ultravioleta e fotografado.

4.2. Ensaios *in vivo.* Avaliação da infecção

Os ensaios seguiram os modelos adotados por BERCHIERI Jr. *et al*. (2001a, b). As aves foram criadas em baterias com água e ração a*d libitum*. Em todos os ensaios *in vivo*, no momento da chegada das aves, colheram-se amostras de sangue para testes sorológicos visando a detecção de anticorpos anti-*Salmonella* e amostras de mecônio do interior das caixas, conforme ZANCAN *et al*. (2000) para pesquisa de *Salmonella* spp.

4.2.1. *Salmonella* Gallinarum Δ*cob*SΔ*cbi*A: Avaliação da mortalidade

Para avaliar o comportamento do mutante SGΔ*cob*SΔ*cbi*A, comparativamente à cepa original, utilizaram-se aves de variedade vermelha de linhagem comercial para postura de ovos de mesa, susceptíveis ao Tifo Aviário. Para cada cepa (mutante e selvagem) foram utilizados dois grupos contendo 20 aves cada. Aves de um grupo receberam 0,5 mL de cultura da cepa selvagem ou da cepa mutante, preparada em caldo LB incubado a 37ºC/24h em agitação (Estas culturas continham, aproximadamente $5{,}0 \times 10^{8}$ UFC/mL) e do outro grupo as mesmas culturas (selvagem ou mutante) diluídas a 10^{-2}. A inoculação foi realizada por via oral, no quinto dia de vida. As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se a mortalidade.

4.2.2 *Salmonella* Gallinarum Δ*cob*SΔ*cbi*A: Avaliação da infecção sistêmica.

Conforme procedimento realizado no ensaio 4.2.1, 40 aves foram infectados com o inóculo da cepa original e outras 40 com o inoculo da cepa mutante (os inóculos continham em torno de $5,0x10^8$UFC/mL). Dois, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi), 5 aves, de cada grupo, foram sacrificadas para a estimativa de *Salmonella* Gallinarum em baço e fígado.

As amostras de baço e de fígado foram diluídas em solução salina (PBS pH 7,4) na proporção de 1:10, maceradas e diluídas decimalmente duas vezes em PBS. De cada diluição foi retirado 0,1mL, despejado em ágar verde brilhante contendo novobiocina (1µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VBNN), que foi incubado a 37ºC/24h. O número de colônias por grama de órgão foi transformado em log_{10} para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, procedeu-se a enriquecimento das respectivas amostras. Aos frascos contendo as amostras homogeneizadas em PBS (1:10), adicionou-se igual volume de caldo selenito contendo novobiocina (0,04%) (caldo SN), preparado em concentração dupla. O frasco foi incubado a 37ºC por 24h e o seu conteúdo foi semeado em VBNN, com incubação a 37ºC por 24h.

4.2.3. *Salmonella* Pullorum Δ*cob*SΔ*cbi*A: Avaliação da mortalidade.

Para avaliar o comportamento do mutante SPΔ*cob*SΔ*cbi*A, este, foi inoculado em aves susceptíveis à infecção pelo agente da pulorose, comparativamente à cepa original. São aves de variedade vermelha de linhagem comercial para postura de ovos de mesa. Estas aves foram utilizadas em experimento prévio (BERCHIERI Jr. *et al*. 2001a). Para cada cepa foi utilizado um grupo contendo 20 aves.

As aves receberam 0,1 mL de uma cultura preparada em caldo LB, incubado a 37ºC por 24h em agitação (contendo em torno de $5,0x10^8$UFC/mL). A inoculação foi realizada por via oral, no primeiro dia de vida. As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se a mortalidade.

4.2.4. *Salmonella* Pullorum Δ*cob*SΔ*cbi*A: Avaliação da infecção sistêmica

Conforme procedimento realizado no ensaio 4.2.3, 40 aves foram infectadas com o inóculo (contendo aproximadamente $5,0x10^8$ UFC/mL) da cepa original e outras 40

com o mutante. Dois, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi), 5 aves, de cada grupo, foram sacrificadas para a estimativa de SP em baço e fígado.

As amostras de baço e de fígado foram colocadas em solução salina (PBS pH 7,4) na proporção de 1:10, maceradas e diluídas decimalmente duas vezes em PBS. De cada diluição retirou-se 0,1mL, despejou-se em ágar verde brilhante contendo novobiocina (1µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VBNN), que foi incubado a 37ºC/24h. O número de colônias por grama de órgão foi transformado em $\log_{10}$ para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, procedeu-se o enriquecimento das respectivas amostras. Aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10), se adicionou igual volume de caldo selenito contendo novobiocina (0,04%) (caldo SN), preparado em concentração dupla. O frasco foi incubado a 37ºC por 24h e o seu conteúdo semeado em VBNN, com incubação a 37ºC por 24h.

4.2.5. *Salmonella* Enteritidis Δ*cob*S Δ*cbi*A: Avaliação da excreção fecal e mortalidade.

Para avaliar o comportamento do mutante SEΔ*cob*SΔ*cbi*A, este, foi inoculado em aves susceptíveis à infecção por SE, comparativamente à cepa original. Foram utilizadas aves de variedade branca e variedade vermelha de linhagem comercial para postura de ovos de mesa. Estas aves foram utilizadas em experimento prévio (FREITAS NETO *et al*., 2008)

Sessenta aves brancas foram divididas em dois grupos contendo 30 aves. Em um grupo inoculou-se a cepa SEΔ*cob*SΔ*cbi*A e no outro a cepa SENal^r.Este procedimento foi repetido com a linhagem vermelha. As aves receberam 0,1 mL de uma cultura preparada em caldo LB, incubado a 37ºC por 24h em agitação (contendo aproximadamente $3{,}0 \times 10^9$UFC/mL). A inoculação foi realizada pela via oral, no primeiro dia de vida. As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se a mortalidade.

Durante as quatro semanas em que se observou as aves, duas vezes por semana, procedeu-se a pesquisa da excreção fecal de SE, por meio da colheita de fezes cloacais com suabes estéreis de algodão. Os suabes foram colocados em tubos

contendo 2mL de caldo SN. Após agitação, foram semeados em ágar VBNN. Os tubos e as placas foram incubados a 37ºC por 24 horas. Na ausência de crescimento no ágar VBNN, novamente, se semeou placas contendo ágar VBNN com incubação a 37ºC por 24horas.

4.2.6. *Salmonella* Enteritidis Δ*cob*S Δ*cbi*A: Avaliação da infecção sistêmica.

Estes ensaios foram realizados com aves brancas e vermelhas conforme descrição no item 4.2.5, com grupos contendo 40 aves cada. As aves receberam 0,1 mL de uma cultura preparada em caldo LB, incubado a 37ºC por 24h em agitação (contendo aproximadamente $3{,}0 \times 10^9$UFC/mL). A inoculação foi por via oral, no primeiro dia de vida. Dois, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi), cinco aves, de cada grupo, foram sacrificadas para a estimativa de SE em baço, fígado e conteúdo cecal.

As amostras de baço, de fígado e de conteúdo cecal foram pesadas e diluídas em solução salina (PBS pH 7,4) na proporção de 1:10. As amostras de fígado e baço foram maceradas e o conteúdo cecal foi homogeneizado. Em seguida, todas as amostras foram diluídas decimalmente em PBS pH 7,4. De cada diluição foi retirado 0,1mL, despejado em ágar VBNN, que foi incubado a 37ºC por 24h. O número de colônias por grama de órgão foi transformado em $\log_{10}$ para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS pH 7,4 (1:10), se adicionou igual volume de caldo selenito SN, preparado em concentração dupla. O frasco foi incubado a 37ºC por 24 e o seu conteúdo semeado em VBNN, com incubação a 37ºC por 24h.

4.3. Análise dos resultados

Dados relativos á mortalidade e excreção fecal foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Qui-Quadrado com nível de significância de 5%.

Contagens de *Salmonella* em órgãos e conteúdo cecal foram transformadas em $\log_{10}$ e estatisticamente analisados pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

4.4. Detecção da produção de vitamina B_{12}

4.4.1.Ensaio qualitativo

A metodologia empregada para determinação qualitativa das cepas produtoras de B_{12} seguiu as recomendações do Dr. James Warren da Universidade de Kent, Inglaterra e do Dr. Fernando Sesma do Centro de Referencia para Lactobacillos deTucuman, Argentina (comunicação pessoal).

As cepas de SPNal^r, SPΔ*cob*SΔ*cbi*A, SGNal^r, SGΔ*cob*SΔ*cbi*A, SENal^r, SEΔ*cob*SΔ*cbi*A, STMNal^r e STM Δ*cob*SΔ*cbi*A foram cultivadas individualmente em 10mL de caldo LB a 37ºC por 24h em agitação (100rpm). Essas culturas foram utilizadas para o preparo de culturas em anaerobiose. Em 5 mL de meio mínimo M9 (NaCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NH_4Cl, Glicose, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $CoCl_2$ e casaminoácido livre de vitaminas) com camada de 3mL de vaselina inoculou-se 0,1 mL das culturas anteriores e incubou-se a 37ºC por 24 horas. A seguir, as culturas foram semeadas em "MacConkey agar B_{12} detection" suplementado com 1,2 propanediol e $CoCl_26H_20$, que foi incubado a 37ºC por 24horas para cepas de *Salmonella* Typhimurium e 48 horas para as demais.

A presença de sais biliares e do vermelho neutro como indicador de pH, nesse meio, possibilita a diferenciação de cepas capazes de degradar 1,2Pd a propionato. Quando o acido propiônico é produzido, os sais biliares são precipitados. Em seguida, há absorção do vermelho neutro, transmitindo cor vermelha às colônias. As cepas incapazes de degradar 1,2Pd a ácido propiônico se desenvolvem com coloração que vai de palha a incolor.

4.4.2. Ensaio quantitativo

A detecção da quantidade de vitamina B_{12} produzida pelas cepas de SPNal^r, SPΔ*cob*SΔ*cbi*A, SGNal^r, SGΔ*cob*SΔ*cbi*A, SENal^r, SEΔ*cob*SΔ*cbi*A, STMNal^r e STM Δ*cob*SΔ*cbi*A foi realizada pelo método de quimioluminescência Immulite 1000 Siemens®.

4.4.2.1. Preparação das amostras a ser submetida ao método de quimioluminescência Immulite 1000 Siemens®.

A metodologia empregada foi descrita por Riaz *et al*., (2007) com modificações. Culturas aeróbias das amostras foram preparadas em caldo LB e incubadas 37ºC por

24 horas em agitação (100rpm). Em seguida, iniciou-se a realização dos cultivos anaeróbios para produção de cobalamina. Adicionou-se 0,1mL de cada cultura a 5 mL de meio mínimo M9 com camada de 2mL de vaselina que foi incubado a 37ºC/24h. Prosseguindo, adicionou-se 0,1mL desta cultura a 5 mL de meio mínimo M9 com camada de 2mL de vaselina, incubado a 37ºC/24. Cinco mililitros de cada cultura foram transferidos para 50 mL de meio mínimo M9 com camada de 10 mL de vaselina e incubado a 37ºC/24h. As culturas foram centrifugadas a 4000rpm a 4ºC/20min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10 mL de PBS [0,2M] pH 5,5. Procedeu-se nova centrifugação a 4000rpm a 4ºC/20min, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 5mL de PBS [0,2M] pH 5,5 acrescido de 0,01%KCN. A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121ºC e depois de fria filtrada em filtro Millex 0,2µm. O filtrado foi armazenado protegido da luz até ser submetido ao imunoensaio de quimiluminescência Immulite 1000 Siemens®.

4.4.2.2. Teste Immulite 1000 Siemens®

O Immulite 1000 é um sistema de quimiluminescência que detecta Vitamina B_{12} em um ensaio realizado por ligantes competitivos em fase sólida, totalmente automatizado. As amostras pré-tratadas são colocadas no microtubo de reação, o qual contém uma pérola recoberta por Vitamina B_{12}. Ao microtubo é adicionado fator intrínseco suíno (HIF) e anticorpo monoclonal marcado com fosfatase alcalina anti-HIF (anti-HIF MAb). A Vitamina B_{12} produzida pela bactéria e a Vitamina B_{12} da pérola competem pelo HIF. Uma fração da enzima marcada no anti-HIF MAb torna-se complexada com HIF que se liga a Vitamina B_{12} da pérola. O substrato quimiluminescente é adicionado e hidrolisado na presença da enzima marcada. Esta reação gera um resultado que está inversamente relacionado com a concentração de Vitamina B_{12} presente na amostra. O anti-HIF MAb usado neste ensaio é especialmente produzido e selecionado para ligar-se ao HIF, sem interferência posterior de ligar-se à Vitamina B_{12}.

V. **RESULTADOS**

5.1. Preparo das cepas mutantes

Os eletroforagramas a seguir, compreendem os genes alterados presentes nas cepas construídas neste trabalho. Foram obtidos mutantes de *Salmonella* Gallinarum (figuras 4 e 5), de *Salmonella* Enteritidis (Figura 6) contendo os genes *cob*S e *cbi*A alterados, mutantes de *Salmonella* Pullorum com deleção individual (figuras 7 e 8) e mutantes de *Salmonella* Pullorum com deleção dupla (figuras 9 e 10). Em todas as figuras consta também a cepa selvagem de *Salmonella* com o gene original.

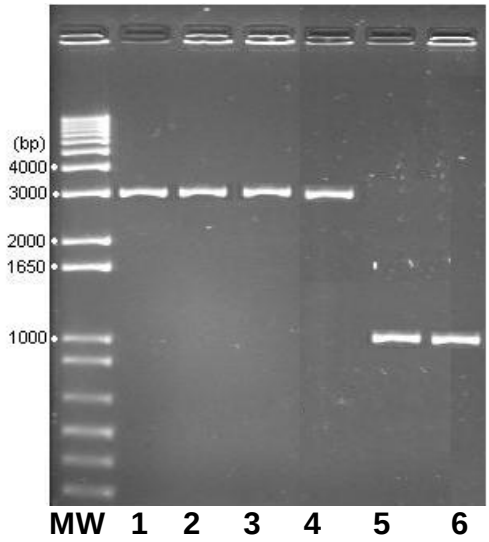

Figura 4: Eletroforograma em agarose 1%. MW: marcador de tamanho molecular (1Kb plus DNA Ladder Gibco). Bandas 1 a 4: fragmento Δ*cob*S Spec^r de SG Nal^r (2964bp). Bandas 5 e 6: fragmento *cob*S (original) de SG Nal^r (994bp).

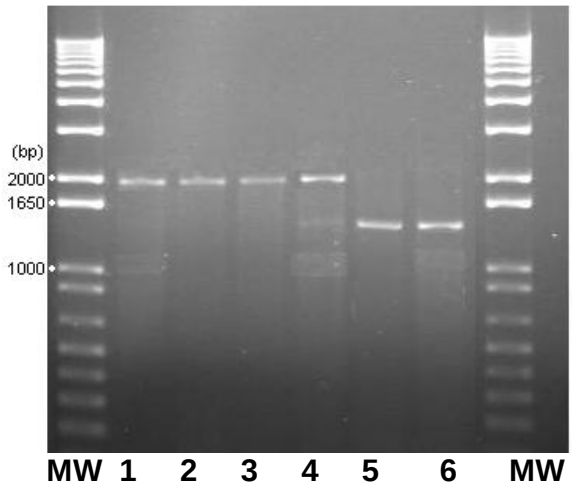

Figura 5: Eletroforograma em agarose 1%. MW: marcador de tamanho molecular (1Kb plus DNA Ladder Gibco). Bandas 1 a 4: fragmento Δ*cbi*A Kan^r de SGNal^r (1930bp). Bandas 5 e 6: fragmento *cbi*A (original) de SG Nal^r (1360).

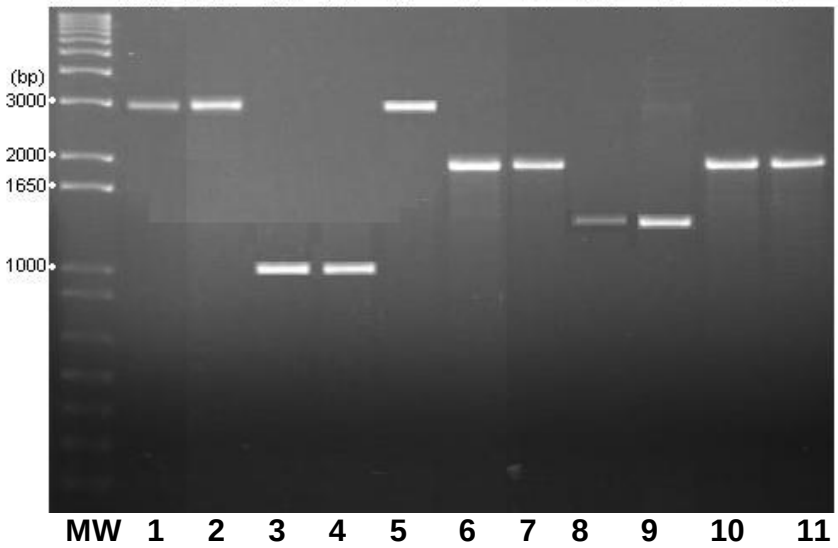

Figura 6: Eletroforograma em agarose 1%. MW: marcador de tamanho molecular (1Kb plus DNA Ladder Gibco). Bandas 1 e 2: fragmento Δ*cob*S Spec^r de SE Nal^r (2964bp). Bandas 3 e 4: fragmento *cob*S (original) de SE Nal^r (994bp). Banda 5: Controle positivo com STM F98 Δ*cob*S Spec^r (2964bp). Bandas 6 e 7: fragmento Δ*cbi*A Kan^r de SE Nal^r (1930bp). Bandas 8 e 9: fragmento *cbi*A (original) de SE Nal^r (1360bp). Banda 10 e 11: Controle positivo com STM F98 Δ*cbi*A Kan^r (1930bp).

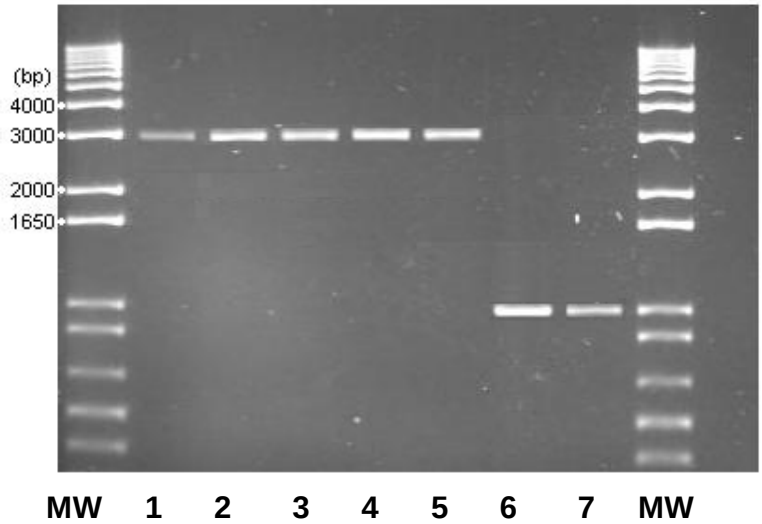

Figura 7: Eletroforograma em agarose 1%. MW: marcador de tamanho molecular (1Kb plus DNA Ladder Gibco). Bandas 1 a 5: fragmento Δ*cob*S Spec^r de SP Nal^r (2964bp). Bandas 6 e 7: fragmento *cob*S (original) de SP Nal^r (994bp).

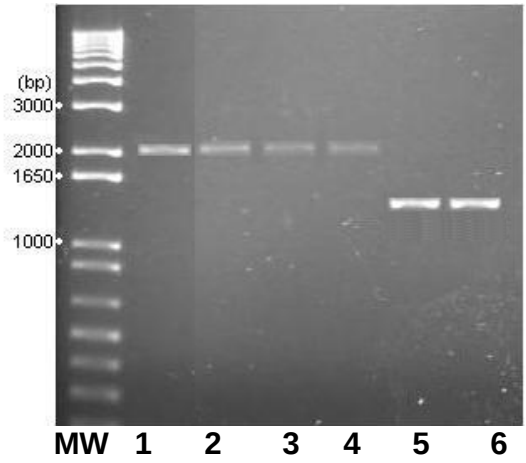

Figura 8: Eletroforograma em agarose 1%. MW: marcador de tamanho molecular (1Kb plus DNA Ladder Gibco). Bandas 1 a 4: fragmento Δ*cbi*A Kan^r de SP Nal^r (1930bp). Bandas 5 e 6: fragmento *cbi*A (original) de SG Nal^r (1360bp).

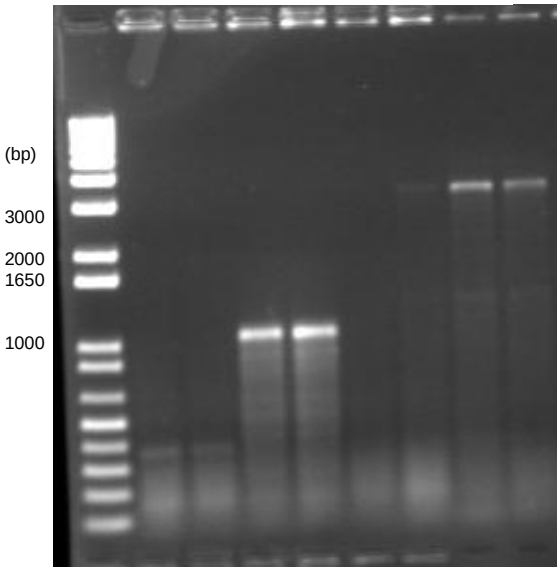

Figura 9: Eletroforograma em agarose 1%. MW: marcador de tamanho molecular (1Kb plus DNA Ladder Gibco). Bandas 6 a 8: fragmento Δ*cob*S Spec^r de SP Nal^r Δ*cob*SΔ*cbi*A (2964bp). Bandas 3 e 4: fragmento *cob*S (original) de SP Nal^r (994bp).

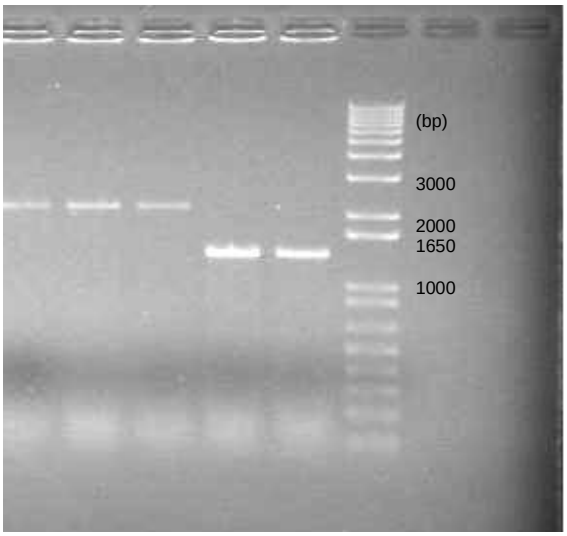

Figura 10: Eletroforograma em agarose 1%. MW: marcador de tamanho molecular (1Kb plus DNA Ladder Gibco). Bandas 1 a 3: fragmento Δ*cbi*A Kan^r de SP Nal^r Δ*cob*SΔ*cbi*A (1930bp). Bandas 4 e 6: fragmento cbiA (original) de SP (1360bp).

5.2. Resultados *in vivo*

5.2.1. *Salmonella* Gallinarum

A mortalidade causada por SG Δ*cob*S e/ou Δ*cbi*A foi avaliada (Tabela 1). Nos grupos nos quais as aves foram desafiadas com culturas contendo $5{,}0 \times 10^8$UFC/mL, a mortalidade acarretada pelas cepas contendo mutações simples foi similar à apresentada pelo grupo controle (SGNal^r) ($p>0{,}05$). Nenhuma mortalidade foi observada nas aves desafiadas com SG Δ*cob*SΔ*cbi*A ($p<0{,}05$). Nos grupos de aves desafiadas com cultura contendo $5{,}0 \times 10^6$UFC/mL as cepas com mutações simples provocaram maior mortalidade que a apresentada pelo grupo controle ($p<0{,}05$).

A Figura 11 dispõe os resultados da presença de SGNal^r e SG Δ*cob*SΔ*cbi*A em fígado e baço de aves avaliadas por 28 dias pós-infecção (dpi). Cinco aves de cada grupo foram inspecionadas aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi. A quantidade de SG Δ*cob*SΔ*cbi*A encontrada no fígado e baço das aves foram muito inferiores e declinaram muito rapidamente quando comparadas às contagens de SGNal^r obtidas ($p<0{,}05$).

Tabela 1. Mortalidade de aves para postura comercial, variedade vermelha, desafiadas experimentalmente no quinto dia de vida com cultura de SGΔ*cob*SΔ*cbi*A, SGΔ*cob*S, SGΔ*cbi*A em comparação com a cepa SGNal^r.

Cepa	Dose UFC/mL	Mortalidade cumulativa em dias pós-infecção															Total	
		5	6	7	8	9	10	11	15	20	21	23	24	28	29	30	Nº/total*	%
SGΔ*cob*S Δ*cbi*A	10^8																0/30**a**	0
	10^6																0/30**a**	0
SGΔ*cob*S	10^8	6	18	20	23	24	25	26	29								29/30**b**	96,67
	10^6	1	6	9			10	11	12	13	14	15	16	19	25	29	29/30**a**	96,67
SGΔ*cbi*A	10^8	10	25		26	28	29		30								30/30**b**	100
	10^6	9	14	18			19	21	23	24		25	26	27	28		28/30 **a**	93,33
SG Nal^r	10^8	9	21	25				26									26/27**b**	96,30
	10^6	5	6	9	10	11			12	13	14	23			18	20	20/31**b**	64,5

*Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna, considerando a mesma dose diferem estatisticamente (χ^2, $p<0,05$)

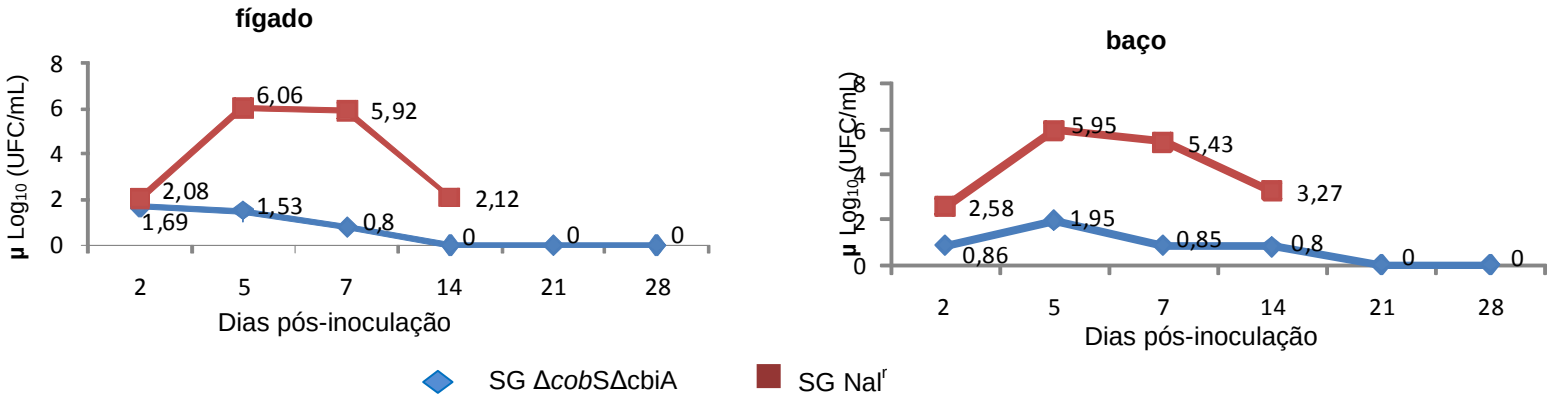

Figura 11: Média (Log_{10}) do número de células viáveis de *Salmonella* Gallinarum em fígado e baço de aves para postura comercial, variedade vermelha, inoculadas no quinto dia de vida com cultura de SGΔ*cob*SΔcbiA ou de SGNal^r .

5.2.2. *Salmonella* Enteritidis

A mortalidade causada por SE Δ*cob*S e /ou Δ*cbi*A, foi avaliada (Tabela 2). A mortalidade causada pelas cepas de SEΔ*cob*S, SEΔ*cbi*A e SEΔ*cob*SΔ*cbi*A, foi similar a acarretada por SENal^r para ambas as variedades de aves de postura comercial avaliadas ($p>0,05$).

A excreção fecal de SE Δ*cob*SΔ*cbi*A e SENal^r foi acompanhada mediante suabes cloacais realizados duas vezes por semana (Tabela 3). A excreção fecal de SE Δ*cob*SΔ*cbi*A foi superior à excreção fecal de SENal^r nas duas variedades de aves para postura comercial avaliadas ($p<0,05$).

As figuras 12 e 13 dispõe os resultados relativos á presença de SEΔ*cob*SΔ*cbi*A e SENal^r em fígado, baço e conteúdo cecal de aves inspecionadas. As contagens de SE Δ*cob*SΔ*cbi*A e SENal^r encontradas no fígado e baço das aves foram similares ($p>0,05$). À semelhança das observações relativas á excreção fecal, maiores contagens de SEΔ*cob*SΔ*cbi*A foram encontradas no conteúdo cecal de aves de ambas as variedades avaliadas, quando compradas as contagens de SENal^r, no entanto, houve significado estatístico apenas para as médias do 5º e 14º dpi, para as aves de postura comercial variedade vermelha ($p<0,05$).

Tabela 2. Mortalidade de aves para postura comercial, variedades branca (B) e vermelha (V) desafiadas experimentalmente no primeiro dia de vida com cultura de SE Δ*cob*SΔ*cbi*A, SE Δ*cob*S, SEΔ*cbi*A em comparação com a cepa SENal^r.

Cepa	Variedade	mortalidade**#	%	Suabes positivos*	
				Fígado#	Conteúdo cecal#
SEΔ*cob*SΔ*cbi*A	B	1**a**	5	2**a**	19**a**
	V	2**b**	10	5**b**	18**b**
SEΔ*cob*S	B	0**a**	0	1**a**	19**a**
	V	3**b**	15	5**b**	17**b**
SEΔ*cbi*A	B	0**a**	0	1**a**	20**a**
	V	2**b**	10	12**c**	18**b**
SENal^r	B	0**a**	0	1**a**	18**a**
	V	2**b**	10	6**b**	18**b**

**Grupos de 20 aves* Aves restantes sacrificadas no 21º dpi para inspeção de fígado e conteúdo cecal. #Números seguidos de letras diferentes, para aves da mesma linhagem diferem entre si (χ^2, $p<0.05$).

Tabela 3. Inspeção da cloaca de aves comerciais para postura, desafiadas experimentalmente no primeiro dia de vida com cultura de SE Δ*cob*SΔ*cbi*A e SENal^r, mediante a utilização de suabe.

	Aves de variedade branca						Aves de variedade vermelha					
Cepas	SEΔ*cob*SΔ*cbi*A			SENal^r			SEΔ*cob*SΔ*cbi*A			SENAl^r		
Dpi	**D**	**E**	**T**	**D**	**E**	**T**	**D**	**E**	**T**	**D**	**E**	**T**
1	1	1	1	2	2	4	1	0	1	1	4	5
3	7	5	12	2	2	4	26	1	27	8	7	15
7	13	4	17	18	4	22	22	2	24	13	1	14
10	15	15	30	16	9	25	11	15	26	11	10	21
14	19	8	27	11	4	15	22	3	25	15	6	21
17	0	15	15	2	9	11	5	8	13	7	8	15
21	10	2	12	2	6	8	2	6	8	5	6	11
24	6	7	13	3	0	3	4	2	6	6	3	9
28	7	4	11	0	6	6	2	8	10	2	5	7
TOTAL*			138**a**			98**b**			140**a**			118**b**

dpi: dias pós-inoculação; D: resultado positivo no plaqueamento direto; E: resultado positivo após eriquecimento; T: D+E; * Letras diferentes indicam diferença estatística para cada variedade de aves (χ^2, $p<0.05$).

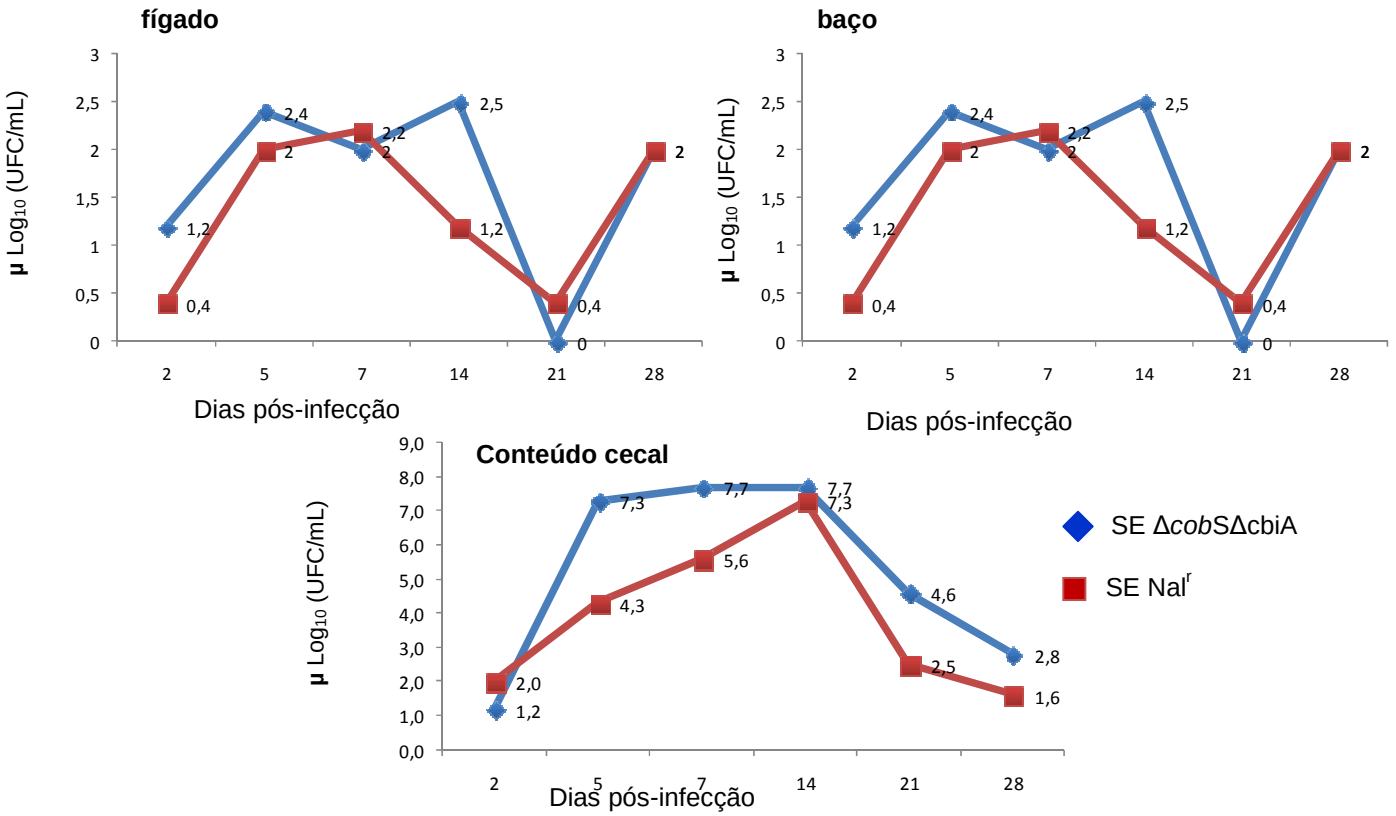

Figura 12: Média (Log_{10}) do número de células viáveis de *Salmonella* Enteritidis em fígado, baço e conteúdo cecal de aves para postura comercial, variedade branca, inoculadas no primeiro dia de vida com cultura de SEΔ*cob*SΔcbiA ou SENal^r .

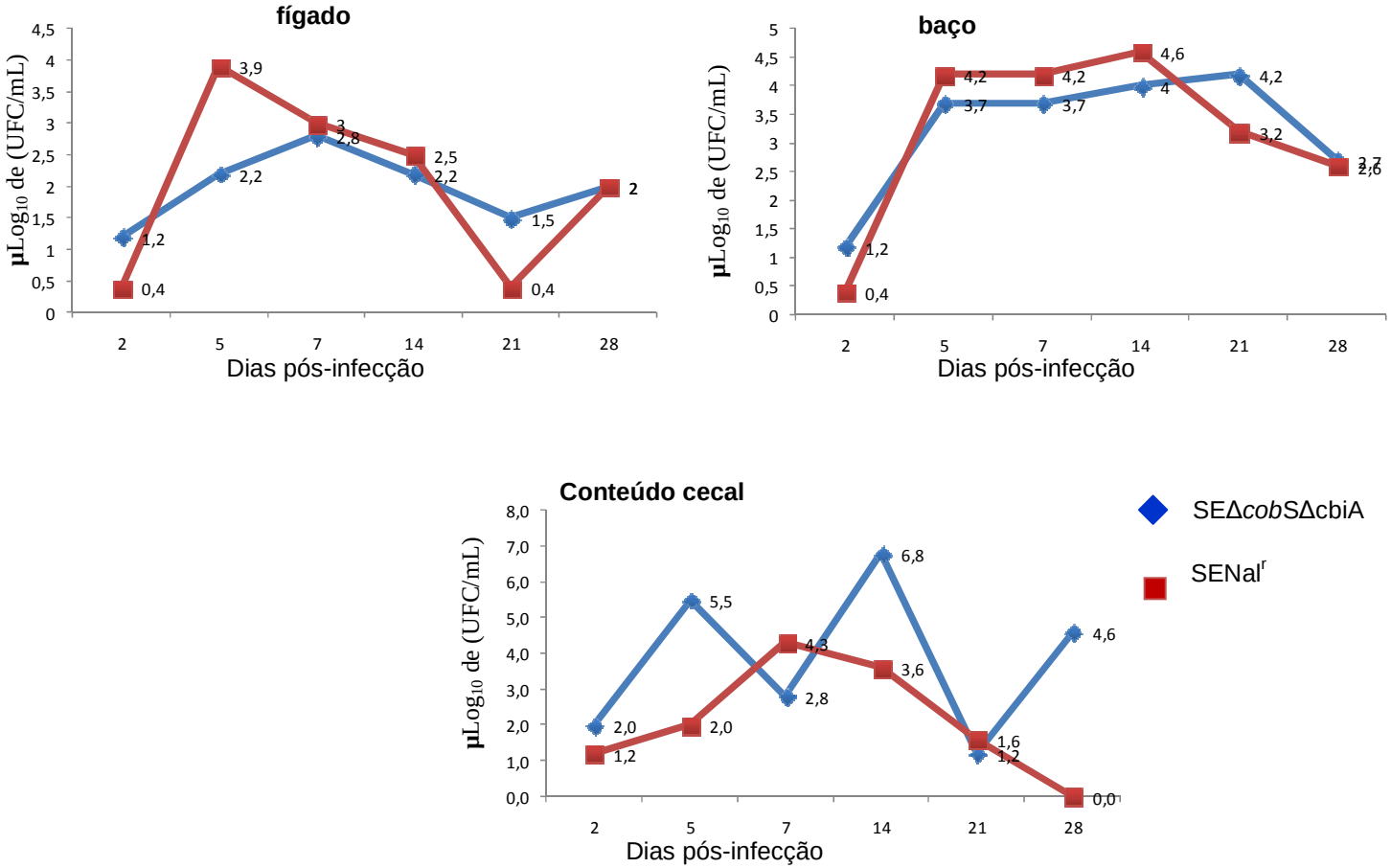

Figura 13: Média (Log_{10}) do número de células viáveis de *Salmonella* Enteritidis em fígado, baço e ceco de aves para postura comercial, variedade vermelha, inoculadas no primeiro dia de vida com cultura de SEΔ*cob*SΔ*cbi*A ou a SENal^r .

5.2.3. *Salmonella* Pullorum

A mortalidade causada por SP Δ*cob*S e /ou Δ*cbi*A, foi avaliada (Tabela 4). A mortalidade causada pelas cepas com alterações simples e dupla foi similar a acarretada por SPNal^r ($p>0,05$).

Na Figura 14, estão os dados referentes à presença de SP Δ*cob*SΔ*cbi*A e SPNal^r em fígado, baço e conteúdo cecal de aves inspecionadas por 28 dpi. Não houve diferenças ($p>0,05$) na quantidade de SPΔ*cob*SΔ*cbi*A em relação à quantidade de SP Nal^r em nenhum dos órgãos analisados.

Tabela 4. Mortalidade de aves para postura comercial, variedade vermelha, desafiadas experimentalmente no primeiro dia de vida com cultura de SPΔ*cob*SΔ*cbi*A, SPΔ*cob*S, SPΔ*cbi*A e SPNal^r.

Cepa	Mortalidade acumulativa em dias pós-infecção																					
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	21	22	25	26	28	Total	
																					Nº/total*	%
SPΔ*cob*S Δ*cbi*A	1		2	3	4	5			7	10	11	12					13	14			14/30 **a**	70
SPΔ*cob*S				1	3	4	6		8		9	10	11		12			13	14		14/30 **a**	70
SPΔ*cbi*A		11	16	18		19															19/30 **a**	95
SPNal^r		1		5	8	10	12			13							14		16		16/30 **a**	80

*Números seguidos letras diferentes diferem entre si (χ^2, $p<0.05$).

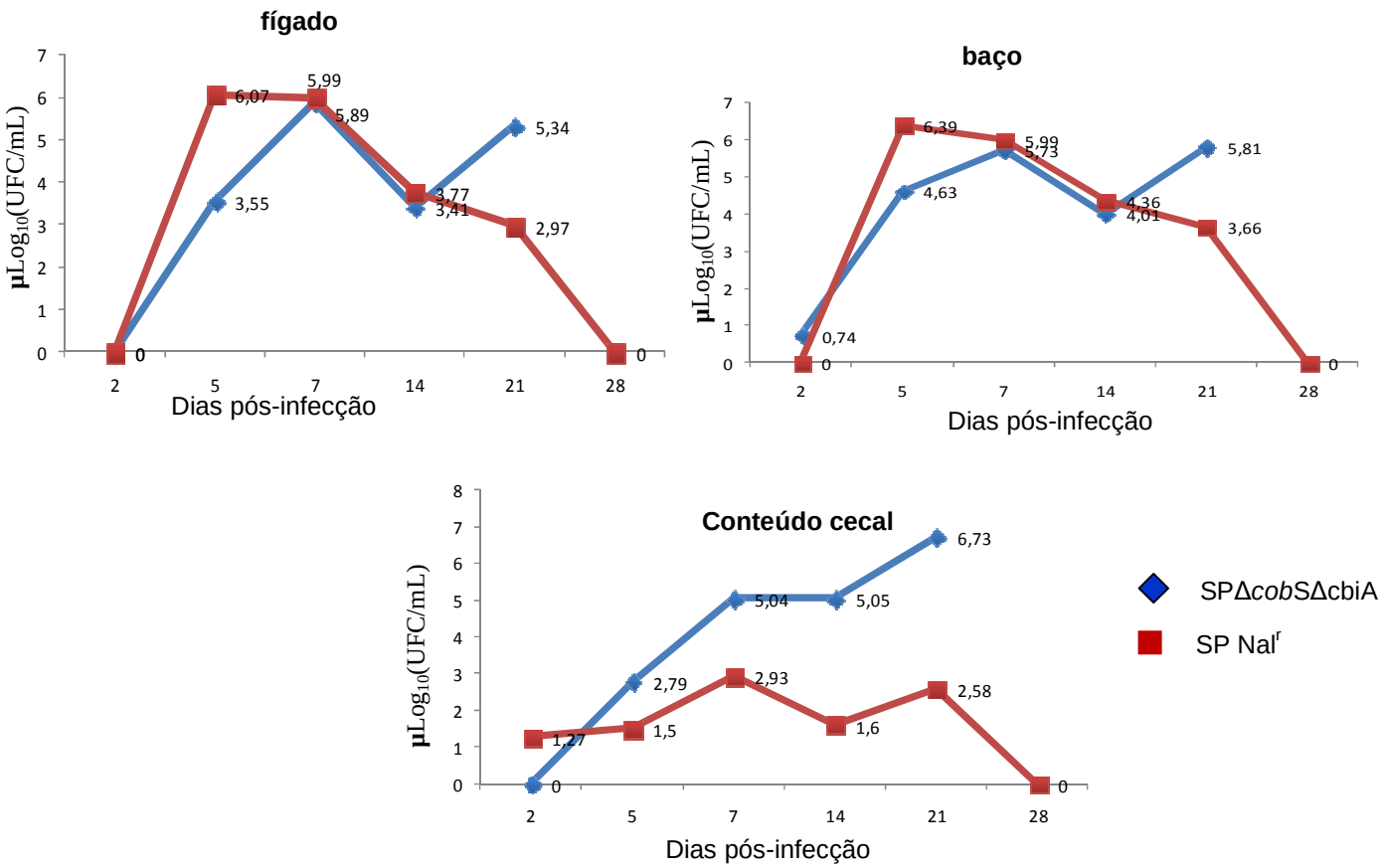

Figura 14: Média (Log_{10}) do número de células viáveis de *Salmonella* Pullorum em fígado, baço e conteúdo cecal de aves para postura comercial, variedade vermelha, inoculadas no primeiro dia de vida com cultura de SPΔ*cob*SΔcbiA ou SPNal^r .

5.3. Detecção de vitamina B_{12}.

5.3.1. Método quantitativo

A Tabela 5 dispõe dados quantitativos da produção de cobalamina por SEΔ*cob*SΔ*cbi*A, STMΔ*cob*SΔ*cbi*A, SE Nal^r e STM Nal^r, utilizando-se o teste Immulite 1000 Siemens®. As cepas Δ*cob*SΔ*cbi*A não produziram B_{12} detectável pelo teste utilizado, uma vez que apresentaram valores inferiores a 150pg/mL, limite inferior de detecção do Immulite 1000. SE Nal^r e STM Nal^r produziram B_{12} em quantidade detectável, sendo que SE Nal^r apresentou limiar de produção de B_{12} superior ao de STM Nal^r.

Tabela 5. Quantificação de vitamina B_{12}, produzida por *Salmonella*, pelo teste Immulite 1000 Siemens®

Amostra	Repetição	Dosagem (pg/mL)	Média (pg/mL)
SE Nal^r	T1	362	377,3
	T2	352	
	T3	418	
SEΔ*cob*SΔ*cbi*A	T1	<150	<150
	T2	<150	
	T3	<150	
STM Nal^r	T1	262	241
	T2	261	
	T3	200	
STMΔ*cob*SΔ*cbi*A	T1	<150	<150
	T2	<150	
	T3	<150	
SP Nal^r	T1	152	154
	T2	150	
	T3	160	
SPΔ*cob*SΔ*cbi*A	T1	<150	<150
	T2	<150	
	T3	<150	
SG Nal^r	T1	<150	<150
	T2	<150	
	T3	<150	
SGΔ*cob*SΔ*cbi*A	T1	<150	<150
	T2	<150	
	T3	<150	

4.3.2. Método qualitativo

Nas figuras 15, 16, 17 e 18 estão as fotos onde se observa o crescimento das cepas de SEΔ*cob*SΔ*cbi*A, STMΔ*cob*SΔ*cbi*A, SPΔ*cob*SΔ*cbi*A, SGΔ*cob*SΔ*cbi*A, SENal^r, STMNal^r, SPNal^r e SGNal^r em Agar de MacConkey 1,2-Pd . Colônias de SEΔ*cob*SΔ*cbi*A, STMΔ*cob*SΔ*cbi*A, SPΔ*cob*SΔ*cbi*A, SGΔ*cob*SΔ*cbi*A e SGNal^r apresentaram coloração palha evidenciando incapacidade de degradação de 1,2 propanediol (1,2Pd) a ácido propiônico, pela ausência de cobalamina. As colônias de SE Nal^r, STM Nal^r, SP Nal^r apresentaram coloração vermelha evidenciando degradação de 1,2Pd pela presença de cobalamina sintetizada pela bactéria.

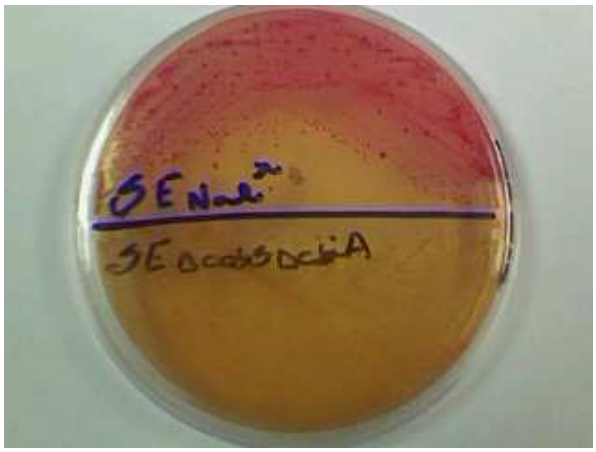

Figura 15. Cultivo da linhagem de SENal^r produtora de vitamina B_{12} e SENal^r Δ*cob*SΔ*cbi*A com a via de biossintese de B_{12} inviabilizada pelas mutações geradas em dois genes do operon *cob*.

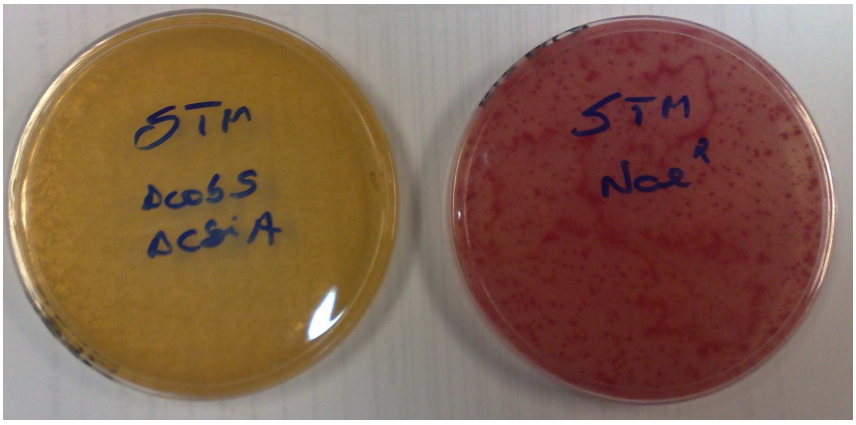

Figura 16. Cultivo da linhagem de STM Nal^r produtora de vitamina B_{12} e STM Nal^r Δ*cob*SΔ*cbi*A com a via de biossintese de B_{12} inviabilizada pelas mutações geradas em dois genes do operon *cob*.

Figura 17. Cultivo da linhagem de SP Nal^r produtora de vitamina B_{12} e SP Nal^r Δ*cob*SΔ*cbi*A com a via de biossintese de B_{12} inviabilizada pelas mutações geradas em dois genes do operon *cob*.

Figura 18. Cultivo da linhagem de SG Nal^r cepa selvagem e SG Nal^r Δ*cob*SΔ*cbi*A com a via de biossintese de B_{12} inviabilizada pelas mutações geradas em dois genes do operon *cob*.

VI. DISCUSSÃO

Os genes para sintese *de novo* de cobalamina por *Salmonella* Typhimurium, estão localizados em um único operon, composto de 20 genes, 17 destes genes correspondem a genes *cbi* (A-P) e os 3 genes restantes correpondem ao genes *cob*UST. Dentro deste operon os genes estão agrupados em três grupos de acordo com a parte da via biossintetica em que atuam. Mutações nestes grupos de genes conferem três fenótipos diferentes: CobI$^-$ (genes *cbi* afetados) estes mutantes mantêm a habilidade de sintetizar vitamina B_{12} se o precursor Cobinamida (Cbi) for suprido; CobII$^-$ (gene *cob*T afetado), mutantes na porção II da via podem sintetizar vitamina B_{12} se o precursor Dimetilmensimidazole (Dmb) for suprido; e CobIII$^-$ (genes *cob*U e *cob*S afetados), estes mutantes perdem a capacidade de ligar Cbi e Dmb e falham na síntese de vitamina B_{12} mesmo que ambos os precursores estejam presentes (JETER & ROTH, 1987, ESCALANTE-SEMERENA *et al*., 1992).

A enzima CbiA cataliza o primeiro passo na sintese de Adenosilcobinamida em *S.*Typhimurium e é responsável por regulação transcricional e traducional do operon *cob*, sendo considerada uma enzima chave na via biossintética de cobalamina (Fresquet *et al*., 2004). A enzima CobS é a única enzima da via com localização na membrana celular e cataliza o último passo da síntese de Adenosilcobinamida (Maggio-Hall *et al*., 2004). Desta forma, cepas de S*almonella* Δ*cob*SΔ*cbi*A são incapazes de sintese de cobalamina. Esta incapacidade foi confirmada através de ambos os ensaios empregados, Agar de MacConkey 1,2-Pd e Immulite.

Salmonella Typhimurium sintetiza cobalamina *de novo* apenas em anaerobiose (JETER *et al*., 1984). Alguns pesquisadores têm extendido esta habilidade a todos os sorotipos de *Salmonella* (ROTH *et al*., 1996; PRICE-CARTER *et al*., 2001). Neste estudo nós demonstramos através de dois testes que *Salmonella* Gallinarum não sintetizou cobalamina *in vitro* sobre condições anaeróbicas. No entanto, *S.* Gallinarum mostrou requerer o cofator durante a infecção de aves. A cepa de *S*. Gallinarum

Δ*cob*SΔ*cbi*A não causou nenhuma mortalidade, tornou-se avirulenta para aves nas duas concentrações de inóculo utilizadas, enquanto que a cepa selvagem causou mortalidade de até 80% das aves. O potencial de invasão e multiplicação em órgãos da cepa de *S*. Gallinarum Δ*cob*SΔ*cbi*A também mostrou-se diminuído ($p<0,05$). Diante destes resultados podemos postular que o operon *cob* opere apenas *in vivo*, durante a infecção das aves, ou que os genes *cob* nunca são induzidos para a sintese *de novo*, mas que atuem regulando genes de virulência. Esta ultima hipótese é suportada pelos dados do sequenciamento do genoma da *Salmonella* Gallinarum cepa 287/91 a qual mostrou perda na função de genes relacionados à síntese de cobalamina (*poc*R, *cob*D, *cbi*D, *cbi*C, *cbi*O) e utilização de propanediol (*pdu*G e *pdu*O). Acúmulo de pseudogenes relativos ao operon *cob* e *pdu* foi independentemente demontrado em *S.* Typhi, outro sorotipo hospedeiro-específico (THOMSON *et al*., 2008).

As reações conhecidamente dependentes de cobalamina como cofator em *S.* Typhimurium não justificam o largo investimento genético na biossintese e transporte da vitamina B_{12}. A enzima metionina sintetase (MetH) é redundante e a enzima queosina sintetase é demonstradamente não essencial. A utilização de propanediol (1,2-Pd) aparece, por tanto, como utlidade primária para a cobalamina em *S.* Typhimurium (JETER, 1990).

Propanediol é uma fonte de carbono e energia útil e disponível no trato gastrointestinal de aves e mamíferos, pois é produzido durante o catabolismo anaeróbico de duas pentoses muito comuns, rhamnose e fucose, encontradas em glicoconjugados do epitélio intestinal e parede de células vegetais (OBRADORS *et al*., 1988). Propanediol é util como fonte única de carbono e energia somente na presença de oxigênio, ou um aceptor de elétrons alternativo, no entanto, a cobalamina é sintetizada *de novo* apenas sobre condições anaeróbicas de crescimento (JETER, 1990) e nitrato ou fumarato não atuam como aceptor alternativo de elétrons para 1,2-Pd. Tetrationato pode desempenhar esta função, mas a real disponibilidade dele para *S.* Typhimurium no hospedeiro não está clara (PRICE-CARTER *et al*., 2001). Na

ausência de oxigênio e um aceptor externo, 1,2-Pd atuaria apenas como fonte pobre de energia fornecendo 1ATP por cada molécula, e nenhuma fonte de carbono.

A habilidade para degradar 1,2-Pd confere vantagem seletiva em nichos anaeróbios como o trato gastrointestinal do hospedeiro e o interior de macrofagos (LIN, 1987, OBRADORS *et al*., 1988). Evidências estão disponiveis na literatura de que 1,2-Pd exerce papel na patogênese da *Salmonella*. Utilzando tecnologia de expressão *in vivo* (IVET) CONNER *et al* (1998) demonstraram que a degradação de 1,2-Pd foi importante para o crescimento da *S.* Typhimurium em tecidos do hospedeiro (modelo murino). Através de ensaios de índice de competitividade, HEITHOFF *et al*. (1999) verificaram que *pdu*, mas não *cob* confere defeito de virulência em *S.* Typhimurium. O locus *pdu* é localizado adjacente ao operon *cob,* ambos operons são controlados globalmente pelo mesmo sistema, aerobica e anaerobicamente, e ambos operons são induzidos por propanediol (BJÖRKMAN *et al*., 1996, CONNER *et al*., 1998). Deficiência na capacidade de invasão por STM contendo mutação no “cluster” *cob-cbi-pdu* foram observadas em camundongos, demonstrando que este “cluster” de genes aumenta a capacidade de sobrevivência intracelular da *Salmonella* (KLUMPP & FUCHS, 2007). A deleção dos genes Δ*cob*SΔ*cbi*A em *S.* Typhimurium reduziu parcialmente a patogenicidade da cepa em aves de corte, reduzindo pela metade a mortalidade de aves desafiadas com a cepa mutante em comparação à cepa selvagem (SIERRA *et al*., 2010).

Os resultados observados para *S.* Typhimurium Δ*cob*SΔ*cbi*A (SIERRA *et al*., 2010) e para *S.* Gallinarum Δ*cob*SΔ*cbi*A, as quais apresentaram atenução total e parcial, respectivamente, não se assemelham aos obtidos com os mutantes de *S.* Enteritidis e *S.* Pullorum Δ*cob*SΔ*cbi*A, os quais mostraram crescimento normal sobre condições aeróbias e anaeróbias, e ambos mantiveram a habilidade de colonizar o trato intestinal das aves e produzir infecção sistêmica tão eficientemente quanto a cepa selvagem ($p>0,05$). Em adição, a excreção fecal e a colonização cecal de *S.* Enteritidis Δ*cob*SΔ*cbi*A foi maior do que a provocada pela cepa de *S.* Enteritidis selvagem ($p<0,05$), demonstrando maior potencial de colonização intestinal pela cepa mutante.

S. Pullorum e *S.* Gallinarum são patógenos hospedeiro-específico de aves enquanto que a *S*. Enteritidis é um sorotipo que apresenta variedade de espécies hospedeiras. Esses três sorotipos apresentam diferenças principalmente quanto as caracteristicas de patogenicidade, embora sejam sorotipos monofiléticos (LI *et al*., 1993). A real importância da biossíntese de cobalmina para estes três sorovares não é clara, mas diferente. O estilo de parasitismo da *S*. Enteritidis em aves parece não requerer cobalamina. *S.* Pullorum e *S.* Gallinarum embora causem doenças com caracteristicas muito distintas são consideradas muito similares quanto ao relacionamento com a ave e comportamento fenotípico, diferenciando-se da *S*. Enteritidis facilmente (BERCHIERI JR & FREITAS NETO, 2009). No entanto, se considerarmos o requerimento de vitamina B_{12} *S*. Enteritidis e *S.* Pullorum mostraram-se muito similares entre si e muito diferentes da *S.* Gallinarum.

Determinações genéticas e fatores ambientais regulam coordenadamente a expressão dos genes induzidos *in vivo* (*ivi*), genes os quais, são expessos pobremente ou não expressos em meios de cultivo, mas altamente expressos em tecidos hospedeiros. O sítio hospedeiro nos quais *ivi* são expressos provê sinais para os microrganismos para possíveis funções de *ivi* nestes locais específico. A função de alguns desses genes podem mudar dependendo do contexto do animal, orgão, tipo celular ou compartimento subcelular parasitado. Em relação ao operon *cob* podemos verificar através deste trabalho que estes sinais foram úteis para *S.* Gallinarum, mas não para outros sorotipos de *Salmonella*. Sabidamente, sinais específicos na tonsila de suínos induzem o operon *cob* de *S*. Typhimurium, como um requerimento para sobrevivência na tonsila ou como um prelúdio para a passagem para dentro do trato intestinal (HUANG *et al*., 2007). RYCHLIK & BARROW (2005) estudaram genes e proteínas centrais para enfrentar o estresse envolvido nos mecanismo de colonização intestinal na infecção por *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium e afirmaram que esses mecanismos não necessariamente são representativos para outros sorotipos.

Muitos estudos comparativos entre *S.* Gallinarum e outros sorotipos de *Salmonella* têm mostrado diferenças em mecanismos celulares responsáveis por

especificidade e adaptabilidade da *S.* Gallinarum ao hospedeiro (WALLIS *et al*., 1999, WILSON *et al*., 2000, KAISER *et al*., 2000, WIGLEY *et al*., 2002, CHADFIELD *et al*., 2003). A especialização microbiana é acompanhada de perda ou aquisição de genes as quais permitem ao microrganismo ocupar determinado nicho. Dentro do contexto da patogênese estas sequencias adquiridas ou perdidas favorecem o surgimento de um novo estilo na natureza e compreenderão funções favoráveis ao organismo no dado ambiente. A adaptação ao hospedeiro, é concomitante com extensiva deleção de genes (BOYD *et al*., 2003) e a aquisição de requerimentos nutricionais complexos como observado para outros sorotipos adaptados a um único hospedeiro, como a *S*. Typhi. O glicogenio, por exemplo, tem um complexo papel na sobrevivência da *Salmonella* através do prolongamento da infectividade em sorotipos que apresentam capacidade de parasitar uma variedade de hospedeiros, e um papel menor na virulência e colonização destes sorotipos (MCMEECHAN *et al*., 2005). *S.* Gallinarum e *S.* Pullorum não estocam glicogenio sobre condições testes (JIN *et al*., 2005). A perda da capacidade de sintetizar glicogênio é um exemplo de acumulação de pseudogene por patógenos hospedeiro-específico e indicativo de que esta função não é mais requerida devido à especialização de nicho.

Salmonella enterica é a única especie bacteriana que inclui exemplos de ambos patotipos, promíscuos e adaptados. Há um consenso entre os pesquisadores de que deve haver pressão de seleção para manutenção da síntese de vitamina B_{12} e esta deve variar com a forma de parasitismo do organismo. *Escherichia coli* não apresenta operon *cob* completo e parece pertencer a um nicho no qual a sintese *de novo* de cobalamina não é necessária. *Porphyromonas gengivalis* parece ter perdido a habilidade de sintetizar B_{12} e grupos heme, por ocupar um nicho rico nestes nutrientes, nesta espécie, a ausência de pressão de seleção para manter a síntese destes nutrientes, fez com que muitos genes do ramo dos tetrapirroís fossem perdidos dando lugar a um elaborado sistema de absorção (ROPER *et al*., 2000). Mas, em *S*. Enteritidis e *S*. Typhimurium a habilidade de sintetizar B_{12} deve ser fortemente selecionada para que o operon ainda se mantenha com todos os genes ativos. Quanto

a *S.* Pullorum, esta não teve seu genoma seqüenciado até o momento, de forma, que nada podemos inferir sobre os genes do operon *cob*.

Se faz necessário buscar pelo momento em que o operon c*ob* é induzido (e se é induzido) em *S*. Enteritidis, *S*. Typhimurium, *S.* Gallinarum e *S.* Pullorum, para que assim tenhamos uma idéia sobre a real importância da cobalamina, se esta é usada para invasão, colonização, multiplicação, sobrevivência no macrófago ou evasão da resposta imune.

VII. CONCLUSÕES

Dentro do modelo experimental adotado, concluiu-se que:

— Os mutantes de *Salmonella* Gallinarum, Pullorum e Enteritidis construídos são incapazes de sitetizar cobalamina *in vitro* em anaerobiose.

— A deleção dos genes *cob*S e *cbi*A tornou a cepa de *Salmonella* Gallinarum avirulenta para as aves.

— A deleção dos genes *cob*S e *cbi*A em *Salmonella* Enteritidis e Pullorum não alterou a relação parasita-hospedeiro destes sorotipos com as aves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AILION, M.; BOBIK, T.A.; ROTH, J.R. Two global regulatory systems (Crp and Arc) control the cobalamin/propanediol regulon of Salmonella typhimurium. **J. Bacteriol.,** v. 175, n. 2, p. 7200–7208, 1993.

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) folate deficiency. **FASEB J**., v. 7, p. 1344–1353, 1993.

ANDERSON, P. J., J. LANGO, C. CARKEET, A. BRITTEN, B. KRÄUTLER, B. D. HAMMOCK, AND J. R. ROTH. One pathway can incorporate either adenine or dimethylbenzimidazole as an α-axial ligand of B_{12} cofactors in Salmonella enterica. **J. Bacteriol**., v. 190:1160-1171, 2007.

BAJAJ, V.; LUCAS, R.L.; HWANG, C.; LEE. C.A. Co-ordinate regulation of Salmonella typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression. **Mol. Microbiol**., v. 22, p. 703-714, 1996.

BAKER, C.S.; MOROZOV, I.; SUZUKI, K.; ROMEO, T.; BABITZKE, P. CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC. Escherichia coli*. **Mol Microbiol**., v. 44, p.1599–1610, 2002.

BANERJEE, R.; RAGSDALE, S.W.; The many faces of vitamin B_{12}: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. **Ann. Rev. Biochem**., v. 72, p. 209–247, 2003.

BABIOR, B.M.: The role of vitamin K in clotting factor synthesis. I. Evidence for the participation of vitamin K in the conversion of a polypeptide precursor to factor VII. **Bioch. Bioph. Acta**., v. 123, p. 606-610, 1966.

BARKER, H.A.; WEISSBACH, H.; SMYTH, R.D. A coenzyme containing pseudovitamin B12. **Proc Natl Acad Sci USA**., v. 44, p. 1093–1097, 1958.

BARROW, P.A. Salmonella infection: immune and non-immune protection with vaccines**. Avian Pathol**., v. 36, p.1-13, 2007.

BARROW, P.A. The paratyphoid salmonellae. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizootic.,** v. 19, p. 351-75, 2000.

BARROW, P.A.; HUGGINS, M.B.; LOVELL, M.A. Host specificity of Salmonella infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infect Immun**., v. 62, p. 4602-4610, 1994.

BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathol.,** v.20, p. 145-153, 1991.

BARROW, P.A.; SIMPSON, J.M.; LOVELL M.A.; BINNS, M.M. Contribution of Salmonella gallinarum large plasmid toward virulence in fowl typhoid. **Infect Immun**., v. 55, p. 388-392, 1987.

BARROW, P.A.; WALLIS, T.S. Vaccination against Salmonella infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In C. Wray (Ed.), Salmonella in Domestic Animals, 1st edn. Oxford: CAB International, p. 323-339, 2000.

BATTERSBY, A.R. How nature builds the pigments of life: the conquest of vitamin B12. **Science**, v. 264, p. 1551–1557, 1994.

BEACH, J. R.; DAVIS, D. E. Acute infection in chicks and chronic infection of the ovaries of hens caused by the fowl typhoid organisms. **Hilgardia**., v. 2, p. 411-424, 1927.

BEAL, R.K.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; HULME,S. D.; BARROW, P.A.; SMITH, A.L. Age at primary infection with Salmonella enteric serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and sub sequent immunityto re-challenge. **Vet. Immun. Immunopath**., v.100, p. 151-164, 2004.

BEAUDETTE, R.F. The possible transmission of fowl typhoid through the eggs. **J Am Vet Med Assoc**., v. 67, p. 741-745, 1925.

BEAUDETTE, R.F. Fowl typhoid and baccilary white diarrhea. In 11th Int Vet Congr. p. 705-723, 1930.

BLANCHE, F.; CAMERON, B.; CROUZET, J.; DEBUSSCHE, L.; THIBAUT, D.; VU ILHORGNE, M.; LEEPER, F.J.; BATTERSBY, A.R. Vitamin B12: wie das Problem seiner Biosynthese gelöst wurde. Angew Chem, v. 107, p. 421–452, 1995.

BENNER, S.A.; ELLINGTON, A.D.; TAUER, A. Modern metabolism as a palimpsest of the RNA world. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 86, p. 7054–58, 1989.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.). Doenças das aves. Campinas: FACTA, p.185-195, 2000.

BERCHIERI JR, 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 Pathol**. v.30, p. 221-231, 2001a.

BERCHIERI JR, A.; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C.K; BARROW, P.A. Further studies on vertical transmission and persistence of Salmonella enterica serovar Enteritidis phage type 4 in chicken. **Avian Pathol**. v. 30, p. 297-310, 2001b.

BERCHIERI JR. A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses aviárias. In: Berchieri Jr. A., E.N. Silva, J. Fabio, L. Sesti, M.A.F. Zuanaze. Doença das aves. 2nd ed. Facta. Campinas, p.435-451, 2009.

BJÖRKMAN, J.; RHEN, M.;. ANDERSON, D.I. Salmonella Typhimurium cob mutants are nor hyper-virulent. **FEMS Microbiol Lett**., v. 139, p.121-126, 1996.

BOBIK, T.A.; XU, Y.; JETER, R.M.; OTTO, K.M.; ROTH, J.R. Propanediol utilization genes (pdu) of Salmonella typhimurium: three genes for the propanediol dehydratase. **J. Bacteriol**., v. 179, p. 6633-6639, 1997.

BOBIK, T. A.; HAVEMANN, G.D.; BUSCH, R.J.; WILLIAMS, D.S.; ALDRICH, H.C. The propanediol utilization (pdu) operon of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B(12)-dependent 1, 2-propanediol degradation. **J. Bacteriol**., v. 181, p.5967-5975, 1999.

BOYD, E.F.; PORWOLLIK, S.; BLACKMER, F.; MCCLELLAND, M. Differences in gene content among Salmonella enterica serovar Typhi isolates. **J Clin Microbiol**., v. 41, p. 3823-3828, 2003.

BRADBEER, C. Cobalamin transport in Escherichia coli. **Biofactors**., v. 3, p.11–19, 1991.

BRADBEER, C.; KENLEY, J.S.; DI MASI, D.R.; LEIGHTON, M. Transport of vitamin B12 in Escherichia coli. Corrinoid specificities of the periplasmic B12-binding protein and of energy-dependent B12 transport. **J. Biol. Chem**., v. 253, p. 1347–52, 1978.

BRADBEER, C. The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in Escherichia coli. **J. Bacteriol**., v.175, p.3146–50, 1993.

BRADBEER, C.; GUDMUNDSDOTTIR, A. Interdependence of calcium and cobalamin binding by wild-type and mutant BtuB protein in the outer membrane of Escherichia coli. **J. Bacteriol**., v.172, p. 4919–26, 1990.

BRINSMADE, S.R.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. The eutD Gene of Salmonella enterica encodes a Protein with Phosphotransacetylase Enzyme **Act. J Bacteriol.**, v. 186, p. 1890-1892, 2004.

BRY, L.; FALK, P.G.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. A model of hostmicrobial interactions in an open mammalian ecosystem. **Science,** 273:1380-1383, 1996.

CADIEUX, N.; BRADBEER, C.; REEGER-SCHNEIDER, E.; KÖSTER,W.; MOHANTY A.K.; WIENER, M.C.; KADNER R.J. Identification of the Periplasmic Cobalamin-Binding Protein BtuF of *Escherichia coli* **J Bacteriol**., v. 184, p. 706-717, 2002.

CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; MSDOUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. Pullorum diseases and fowl typhoid. In: Shivaprassad HN, editor. Disease of poultry. 10th ed. Ames: Iowa State University Press, p. 220-228, 1997.

CHADFIELD, M.S.; BROWN, D.J.; AABO, S.; Christensen, J.P.; Olsen, J.E. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of Salmonella Gallinarum and other host-adapted Salmonella enterica serovars in the avian host. **Vet Microbiol**., v. 92, p. 49-64, 2003.

CHEN, P; ANDERSSON, D.I.; ROTH, J.R. The control region of the pdu/cob regulon in Salmonella typhimurium. **J. Bacteriol.,** v. 176, p. 5474-5482, 1994.

CHEN, P.; AILION, M.; BOBIK, T.; STORMO, G.; ROTH, J. Five promoters integrate control of the cob/pdu regulon in Salmonella typhimurium. **J. Bacteriol**., v.177, p. 5401–10, 1995.

CHEN P, AILION M, BOBIK T, STORMO G, ROTH J. Five promoters integrate control of the cob/pdu regulon in Salmonella typhimurium. **J. Bacteriol**., v. 177, p. 5401–10, 1995.

COGAN, T.A.; HUMPHREY, T.J. The rise and fall of Salmonella Enteritidis in the UK. **J. Appl Microbiol.**, v.94, p.114-119, 2003.

COLLARD, J.M.; BERTRAND, S.; DIERICK, K.; GODARD, C.; WILDEMAUWE, C.; VERMEERSCH, K.; DUCULOT, J.; VAN IMMERSEEL, F.; PASMANS, F.; IMBERECHTS, H.; QUINET, C. Drastic decrease of Salmonella Enteritidis isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence on foodborne outbreaks. **Epidemiol Infect**., v.36, p. 771-781. 2008.

CONNER, C.P.; HEITHOFF, D.M.; JULIO, S.M; SINSHEIMER, R.L.; MAHAN, M.J. Differential patterns of acquired virulence genes distinguish Salmonella strains. **Proc Natl Acad Sci USA**., v. 95, p. 4641-4645, 1998.

CORRIER, D.E.; HARGIS, B.M.; HINTON JR. A. et al. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistence of layer chickens to invasive Salmonella enteritides. **Avian Dis**., v.35, p.337-343, 1991.

CROFT, M.T.; LAWRENCE, A.D.; RAUX-DEERY, E.; WARREN, M.J.; SMITH A.G. Algae acquire vitamin B_{12} through a symbiotic relationship with bacteria. **Nature,** v. 438, p. 90-93, 2005.

DAVIES R.H.; WRAY C. Observations on disinfection regimens used on Salmonella enteritidis infected poultry units. **Poult. Sci**., v. 74, p. 638-647.

DI GIROLAMO, P.M.; BRADBEER, C. Transport of vitamin B12 in Escherichia coli. **J. Bacteriol**., v.106, p.745–50, 1971.

DIXON, M.; HUANG, S.; MATTHEWS, R.G.; LUDWIG, M.L. The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12. **Structure**, v. 4, p.1263–1275, 1996.

DRENNAN, C.; HUANG, S.; DRUMMOND, J.T.; MATTHEWS, R.G.; LUDWIG, M.L. How a protein binds B12: a 3.0A X-ray structure of B12-binding domains of methionine synthase. **Science,** v. 266, p.1669–1674, 1994.

DUDA J, PEDZIWILK Z, ZODROW K (1967) Studies on the vitamin B12 content of the leguminous plants. **Acta Microbiol Pol**., v. 6, p. 233–238, 1967.

DUNLAP, N.E., BENJAMIN, W.H.; MCGALL JR, R.D.; TILDEN, A.B.; BRILES,D.E. A “safe-site” for Salmonella typhimurium is within splenic cells during the early phase of infection in mice. **Microbial. Pathog**., v. 10, p.297-310, 1991.

ESCALANTE-SEMERENA, J.C.; SUH, S.J.; ROTH, J.R. cobA function is required for both de novo cobalamin biosynthesis and assimilation of exogenous corrinoids in Salmonella typhimurium**. J. Bacteriol**., v. 172, p. 273–80, 1990.

ESCALANTE-SEMERENA, J.C.; ROTH, J.R. Regulation of cobalamin biosynthetic operons in Salmonella typhimurium. **J.Bacteriol**., v. 169, p. 2251–58, 1987.

ESCALANTE-SEMERENA, J.C.; JOHNSON, M.G.; ROTH, J.R. The CobII and CobIII regions of the cobalamin (vitamin B_{12}) biosynthetic operon of Salmonella typhimurium. **J. Bacteriol**., v. 174, p. 24–29, 1992.

ESCHENMOSER, A. Vitamin B_{12}: experiments concerning the origin of its molecular structure. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl**., v. 27, p. 5–39, 1988.

FEBERWEE, A.; HARTMAN, E.G.; DE WIT, J.J.; DE VRIES, T.S. The spread of Salmonella gallinarum 9R vaccine strain under field conditions. **Avian Dis.**, v 45, p. 1024-1029, 2001a.

FEBERWEE, A.; DE VRIES, T.S.; HARTMAN, E.G.; DE WIT, J.J.; ELBERS, A.R.; DE JONG, W.A. Vaccination Against Salmonella enteritidis in Dutch Commercial Layer Flocks with a Vaccine Based on a Live Salmonella gallinarum 9R Strain: Evaluation of Efficacy Safety and Performance of Serologic Salmonella Tests". **Avian Dis.**, v.45, p. 83-91, 2001b.

FERRY, J. Methane from acetate. **J Bacteriol**., v. 174, p. 5489–5495, 1992.

FINKE, R.G. Coenzyme B12-based chemical precedent for Co-C bond homolysis and other key elementary steps. In: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT (eds) Vitamin B12 and B12- proteins. Wiley/VCH, Weinheim, p 383–402, 1998.

FREITAS NETO, O.C.; MESQUITA, A.L.; PAIVA, J.B.; ZOTESSO, F.; BERCHIERI JR, A. Control of Salmonella enterica serovar Enteritidis in laying hens by inactivated Salmonella Enteritidis vaccine. **Braz. J. Microbiol**., v. 39, p. 390-396, 2008.

FRESQUET, V.; WILLIANS, L.; RAUSHEL, M. Mechanism of cobyrinic acid a,c-diamide synthetase from Salmonella typhimurium LT2. **Biochemistry**. v. 43, p.10619-10627, 2004.

FREY, B.; MCCLOSKEY, J.; KERSTEN, W.; KERSTEN, H. New function of vitamin B_{12}: cobamide-dependent reduction of epoxyqueosine to queosine in tRNAs of Escherichia coli and Salmonella typhimurium**. J Bacteriol**., v. 170, p. 2078-2082, 1988.

FRIEDRICH, L.C.; VEAUX, L.C.; KADNER, R.J. Nucleotide sequence of the btuCED genes involved in vitamin B12 transport in Escherichia coli and homology with components of periplasmic-binding-protein-dependent transport systems. **J. Bacteriol**., v. 167, p. 928-934, 1986.

FUKATA, T.; SASAI, K.; MIYAMOTO, T.; BABA, E. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly or in combination, on Salmonella colonization of chicks. **J. Food Prot**., v. 62, p. 229–233, 1999.

GAMA, N.M.S.Q.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S.A. Occurrence of Salmonella sp. in laying hens. **Braz. J. Poult. Sci**., v.5, p.15-21, 2003.

GAST, R.K.; HOLT, P.S. Persistence of Salmonella enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. **Poultry Sci**., v. 77, p. 1759-62, 1998.

GAST, R.K.; STONE, H.D.; HOLT, P.S. Evaluation of the efficacy of oil_emulsion bacterin for reducing faecal shedding of Salmonella enteritidis by laying hens. **Avian Dis.**, v.37,p. 1085-1091, 1993.

GONZÁLEZ, J. C.; BANERJEE, R. V.; HUANG, S.; SUMNER, J. S.; MATTHEWS, R. G. Comparison of cobalamin-independent and cobalamin-dependent methionine synthases from Escherichia coli: two solutions to the same chemical problem. **Biochem**., v. 31, p. 6045−6056, 1992.

GORDON, R.F.; GARSIDE, J.S.; TUCKER, J.F. The use of living attenuated vaccines in the control of fowl typhoid. **Vet. Record.**, v. 71, p. 300-305, 1959.

GUEST, J.R.; FRIEDMANN, S.; WOODS, D.D.; SMITH, E.L. A methyl analogue of cobamide coenzyme in relation to methionine synthesisby bacteria**.** **Nature**, v. 195, p. 340–342, 1962.

HANSON, A.D.; ROJE, S. One-carbon metabolism in higher plants.-Annu. Rev. Plant Physiol. **Plant mol. Biol**., v. 52, p. 119-137, 2001.

HAVEMANN, G. D.; BOBIK, T.A. Protein content of polyhedral organelles involved in coenzyme B12-dependent degradation of 1,2-propanediol in Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. **J. Bacteriol**., v. 185, p. 5086-5095, 2003.

HAVEMANN, G. D.; SAMPSON, E.M.; BOBIK, T.A. PduA is a shell protein of polyhedral organelles involved in coenzyme B(12)-dependent degradation of 1,2-propanediol in Salmonella enterica serovar typhimurium LT2. **J. Bacteriol**., v. 184, p.1253-1261, 2002.

HEITHOFF, D.M.; CONNER, C.P; HENTSCHEL, U.; GOVANTES, F.; HANNA, P.C.; MAHAN, M.J. Coordinate Intracellular Experssion of Salmonella Genes Induced during Infection. **J Bacteriol**., v. 181, p.799-807, 1999.

HENZLER, D.J.; OPITIZ, H.M. The role of mice in the epizootiology of Salmonella Enteritidis infection on chicken layer farms. **Avian Dis.,** v. 36, p. 625-631, 1992.

HODGKIN, D.C.; PICKWORTH, J.; ROBERTSON, J.H.; TRUEBLOOD, K.N.; PROSEN, R.J.; WHITE, J. Structure of vitamin B12. **Nature**, v.176, p. 325–328, 1955.

HODGKIN, D.C.; KAMPER, J.; MACKAY, M.; PICKWORTH, M.; TRUEBLOOD, K.N.; WHITE, J.G. Structure of vitamin B12. **Nature**, v. 178, p. 64–70, 1956.

HODGKIN, D.C.; KAMPER, J.; LINDSEY, J.; MCKAY, M.; PICKWORTH, J.; ROBERTSON, J.H.; SHOEMAKER, C. The structure of vitamin B12. I. An outline of the crystallographic investigation of vitamin B12. **Proc. R. Soc. Lond. Ser.**, v. 242, p. 228–263, 1957

HODGSON, G.W.; PONNAMPERUMA, C. Prebiotic porphyrin genesis: porphyrins from electric discharge in methane, ammonia and water vapor. Proc. **Natl. Acad. Sci. USA**., v. 59, p.22–28, 1968.

HORSWILL, A. R.;ESCALANTE-SEMERENA, J.C. Propionate catabolism in Salmonella typhimurium LT2: two divergently transcribed units comprise the prp locus at 8.5 centisomes, prpR encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the prpBCDE genes constitute an operon. **J. Bacteriol**., v. 179, p. 928-940, 1997.

HUANG, Y.; LEMING, C.L.; SUYEMOTO, M.; ALTIER, C. Genome-wide screen of Salmonella genes expressed during infection in pigs, using in vivo expression technology. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 73, p. 7522-7530, 2007.

HUENNEKENS, F. M.; VITOLS, K. S.; FUJII, K.; JACOBSEN, D. W. Biosynthesis of the cobalamin coenzymes. In: B_{12}, pp. 145–164. Ed. Dolphin. New York: Wiley, 1982.

ISHIDA, T.; YU, L.; AKUTSU, H.; OZAWA, K.; KAWANISHI, S.; SETO, A. A primitive pathway of porphyrin biosynthesis and enzymology in Desulfovibrio vulgaris. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v.9, p. 4853–4858, 1998.

JAMES, W.P.T. Nutrition science and policy research: implications for Mediterranean diets. **Am. J. Clin. Nutr**., v.61, p.1324–1328, 1995.

JETER, R. M. Cobalamin-dependent 1,2 propanediol utilization by Salmonella typhimurium. **J. Gen. Microbiol**., v. 136, p. 887-896, 1990.

JETER, R.M.; ROTH, J.R. Cobalamin (vitamin B_{12}) biosynthetic genes of Salmonella typhimurium. **J. Bacteriol**., v. 169, p. 3189–98, 1987.

JETER, R.; OLIVEIRA, B.M.; ROTH, J.R. Salmonella typhimurium synthesizes cobalamin (vitamin B_{12}) de novo under anaerobic growth conditions. **J Bacteriol.,** v. 159, p. 206-216, 1984.

JIN, X.; BALLICORA, M.A.; PREISS, J.; GEIGER, J.H. Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. **EMBO J**., v. 24, p. 694-704, 2005.

JOHNSON, C. L.; PECHONICK, E.; PARK, S.D.; HAVEMANN, G.D.; LEAL, N.A.; BOBIK, T.A. Functional genomic, biochemical, and genetic characterization of the

Salmonella pduO gene, an ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase gene. **J. Bacteriol**., v. 183, p. 1577-1584, 2001.

KADNER, R.J. Repression of synthesis of the vitamin B12 receptor in Escherichia coli. **J. Bacteriol**., v. 136, p. 1050–57, 1977.

KADNER, R.J.; LIGGINS, G.L. Transport of vitamin B12 in Escherichia coli: genetic studies. **J. Bacteriol**., v. 115, p. 514–2, 1973.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E.E.; BARROW, P.A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differencial cytokine expression in avian cells in response to invasion by Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis and Salmonella gallinarum. **Microbiol**., v. 146, p. 3217-3226, 2000.

KELTJENS, J.; VOGELS, G. Conversion of methanol and methylamines to methane and carbon dioxide. In: Ferry J (ed) Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics. Chapman & Hall, New York, pp 253–302, 1993.

KENLEY, J.S.; LEIGHTON, M.; BRADBEER, C. Transport of vitamin B12 in Escherichia coli. Corrinoid specificity of the outer membrane receptor. **J. Biol. Chem.,** v. 253, p.1341–46, 1978.

KENNEDY, M. R.; VILLAR, D. J.; VUGIA, T.; RABATSKY-EHR, M. M.; FARLEY, M.; PASS, K.; SMITH, P.; SMITH, P. R.; CIESLAK, B.; GRIFFIN, P.M. Hospitalizations and deaths due to Salmonella infections, FoodNet, 1996–1999. Clin. **Infect. Dis**., v.38, p.142–148, 2004.

KIMURA, A.C.; REDDY, V.; MARCUS, R.; CIESLAK, P.R.; MOHLE-BOETANI, J.C.; KASSENBORG, H.D.; SEGLER, S.D.; HARDNETT, F.P.; BARRETT, T.; SWERDLOW,

D.L. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic Salmonella enterica serotype enteriditisinfections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. **Clin. Infect. Dis**., v. 38, p. 244-252. 2004.

KLUMPP, J.; FUCHS, T.M. Identification of novel genes is genomic islands that contribute to Salmonella typhimurium replication in macrophages. **Microbiol.,** 153: 1207-1220, 2007.

KWON, J.H.; PARK, K.Y.; YOO, H.S.; PARK, J.Y.; YOUNG, H.P.; KIM, S.J. Differentiation of Salmonella enteric serotype gallinarum byotipe pullorum from byotipe gallinarum by analysis of phase 1 flagellin C gene (fliC). Journal of **Microbiol. Meth**., v. 40, p. 33-38, 2000.

LAWHON, S.D.;FRYE, J.G.; SUYEMOTO, M.; PORWOLLIK, S.; MCCLELLAND, M., ALTIER, C. Global regulation by CsrA in Salmonella typhimurium. **Mol Microbiol.,** v. 48: 1633–1645, 2003.

LAWRENCE, J.G.; ROTH, J.R. The cobalamin (coenzyme B_{12}) biosynthetic genes of Escherichia coli. **J. Bacteriol**., v. 177, p. 6371-6380, 1995.

LEAL, N. A.; HAVEMANN, G.D.; BOBIK, T.A. PduP is a coenzyme-a-acylating propionaldehyde dehydrogenase associated with the polyhedral bodies involved in B_{12}-dependent 1,2-propanediol degradation by Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. **Arch. Microbiol**., v. 180, p. 353-361, 2003.

LEDLEY F. Perspectives on methylmalonic acidemia resulting from molecular cloning of methylmalonyl CoA mutase. **Bioessays**, v.12, p.335–40, 1990.

LEE, Y.J.; KIM, K.S.; KWON, Y.K.; TAK, R.B. Biochemical characteristics and antimicrobial susceptibility of Salmonella Gallinarum isolated in Korea. **J. Vet. Sci.,** v. 4, p.161-166, 2003.

LENHERT, P.G.; HODGKIN, D.C. Structure of the 5,6-dimethylbenzimidazolylcobamide coenzyme. **Nature**, v. 192, p. 937–938, 1961.

LI, J., SMITH,N.H.; NELSON, K.; CRICHTON, P.B.; OLD, D.C.; WHITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. **J. Med. Microbiol**., v. 38, p.129-139, 1993.

LIN, E.C.C. Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxy-lates. p.244-284. In F.D. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger. Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: cellular and molecular biology. 1st edn. ASM, Press Washington DC, 1987.

LIU, W.; YANG, Y.; CHUNG, N.; KWANG, J. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against Salmonella enteritidis after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. **Avian Dis.,** v.45, p.797-806, 2001.

LUNDRIGAN, M.D.; KOSTER, W.; KADNER, R.J. Transcribed sequences of the Escherichia coli btuB gene control its expression and regulation by vitamin B12. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 88, p.1479–83, 1991.

LUNDRIGAN, M.D.; KADNER, R.J. Altered cobalamin metabolism in Escherichia coli btuR mutants affects btuB regulation. **J. Bacteriol**., v. 171, p.154–61, 1989.

MACIOROWSKI, K.G.; JONES, F.T.; PILLA, S.D.; RICKE, S.C. Incidence, sources, and control of foodborne Salmonella spp. in poultry feeds World's Poultry Science Journal, v. 60, 2004.

MAGGIO-HALL, L.A.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. In vitro synthesis of the nucleotide loop of cobalamin by Salmonella typhimurium enzymes. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 96, p.11798-803, 1999.

MAGGIO-HALL, L.A., K.R. CLAAS, AND J.C. ESCALANTE-SEMERENA. The last step in coenzyme B_{12} synthesis is localized to the cell membrane in bacteria and archaea. **Microbiol.,** v. 150, p. 1385-1395, 2004.

MANCIA, F.; KEEP, N.J.; NAKAGAWA, A.; LEADLAY, P.F.; MCSWEENEY, S.; RASMUSSEN, B.; BÖSECKE, P.; DIAT, P.; EVANS, P.R. How coenzyme B12 radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. **Structure**, v. 4, p. 339–350, 1996.

MARTENS, J.H.; ·BARG, H.; ·WARREN, M.J.; · JAHN, D. Microbial production of vitamin B12. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 58, p.275–285, 2002.

MCMEECHAN, A.; LOVELL, M.A.; COGAN, T.A; MARSTON, K.L.; HUMPREY, T.J.; BARROW, P.A. Glycogen production by different Salmonella enterica serotypes: contribution of functional glgC to virulence, intestinal colonization and environmental survival**. Microbiol**. v. 151, p. 3969-3977, 2005.

NAGARAJA, K.V.; RAJASHEKARA, G. Vaccination against Salmonella enterica serovar Enteritidis infection: dilemma and realities In: Saeed AM, editors. Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals. Ames: Iowa State University Press. p.397-404, 1999.

NOGUCHI, S.; NISHIMURA, Y.; HIROTA, Y.; NISHIMURA, S. Isolation and characterization of an E. coli mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase. Function and biosynthesis of queuosine tRNA. **J. Biol. Chem**., v. 257, p.6544–50, 1982.

OBRADORS, N.; BADIA, J.; BALDOMA, L; AGUILAR, J. Anaerobic metabolism of the L-rhamnose fermentation product 1,2-propanediol in Salmonella typhimurium. **J. Bacteriol**., 170:2159–62, 1988.

O'TOOLE, G.A.; RONDON, M.R.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. Analysis of mutants of Salmonella typhimurium defective in the synthesis of the nucleotide loop of cobalamin. **J. Bacteriol**., v. 175, p. 3317–26, 1993.

PATRICK, M.E.; ADCOCK, P.M.; GOMEZ, T.M.; ALTEKRUSE, S.F.; HOLLAND, B.H.; TAUXE, R.V.; SWERDLOW, D.L. Salmonella enteritidis infections, United States, 1985–1999, **Emerg. Infect. Dis**., v. 10, p. 1–7, 2004.

PEJCHAL, R., LUDWIG, M.L. Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE): A Face-to-Face Double Barrel That Evolved by Gene Duplication. **Plos. Biol.,** v. 3, p. 31, 2005.

PRICE-CARTER, M., J. TINGEY, T.A. BOBIK, AND J.R. ROTH. 2001. The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of Salmonella enterica serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. **J Bacteriol**., v. 183, p. 2463-2475.

RAUX, E.; SCHUBERT, H.L.; ROPER, J.M.; WILSON, K.S.; WARREN, M.J. Vitamin B12: insights into biosynthesis's mount improbable. **Bioorg. Chem.,** v. 27, p.100–118, 1999.

RAVANEL, S.; BLOCK, M.A.; RIPPERT, P.; JABRIN, S.; CURIEN, G.; REBEILLE, F.; DOUCE, R. Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. **J. Biol. Chem**., v. 279, p. 22548–22557, 2004.

RIAZ, M.; ANSARI, Z.A.; IQBAL, F.; AKRAM, M. Microbial production of vitamin B12 by methanol utilizing strain of Pseudomonas specie. **Pak. Biochem. Mol. Biol**., v. 40, p. 5-10, 2007.

RYCHLIK, I.; BARROW, P.A. Salmonella stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. **FEMS Microbiol. Rev.,** v. 29, p.1021-40, 2005.

RICHTER-DAHLFORS, A.A.; RAVNUM, S.; ANDERSSON, D.I. Vitamin B12 repression of the cob operon in Salmonella typhimurium: translational control of the cbiA gene. **Mol Microbiol**., v. 13, p. 541-553, 1994.

RICHTER-DAHLFORS, A.A.; ANDERSSON, D.I. Cobalamin (vitamin B12) repression of the cob operon in Salmonella typhimurium requires sequences within the leader and the first translated open reading frame. **Mol. Microbiol**., v. 6, p. 743–49, 1992.

RICKES, E.L.; BRINK, N.G.; KONIUSZY, F.R.; WOOD, T.R.; FOLKERS, K. Crystalline vitamin B12. **Science**, v.107, p. 396–397, 1948a.

RICKES, E.L.; BRINK, N.G.; KONIUSZY, F.R.; WOOD, T.R.; FOLKERS, K. Comparative data on vitamin B12 from liver and from a new source**. Science,** v.108, p. 634–635, 1948b.

RONDON, M.R.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. The poc locus is required for 1,2-propanediol-dependent transcription of the cobalamin biosynthetic (cob) and propanediol utilization (pdu) genes of Salmonella typhimurium. **J Bacteriol**., v. 174, p. 2267-2272, 1992.

ROOF DM, ROTH JR. Autogenous regulation of ethanolamine utilization by a transcriptional activator of the eut operon in Salmonella typhimurium. **J.Bacteriol**., v.174, p.6634–43, 1992.

ROOF, D.M.; ROTH, J.R. Ethanolamine utilization in Salmonella typhimurium. **J.Bacteriol**., v. 170, p. 3855-3863, 1988.

ROOF, D.M.; ROTH, J.R. Functions required for vitamin-B12 dependent ethanolamine utilization in Salmonella typhimurium. **J. Bacteriol**., v. 171, p. 3316–23, 1989.

ROPER, J.M. RAUX, E.; BRINDLEY, A.A.; SCHUBERT, H.L.; GHARBIA, S.E.; SHAH, H.N.; WARREN, M.J. The Enigma of Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthesis in *Porphyromonas gingivalis.* Identification and characterization of a functional corrin pathway, **J. Biological Chem**., v. 275, p. 40316-40232, 2000.

ROTH, J.R.; LAWRENCE, J.G.; RUBENFIELD. M.; KIEFFER-HIGGINS, S.; CHURCH, G.M. Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium.* **J. Bacteriol***.,* v. 175, p. 3303–16, 1993.

ROTH, J.R.; LAWRENCE, J.G.; BOBIK, T.A. Cobalamin (coenzyme B_{12}): synthesis and biological significance. **Annu. Rev. Microbiol**., 50:137-181, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. 4th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPSON, E.M.; JOHNSON, C.L.V.; BOBIK, T.A. Biochemical evidence that the pduS gene encodes a bifunctional cobalamin reductase. **Microbiol.,** v. 151, p. 1169-1177, 2005.

SAMPSON, E.M. Genetic analysis of the polyhedral organelles formed during b_{12}-dependent growth on 1,2-propanediol in Salmonella enterica serovar typhimurium LT2. A thesis presented to the graduate school of the University of Florida. University of Florida, 2004.

SCARLETT, F.A.; TURNER, J.M. Microbial metabolism of amino alcohols. Ethanolamine catabolism mediated by coenzyme B12-dependent ethanolamine ammonia-lyase in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes. **J. Gen. Microbiol.,**v. 95, p. 173–76, 1976.

SCOTT, A.I. How nature synthesizes B12 without oxygen. Discoveries along the ancient, anaerobic pathway. In: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT (eds) Vitamin B12 and B12-proteins. Wiley/VCH, Weinheim, p 81–100, 1998.

SCOTT, A.I.; STOLOWICH, N.J.; WANG, J.; GAWATZ, O.; FRIDRICH, E.; MULLER, G. Biosynthesis of vitamin B12: Factor IV, a new intermediate in the anaerobic pathway**.** **Chemistry**, v. 93, p. 14316–14319, 1996.

SHEPPARD, D.E.; PENROD, J.T.; BOBIK, T.; KOFOID, E.; ROTH J.R.. Evidence that a B_{12}-Adenosyl Transferase Is Encoded within the Ethanolamine Operon of Salmonella enteric. **J. Bacteriol.,** v. 186**,** p. 7635-7644, 2004.

SIERRA, Y.M.; PAIVA, J.B.; PENHA FILHO, R.A.C.; BERCHIERI JR., A. Participation of genes involved in the process of anaerobic respiration of infection in chickens by Salmonella Typhimurium. **Braz . J. Vet. Pathol**. Accepted to publication, 2010.

SHIVAPRASAD, H.L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Rev. Sci. Tech.**, v.19, p. 405-424, 2000.

SMITH, H.W. The use of live vaccines in experimental Salmonella gallinarum infections in chickens with observations on their interference effect. **J. Hygiene**, v. 54, p. 419-432, 1956.

SMITH, E. L.; MERVYN, L.; JOHNSON, A. W.; SHAW, N. Partial synthesis of vitamin B 12 coenzymes and analogues**. Nature**, v.194, p.1175, 1962.

SNOEYENBOS, G.H. O presente e o futuro do controle de Salmonella em aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 12, Anais. Brasília: 1991. p.59-69, 1992.

SPALLA, C.; GREIN, A.; GAROFANO, L.; FERNI, G. Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. In: Vandamme EJ, ed. London: Elsevier Science Publishers, p. 257–284, 1989

SURTEES, R.; LEONARD, J.; AUSTIN, S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway, **Lancet.** v. 338, p. 1550–1554, 1991.

STUBBE, J. Binding sites revealed of nature's most beautiful cofactor. **Science,** v. 266, p. 1663-1664, 1994.

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. **Rev. Inst. Med. Trop**., v. 38, p. 315-332, 1996.

THIBAUT, D.; BLANCHE, F.; CAMERON, B.; CROUZET, J.; DEBUSSCHE, L.; REMY, E.; VUILHORGNE, M. Vitamin B12 biosynthesis in Pseudomonas denitrificans. In: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT (eds) Vitamin B12 and B12-proteins. Wiley/VCH, Weinheim, p. 63–79, 1998.

THOMSON, N.R.; CLAYTON, D.J.; WINDHORST, D.; VERNIKOS, G.; DAVIDSON, S.; CHURCHER, C.; QUAIL, M.A.; STEVENS, M.; JONES, M.A.; WATSON, M.; BARRON, A.; LAYTON, A.; PICKARD, D.; KINGSLEY, R.A.; BIGNELL, A.; CLARK, L.; HARRIS, B.; ORMOND, D.; ABDELLAH, Z.; BROOKS, K.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; WOODWARD, J.; NORBERCZAK, H.; LORD, A.; ARROWSMITH, C.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; SANDERS, M.; WHITEHEAD, S.; CHABALGOITY, J.A.; MASKELL, D.; HUMPHREY, T.; ROBERTS, M.; BARROW, P.A.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J. Comparative genome analysis of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Gen. Res**., v.18, p.1624-1637, 2008.

TOLSTYKH, T.; LEE, J.; VAFAI, S.; STOCK, J.B. Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. **EMBO J.,** v. 19. p. 5682–5691, 2000.

TRENDS AND SOURCES OF ZOONOTIC AGENTS IN THE EUROPEAN UNION AND NORWAY 2002. Disponível em:
http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/03_salm_2002.pdf

TRZEBIATOWSKI, J.R.; O'TOOLE, G.A.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. The cobT gene of Salmonella typhimurium encodes the NaMN:5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase responsible for the synthesis of N1-(5-phospho-Dribosyl)–5,6-dimethylbenzimidazole, an intermediate in the synthesis of the nucleotide loop of cobalamin. **J. Bacteriol**., v. 176, p. 3568–75, 1994.

TURNER, A.K.; BARBER, L.Z.; WIGLEY, P.; MUHAMMAD, S.; JONES, M.A.; LOVELL, M.A.; HULME, S.; BARROW, P.A. Contribution of proton-translocating proteins to the virulence of Salmonella enterica serovars Typhimurium, Gallinarum, and Dublin in chickens and mice. **Infect. Immun.,** v.71, p.3392-401, 2003.

TURNER, A.K.; LOVELL, M.A.; HULME, S.D.; 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. **Infect. Immun.,** v**.** 66, p. 2099-2106, 1998.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; BOYEN, F.; BOHEZ, L.; PASMANS, F.; VOLF, J.; SEVCIK, M.; RYCHLIK, I.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Medium-Chain Fatty Acids Decrease Colonization and Invasion through hilA Suppression Shortly after Infection of Chickens with Salmonella enterica Serovar Enteritidis. **App. Env. Microbiol**., v. 70, p. 3582-3587, 2004.

VITOLS, E.; WALKER, G. A.; HUENNEKENS, R. M. Enzymatic conversion of vitamin B_{12s} to a cobamide coenzyme α (5,6 dimethilbenzimidazolyl) deoxyadenosylcobalamina. **J. Biol. Chem**., v. 241, p. 1455–1461, 1965.

VOETSCH, A.C.; VAN GILDER, T.J.; ANGULO, F.J.; FARLEY, M.M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P.R.; DENEEN, V.C.; TAUXE, R.V. Emerging Infections Program Food Net Working Group, FoodNet estimate of the burden of illness caused by

nontyphoidal Salmonella infections in the United States, Clin. **Infect. Dis**., v. 38, p. 127–134, 2004.

WALLIS, T.S.; WOOD, M.; WATSON, P.; PAULIN, S.; JONES, M.; GALYOV, E. Sips, Sops and SPIs but not stn influence Salmonella enteropathogenesis. **Adv. Exp. Med. Biol.,** v. 473, p. 275-280, 1999.

WATANABE, F.; NAKANO, Y.; TAMURA, Y.; YAMANAKA, H. Vitamin B12 metabolism in a photosynthesizing green alga, Chlamydomonas reinhardtii. **Biochim. Biophys. Acta.,** v. 1075, p. 36–41, 1991.

WATANABE, F.; TAMURA, Y.; STUPPERICH, E.; NAKANO, Y. Uptake of cobalamin by Euglena mitochondria. **J. Biochem**., v. 114, p.:793–799, 1993.

WEI, B.; SHIN, S.; LAPORTE, D.; WOLFE, A.J.; ROMEO, T. Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli*. the presence of acetate. **J. Bacteriol.,** v. 182, p. 1632–1640, 2000.

WEISS, L.H.N.; CARDOSO, R.B.; COSTA, M. Ocorrência de Salmonella spp. em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.,** v. 22, p.104-108, 2002.

WHITEMAN, C. E.; BICKFORD, A. A. Avian salmonellosis. In Avian Diseases Manual, 3th ed. The American Association of Avian Pathologists, p. 84-97, 1988.

WIGLEY, P.; HULME, S.; POWERS, C.; BEAL, R.; SMITH, A.; BARROW, P. A. Oral infection with the Salmonella enterica serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. **BMC Vet. Res.,** v. 1, p. 1-6, 2005.

WIGLEY, P.,. S.D. HULME, N. BUMSTEAD, AND P.A. BARROW. 2002. In vitro and in vivo studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by SAL1 locus. **Microbes Infect**., 4:1111-1120, 2002.

WILSON, R.; ELTHON, J.; CLEGG, S.; JONES, B.D. Salmonella enterica serovars Gallinarum and Pullorum expressing Salmonella enterica serovar Typhimurium type I fimbriae exhibit increased invasiness for mammalian cells. **Infect. Immun**., v.68, p. 4782-4785, 2000.

WOODWARD, M.J.; GETTINGBY, G.; BRESLIN, M.F.; CORKISH, J.D.; HOUGHTON, S. The efficacy of Salenvac, aSalmonella enterica subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. **Avian. Pathol**., v. 31, p. 383-392, 2002.

WU, H.D. WILLIAMS, M. ZAMANIAN, F. GIBSON AND R.K. POOLE, Isolation and characterization of E. coli mutants affected in aerobic respiration: the cloning and nucleotide sequence of ubiG. **J. Gen. Microbiol**. v. 138 (1992), pp. 2101–2112.

ZANCAN, F. B.; BERCHIERI JR, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q. Salmonella spp investigation in transport box of day old birds. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n. 3, p. 230-232, 2000.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A.K.; MARTIN, G.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G; BARROW, P.A. Influence of genes encoding proton-translocating enzymes on suppression of Salmonella typhimurium growth and colonization **J. Bacteriol**., v. 179, p. 7186-7190, 1997.

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