LIDIANE MOTA MARTINS

Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil
genotípico, colonização e invasão

São Paulo
2010

LIDIANE MOTA MARTINS

Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2238
FMVZ

Martins, Lidiane Mota

Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão / Lidiane Mota Martins. -- 2010.
127 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. *Salmonella* Typhimurium. 2. Aves. 3. Genes de virulência. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3ª	1ª	127 f.	126 f.
Resumo	1ª	3ª	2009. 127 f.	2010. 126 f.
Abstract	1ª	3ª	2009. 127 f.	2010. 126 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo de *Salmonella Typhimurium* de origem aviária: perfil genotípico; colonização e invasão", protocolado sob o nº1197/2007, utilizando 360 (trezentos e sessenta) frangos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Study of *Salmonella Typhimurium* of avian origin: genotype profile, settling and invasion", protocol number 1197/2007, utilizing 360 (three hundred sixty) chickens, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved "ad referendum" meeting.

São Paulo, 27 de novembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Nome: MARTINS, Lidiane Mota

Título: Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico essa dissertação aos meus pais *Martins e Ana* por terem me transmitido uma herança repleta de amor, dignidade e respeito, e ao meu esposo *Kelson*, pelo amor incondicional e por sempre acreditar nos meus sonhos e mostrar que tudo é possível.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho se deve à colaboração e apoio de inúmeras pessoas, as quais transmito os mais sinceros agradecimentos:

- Agradeço primeiramente a Deus, pela presença constante em minha vida, por tantas oportunidades, e por colocar em meu caminho pessoas que me acolheram e enriqueceram meus dias.
- Aos meus pais, pilares da minha vida, que sempre estiveram do meu lado e me ensinaram a viver com dignidade, não bastaria um muito obrigado.
- Ao Kelson, companheiro de todas as horas, amigo fiel e dedicado, agradeço por sempre estar presente, me incentivando e fazendo com que eu seja uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada pelo nosso filho (Guilherme), que só veio a somar e hoje me impulsiona a lutar e buscar vida nova sempre. Amo vocês!
- Aos meus irmãos Anderson e Luana, minha cunhada Veridiana e meu cunhado Júnior, pelo apoio, palavras de conforto e principalmente amizade. À minha princesa Ana Clara por deixar a minha vida mais radiante.
- Aos meus primos queridos, em especial Chiquinho e Airton e suas esposas Maristela e Silaine pela força nas horas mais difíceis, carinho, preocupação e momentos em família.
- À todos os meus familiares, em especial tia Lucília e tia Dulce, meu sogro (Moisés), minha sogra (Leonor) e minhas cunhadas (Kelly e Kelcylene) que me apoiaram quando decidir trilhar esse caminho. Obrigada pelos telefonemas, e-mails e visitas, que sempre fazia com que a saudade se tornasse menor.
- Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira pelo constante incentivo, por compartilhar tamanha experiência, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade. Agradeço, principalmente, pela confiança e amizade.

- À Claudete Serrano Astolfi Ferreira, amiga, conselheira, pessoa que me incentivou a crescer cientificamente, profissionalmente e pessoalmente. Agradeço pelas sugestões durante todo o desenvolvimento da dissertação. Obrigada por tudo sempre.
- À Luciana Allegretti e Jorge Chácon, pessoas ímpares, amigos para todas as horas, pessoas fundamentais que fizeram da minha vida em São Paulo um lugar melhor para viver. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Vocês são especiais!
- À Liliana Revolledo, por lições que não podem ser encontradas em livros, pelo auxílio nos momentos de dificuldade, presteza no auxílio às atividades, críticas e sugestões e correções durante a dissertação e principalmente pela amizade verdadeira.
- Aos eternos amigos Antonio Carlos, Andyara, Marcos Ivo, Joelma, Camila, Eliana e André pela amizade, cooperativismo, momentos de convívio felizes e inesquecíveis, auxílio na prática e na vida. Obrigada por me acolherem, vocês foram fundamentais.
- Ao técnico de laboratório Maurício, pelos diversos materiais fornecidos, excelente convívio e amizade.
- Às amigas Pilar e Kátia, pelo incentivo, carinho e sólida amizade. Por estarem sempre presentes e principalmente pelos momentos felizes.
- À minha família paulista Wilson, Ivani e Paloma que me adotaram, obrigada pelos valores que sempre me passaram, pela amizade sincera, pelos anos de maravilhoso convívio. ‘Obrigada’ é uma palavra tão pequena para expressar esse sentimento de ‘Nunca esquecerei vocês jamais’!!!
- Aos estagiários: Eduardo, Guilherme, Mateus, Melanie e Fernanda, pela amizade e auxílio durante a realização desse projeto.
- Às amigas MSP’s Aline, Lourena, Tatiane, Elizângela e Glayde pelo estímulo, apoio e valorosa amizade. Durante esse período a saudade foi enorme, mas recompensadora.

- À Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela formação adquirida. Agradeço aos professores da graduação pelo conhecimento e incentivo à Iniciação Científica.
- Ao Laboratório Biovet pelo fornecimento de pintinhos para o experimento.
- Ao Instituto Federal de Análises de Riscos [Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)] em Berlim na Alemanha pela sorotipagem das amostras de *Salmonella* utilizadas neste trabalho.
- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.
- Ao Laboratório de Ornitopatologia (LABOR) pela infra-estrutura, equipamentos e materiais utilizados, mas principalmente pelo ambiente acolhedor, repleto de energia positiva.
- À Universidade de São Paulo (USP) pela possibilidade de realização desse trabalho.

Muito Obrigada!!!

O futuro tem muitos nomes.
Para os fracos é o inalcançável.
Para os temerosos, o desconhecido.
Para os valentes é a oportunidade.

Victor Hugo

RESUMO

MARTINS, Lidiane Mota. **Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão.** [Study of *Salmonella* Typhimurium of avian origin: genotypic profile, colonization and invasion]. 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Salmonella do grupo paratífóide é responsável por toxi-infecção alimentar no homem, veiculada por alimentos contaminados. Este estudo determinou o perfil genotípico de nove amostras de *S. Typhimurium*, a sua patogenicidade, assim como sua capacidade de colonização e invasão em aves *SPF*. Verificou-se pela análise dos genes: *agfA*, *avrA*, *cdtB*, *fimA*, *fliC*, *invA*, *iroN*, *lpfC*, *mgtC*, *pefA*, *sefC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA*, *sopB*, *sopE1*, *sptP* ou *spvC* em amostras de *Salmonella* Typhimurium que todas foram negativas para os genes *sopE1* ou *spvC*. O gene *cdtB* estava presente em apenas uma amostra (11,11%) e o gene *pefA* em duas amostras (22,22%). O gene *sefC* foi encontrado em três amostras (33,33%). Em oito amostras (88,88%) os genes *agfA*, *fimA*, *lpfC* ou *sptP* estiveram presentes. Os genes *avrA*, *fliC*, *invA*, *iroN*, *mgtC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC* ou *slyA* ou *sopB* estiveram presentes em 100% das amostras analisadas. Determinou-se quatro perfis genotípicos. No ensaio de patogenicidade observou-se que as amostras inoculadas por via oral, não causaram mortalidade de pintinhos *SPF* de um dia de idade, com a exceção da amostra SA 633 e SA 006 que apresentaram 30 e 10%, respectivamente. No entanto, observou-se que a infecção por via subcutânea provocou uma maior mortalidade de pintinhos, sendo que as amostras SA 003, SA 004, SA 005 e a amostra vacinal mostraram somente 10% de mortalidade, a amostra SA 002 30%, as amostras SA 632 e SA 634 70% e a amostra SA 633 100%. A amostra SA 006 não provocou nenhuma mortalidade. A amostra mais patogênica pela via subcutânea foi a SA 633. O ensaio de colonização foi realizado em pintinhos *SPF*, com as amostras SA 002, SA 003, SA 004, SA 005, SA 006, SA 632, SA 633, SA 634 e amostra vacinal. Verificou-se ausência de invasão no fígado e baço 24 horas pós- infecção, exceto para as amostras SA 632 (30%) e amostra vacinal (20%). Após sete dias da infecção houve invasão em dois pintinhos com a amostra SA 002 e um pintinho com as amostras SA 004 e SA 005. Apenas na amostra SA 632 constatou-se colonização em ceco após 24 horas em 10% das amostras e após 7 dias em 70% pós-infecção. Concluiu-se que entre as amostras de *Salmonella* Typhimurium analisadas existiam diferentes perfis genotípicos baseando-se na presença ou ausência de genes de virulência, e que a amostra vacinal assemelha-se a amostras de *S. Typhimurium* estudadas quanto a presença dos genes. Os resultados do teste de patogenicidade das amostras de ST indicaram que a via de inoculação modifica a patogenicidade de uma mesma amostra e que a mortalidade após a inoculação pela via subcutânea é sempre superior que pela via oral.

Palavras – chave: *Salmonella* Typhimurium. Aves. Genes de virulência.

ABSTRACT

MARTINS, Lidiane Mota. **Study of *Salmonella* Typhimurium of avian origin: genotypic profile, colonization and invasion.** [Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão]. 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Paratyphoid *Salmonella* are major food-borne pathogens spread by contaminated food products. This study determined the genotypic profile of nine samples of *S. Typhimurium*, pathogenicity, colonization and invasion in *SPF* chicks. It was found by analysis of genes: *agfA*, *avrA*, *cdtB*, *fimA*, *fliC*, *invA*, *iroN*, *lpfC*, *mgtC*, *pefA*, *sefC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA*, *sopB*, *sopE* 1, *sptP* or *spvC* samples of *S. Typhimurium* all were negative to *sopE*1 or *spvC*. The *cdtB* gene was identified in one sample and *pefA* gene in two samples (22,22%). *Sef C* gene was detected in three samples (33,33%). In eight samples (88,88%) *agfA*, *fimA*, *lpf* or *sptP* were detected. *AvrA*, *fliC*, *invA*, *iroN*, *mgtC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA* and *sopB* were detected in all samples evaluated. Four genotypic profiles were established. Pathogenicity tests showed that samples inoculated by oral gavage did not present mortality in one day old *SPF* chicks, except samples SA 633 and SA006 with 30 and 10%, respectively. However, it was observed that subcutaneous inoculation showed high mortality in *SPF* chicks than oral inoculation, and samples SA 003, SA004, SA005 and vaccinal strain showed 10% of mortality, 30% for sample SA002, 70% in the samples SA632 and SA 634 and 100% when the sample SA 633 was inoculated. No mortality was observed in sample SA006. Colonization test was performed in *SPF* chicks using the samples: SA002, SA 003, SA 004, SA005, SA006, SA 632, SA 633, SA 634 and vaccinal strain. The more pathogenic strain subcutaneously was the SA 633. There was not invasion in liver and spleen 24 hours p.i., except for sample SA 632 (30%) and vaccinal strain (20%). Seven days p.i. invasion was detected in two chicks inoculated with samples identified as SA 004 and SA 005. Sample SA 632 showed 10% of cecal colonization 24 hours p.i. and 70% after one week p.i. It was concluded that *Salmonella* Typhimurium strains including the vaccinal strain, showed different genotypical profiles, based on the presence or absence of genes of virulence genes. The results of the pathogenicity test indicated that inoculation route modify the pathogenicity of the same strain, and the mortality post-inoculation was always higher in chicks inoculated by subcutaneous route when compared to the oral route.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium. Chicks. Virulence genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Localização de fatores de virulências representativos de <i>S. enterica</i> ...	41
Figura 5.1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>sopE1</i>	65
Figura 5.2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>spvC</i>	66
Figura 5.3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>cdtB</i>	66
Figura 5.4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>pefA</i>	67
Figura 5.5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>sefC</i>	67
Figura 5.6 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>agfA</i>	68
Figura 5.7 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>fimA</i>	68
Figura 5.8 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>lptC</i>	69
Figura 5.9 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>sptP</i>	69
Figura 5.10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>avrA</i>	70
Figura 5.11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>fliC</i>	70
Figura 5.12 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>invA</i>	71
Figura 5.13 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>iroN</i>	71
Figura 5.14 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>mgtC</i>	72
Figura 5.15 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene <i>sifA</i>	72

- Figura 5.16 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sipB*.73
- Figura 5.17 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sipC*.73
- Figura 5.18 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sitC*.74
- Figura 5.19 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *slyA*.74
- Figura 5.20 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sopB*.75

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Número de sorotipos presentes em cada espécie e subespécie de <i>Salmonella</i> spp.....	34
Tabela 3.2 – Classificação para as principais espécies de <i>Salmonella</i> sp. pelo esquema de Kauffmann-White.....	34
Tabela 3.3 – Denominações antigas e novas dos sorovares de <i>Salmonella</i>	35
Tabela 3.4 - Algumas fímbrias reportadas em <i>Salmonella</i>	37
Tabela 3.5 – Características de algumas ilhas de patogenicidade de <i>Salmonella</i> ..	39
Tabela 3.6 - Algumas proteínas secretadas pelo Sistema de Secreção Tipo III (SSTIII) da Ilha de Patogenicidade 1 (SPI-1) de <i>Salmonella</i> spp.....	40
Tabela 4.1 – Número de amostras de <i>Salmonella</i> Typhimurium e origem.....	55
Tabela 4.2 – Seqüência de <i>primers</i> utilizados para a detecção dos genes de virulência de <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Salmonella</i> Heidelberg, tamanho dos fragmentos, condições de amplificação e referências ou números de acesso	58
Tabela 4.3 – Seqüência de <i>primers</i> utilizados para a detecção dos genes de virulência de <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Salmonella</i> Heidelberg, tamanho dos fragmentos, condições de amplificação e referências ou números de acesso	59
Tabela 5.1 – Perfis genotípicos de <i>Salmonella</i> Typhimurium encontrados nas amostras estudadas – São Paulo – 2008-2009	76
Tabela 5.2 – Titulação de <i>Salmonella</i> Typhimurium desafiadas por via oral – São Paulo – 2008-2009.....	77
Tabela 5.3 – Patogenicidade de amostras de <i>Salmonella</i> Typhimurium desafiadas por via oral e por via subcutânea em pintinhos SPF – São Paulo – 2008-2009.....	78
Tabela 5.4 - Reisolamento de <i>Salmonella</i> Typhimurium em fígado, baço e ceco de pintinhos SPF desafiados por via oral, após diluição em água peptonada 0,1 % - São Paulo – 2008-2009.	79
Tabela 5.5 - Reisolamento de <i>Salmonella</i> Typhimurium em fígado, baço e ceco de pintinhos SPF, desafiados por via oral após enriquecimento em caldo tetracionato – São Paulo – 2008-2009.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	coleção de cepas tipo americana (American Type Culture Collection)
BfR	Instituto Federal de Análises de Riscos [Bundesinstitut für Risikobewertung] – Berlim - Alemanha
cm	centímetro
CMI	Concentração mínima inibitória
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	grama
h	hora (s)
HCl	ácido clorídrico
H ₂ S	gás sulfídrico
HE	ágar Hecköen
ISO	International Organization for Standardization
Kb	kilo pares de bases
LB	caldo Luria Bertani
log	logaritmo
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
m ²	metros quadrados
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MC	ágar MacConkey
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MILI	meio motilidade-lisina-indol
min.	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
n	número
mm	milímetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	nível de significância estatística
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pH	potencial hidrogeniônico

PMN	Polimorfonucleadas
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
RV	caldo rapparport vassiliadis
SAR	soroaglutinação rápida
SC	caldo selenito cistina
SCV	<i>Salmonella</i> contendo vacúolo
SPI	Ilha de Patogenicidade
sp.	espécie
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
spp.	espécie
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SS	ágar <i>Salmonella-Shigella</i>
SSTIII	Sistema de Secreção Tipo III
T	tratamento
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TT	caldo tetratonato
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPI	Universidade Federal do Piauí
USP	Universidade de São Paulo
V	volts
VB	ágar verde brilhante
VPT	Departamento de Patologia Experimental e Comparada
VSC	via subcutânea
VO	via oral
WHOCC – Salm	Centro de Colaboração da Organização Mundial de Saúde
X	vezes
µg	micrograma
µl	microlitro
XLD	ágar xilose lisina desoxicolato
XLT ₄	ágar xilose lisina tergitol 4

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
° C	graus Celsius
®	marca registrada
'	minutos
''	segundos
+	positivo
-	negativo

SUMÁRIO¹

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xix
LISTA DE SÍMBOLOS	xxii
1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	30
3 REVISÃO DE LITERATURA	32
3.1 AVICULTURA BRASILEIRA	32
3.2 GÊNERO <i>Salmonella</i>	32
3.2.2 Estruturas antigênicas	36
3.2.3 Patogenicidade	40
3.2.4 Invasão dos órgãos e colonização do trato gastrointestinal em aves	43
3.3 SALMONELAS PARATIFÓIDES EM AVES	45
3.4 <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM EM AVES	45
3.5 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	46
3.6 DIAGNÓSTICO	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 AVES	54
4.2 AMOSTRAS BACTERIANAS	54
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO	55
4.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	56
4.5 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO (<i>amplicon</i>)	60
4.6 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	60
4.7 PATOGENICIDADE EM PINTINHOS <i>SPF</i>	61
4.8 COLONIZAÇÃO DE CECO E INVASÃO EM FÍGADO E BAÇO POR <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM EM PINTINHOS <i>SPF</i>	62
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5 RESULTADOS	65
5.1 AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	65

5.2 PERFIL GENOTÍPICO DAS AMOSTRAS DE <i>Salmonella</i> Typhimurium	75
5.3 TITULAÇÃO DO INÓCULO	77
5.4 PATOGENICIDADE EM PINTINHOS <i>SPF</i> INFECTADOS POR VIA ORAL OU SUBCUTÂNEA	77
5.5 COLONIZAÇÃO DE CECO E INVASÃO EM FÍGADO E BAÇO POR <i>Salmonella</i> Typhimurium EM PINTINHOS <i>SPF</i>	79
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS²	91
APÊNDICES	116
APÊNDICE A – Preparo dos meios de cultura utilizados	117
APÊNDICE B – Preparo dos reagentes para extração de DNA	119
APÊNDICE C – Preparo das substâncias utilizadas na eletroforese	121
APÊNDICE D – Ficha para padronização dos primers	122
APÊNDICE E – Ficha de Eletroforese	123
APÊNDICE F – Ficha de patogenicidade de pintinhos <i>SPF</i>	124
APÊNDICE G – Ficha de colonização de ceco e invasão em fígado e baço em pintinhos <i>SPF</i>	125

1 INTRODUÇÃO

Com todos os avanços alcançados pela avicultura brasileira, juntamente com as relativas quedas nos custos e melhoria na qualidade do produto, o Brasil obteve uma maior inserção no mercado internacional, elevando-o como o maior exportador de carne de frango do mundo, (USDA, 2009) totalizando 3,6 milhões de toneladas exportadas no ano de 2008 (ABEF, 2009). A produção do Brasil em 2008 foi de 10,9 milhões de toneladas, resultado que manteve o país no terceiro lugar entre os maiores produtores mundiais, atrás somente dos Estados Unidos e China (ABEF, 2009).

O sistema intensivo de criação adotado pela Avicultura Industrial favorece a introdução e disseminação de inúmeras doenças infecciosas. Dentre elas, pode-se destacar a salmonelose, uma das zoonoses de maior prevalência até mesmo em países desenvolvidos, causada por microrganismos do gênero *Salmonella*.

O gênero *Salmonella* foi dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A primeira foi subdividida em 6 subespécies: *enterica* (subesp. I), *salamae* (subesp. II), *arizonae* (subesp. IIIa), *diarizonae* (subesp. IIIb), *houtenae* (subesp. IV) e *indica* (subesp. VI). A segunda espécie inclui uma única espécie (subesp. V).

Os produtos avícolas são importantes veículos na transmissão de *Salmonella* spp. dominando outros produtos alimentícios de origem animal, como potencial fonte de infecção para humanos. Além da *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum, classificadas como hospedeiro-específicas, as salmonelas do grupo paratifóide também infectam aves, dentre estas podemos citar a *Salmonella* Typhimurium, cuja natureza e gravidade varia dependendo da espécie hospedeira.

Salmonella Typhimurium causa uma infecção sistêmica em aves jovens, que pode causar a morte (WHITANAGE et al, 2004), e em aves adultas pode levar ao estado conhecido como portador assintomático com colonização do trato digestivo e excreção contínua (BARROW; SIMPSON; LOVELL, 1988; WHITANAGE et al., 2005). Esta bactéria é capaz de colonizar o trato gastrointestinal de aves jovens sem sinais clínicos de doença, com um elevado número de agentes localizados dentro dos cecos (JONES et al., 2007). Apesar dos mecanismos de

virulência terem sido estudados amplamente em outras espécies, o conhecimento em aves é limitado (WALLIS; GALYOV, 2000). Estudos previamente realizados têm demonstrado que muitos genes são requeridos para produzir a infecção.

Uma série de mecanismos e interações entre o agente e o hospedeiro tem sido descritos, que permitem a expressão dos genes de virulência da bactéria e sua adaptação às mudanças no ambiente na qual apresentam durante o processo infeccioso. Para colonizar com sucesso um hospedeiro, a *Salmonella* Typhimurium deve expressar um amplo grupo de fatores de virulência. A maioria dos genes requeridos para a virulência de *S. Typhimurium* estão relativamente bem descritos e agrupados em cinco ilhas de patogenicidade. Outros genes de virulência associados estão dispersos no cromossomo. As ilhas de patogenicidade de *Salmonella* 1 e 2, são os dois maiores determinantes de virulência. O SPI-1 codifica proteínas do sistema de secreção do tipo III, sendo capaz de injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células hospedeiras (GALÁN, 2001; WATERMAN; HOLDEN, 2003) e permitindo a entrada da bactéria dentro das células intestinais. No entanto os genes codificados pela SPI-2 são essenciais para a sobrevivência da bactéria no meio intracelular. A expressão de genes nessas duas ilhas envolve numerosos genes que codificam proteínas estruturais, proteínas efetoras, genes reguladores, e outros mecanismos, que têm sido relacionados com a capacidade de algumas cepas de invadir os órgãos internos (DIEYE et al., 2009).

Neste contexto, o presente trabalho avaliou o perfil genético de nove amostras de *Salmonella* Typhimurium para 20 genes localizados na ilha de patogenicidade 1, a maior responsável pela colonização deste agente nas aves; ao mesmo tempo determinou a patogenicidade de cada amostra mediante testes *in vivo*, assim como a capacidade de cada amostra de colonizar os cecos e invadir os órgãos, avaliando esta capacidade com o perfil genético de cada amostra utilizada.

2 OBJETIVOS

Detectar o perfil genético de genes de cada amostra de *Salmonella* Typhimurium através da detecção dos genes de virulência (*agfA*, *avrA*, *cdtB*, *fliC*, *fimA*, *invA*, *iroN*, *lpfC*, *mgtC*, *pefA*, *sefC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA*, *sopB*, *sopE1*, *sptP*, *spvC*).

Comparar *S. Typhimurium* vacinal com aquelas isoladas de aves quanto à presença de genes de virulência estudados.

Determinar a patogenicidade de *S. Typhimurium* em pintinhos *SPF* infectados tanto por via oral como por via subcutânea.

Estabelecer a capacidade de colonização em ceco e invasão em fígado e baço de cada amostra de *Salmonella* Typhimurium analisada.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AVICULTURA BRASILEIRA

Atualmente, a avicultura brasileira vem apresentando grandes avanços tecnológicos como equipamentos, genética, nutrição e manejo produtivo, o que permite colocar no mercado um produto de alta qualidade, de baixo custo para o consumidor e para a empresa, porém de rápida produção, em média 42 dias para o abate de frangos de corte (OLIVEIRA, 1995).

Dentre os fatores que contribuem para o sucesso da avicultura no Brasil destacam-se: a estrutura fundiária, oferta de grãos, mão-de-obra disponível com o perfil para a atividade, tendo como consequência o baixo custo de produção (DICKEL, 2004).

Segundo Aloisi (1996), as condições ambientais do incubatório favorecem a instalação e proliferação de microrganismos em ovos férteis, acarretando mortalidade do embrião e elevada perda econômica para uma empresa produtora de pintos de corte de um dia.

Um dos principais microrganismos estudados é a *Salmonella* spp., a qual tem provocado constante preocupação a autoridades sanitárias nacionais e internacionais, dado à sua complexidade e patogenicidade (DICKEL, 2004). Devido à sua importância na saúde pública se implementou o Programa Nacional de Sanidade Avícola - Portaria nº 193 (BRASIL, 1994), que estabelece normas para a prevenção e controle de *Salmonella* em aves e produtos alimentícios de origem aviária - Portaria nº 8 (BRASIL, 1995).

3.2 GÊNERO *Salmonella*

As primeiras bactérias do gênero *Salmonella*, até então conhecida como *Bacterium typhosa*, isolada de baço e linfonodos de seres humanos foram identificadas em 1880, sendo a primeira a ser reconhecida como patógeno por

Eberth (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Em 1885, o veterinário, Dr. Daniel E. Salmon isolou um bacilo de suínos doentes, que erroneamente foi designado como o agente da peste suína, sendo posteriormente denominado de *Bacillus cholerae suis*. Em 1888, Gartner isolou uma bactéria de humano morto por gastroenterite, que havia ingerido carne crua de uma vaca doente. Mais tarde, essa bactéria foi denominada *Bacillus enteritidis*, e em 1900, Lignières propôs o nome genérico *Salmonella*, em homenagem ao Dr. Salmon (MERCHANT; PACKER, 1980).

O primeiro relato documentado de salmonelose em aves, mais especificamente em pombos, foi realizado em 1885, e somente entre os anos de 1920 e 1930 ocorreu a descrição dos primeiros surtos em perus e galinhas (SILVA, 1991).

A caracterização das bactérias do gênero *Salmonella*, no início do século XX, era bastante confusa e, a partir de 1925, devido à utilização de provas sorológicas, foram descritos aproximadamente 900 sorotipos de *Salmonella*, classificados através da terminologia de White, o que deu origem ao esquema de Kauffmann-White, reconhecido a partir de 1932 (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

As salmonelas são bacilos Gram negativos, aero-anaeróbios facultativos, que se comportam como patógenos intracelulares facultativos (CLARKE; GYLES, 1993). Produzem uma enfermidade aguda, de distribuição mundial, transmitida por alimentos, de importância tanto em saúde pública como em saúde animal devido ao impacto econômico que ocasiona (JONES, 1996).

Segundo Barrow (1999), a salmonelose é causada por microrganismos do gênero *Salmonella* pertencente à família *Enterobacteriaceae* que compreende aproximadamente 2.500 sorotipos. Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), através do Centro de Referência e Pesquisa de *Salmonella* (WHOCC-Salm), mediante estudos de DNA (CAFFER; TERRAGNO, 2001), recomenda uma nomenclatura que reflète os recentes avanços da taxonomia do gênero, consistindo de duas espécies: *Salmonella enterica*, classificada em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*), e *Salmonella bongori*. Os nomes foram mantidos somente para os sorotipos da subespécie *enterica*, que devem ser escritos com a primeira letra maiúscula e não devem ser de forma itálica (POPOFF; LE MINOR, 1997).

Tabela 3.1 – Número de sorotipos presentes em cada espécie e subespécie de *Salmonella* spp.

<i>S. enterica</i>	2.557
<i>S. enterica enterica</i>	1.531
<i>S. enterica salamae</i>	505
<i>S. enterica arizonae</i>	99
<i>S. enterica diarizonae</i>	336
<i>S. enterica houtanae</i>	73
<i>S. enterica indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
TOTAL (Gênero <i>Salmonella</i>)	2.579

Fonte: Adaptado de Oliveira (2000); Grimont e Weill (2007)

3.2.1 Classificação

Para a classificação da *Salmonella*, utiliza-se o esquema de Kauffmann-White, que divide o gênero em tipos sorológicos (sorotipos ou sorovares), tendo por base a composição antigênica das salmonelas, com relação aos seus antígenos de superfície: somáticos (O), designados por números arábicos; flagelares (H), designados por letras minúsculas e por números arábicos; e capsulares (Vi), com apenas um tipo imunológico encontrado na *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Hirschfeldii (FRANCO; LANDGRAF, 1996; CAMPOS, 2002).

Tabela 3.2 – Classificação para as principais espécies de *Salmonella* sp. pelo esquema de Kauffmann-White

Grupo	Sorotipo	Antígeno "O"	Antígeno H	
			Fase 1	Fase 2
A	Paratyphi A	1, 2, 12	A	[1, 5]
	Abortus equi	4, 12	-	e, n, x
	Abortus ovis	4, 12	C	1, 6
B	Typhimurium	1, 4, [5], 12	I	1, 2
	Paratyphi B	1, 4, 5, 12	B	1, 2
C1 E C4	Choleraesuis	6, 7	C	1, 5
	Typhi-suis	6, 7	C	1, 5
C1 E C3	Newport	6, 8, 20	e, h	1, 2
	Typhi	9, 12	D	-
	Enteritidis	1, 9, 12	g, m	-
D1 E D2	Dublin	1, 9, 12, [Vi]	g, p	-
	Gallinarum	1, 9, 12	-	-
	Pullorum	9, 12	-	-

Fonte: Adaptado de Oliveira (2000); Grimont e Weill (2007)

O papel histórico do Centro de Colaboração da Organização Mundial de Saúde (WHOC-Salm) tem sido manter uma lista dos sorovares de *Salmonella* conhecidos. Desde sua fundação estiveram a cargo:

- F. Kauffmann (*Statens Serum Institut*, Copenhagen, Dinamarca): 1934-1965;
- L. Le Minor (*Institut Pasteur*, Paris): 1965-1989;
- M.Y. Popoff (*Institut Pasteur*, Paris): 1989-2003; e
- P.A.D. Grimont and F.-X. Weill (*Institut Pasteur*, Paris): 2003-2007

A primeira publicação do esquema de Kauffmann-White listava 44 sorovares. Quando Kauffmann se aposentou em 1964 o esquema continha 958 sorovares. Le Minor publicou um suplemento anual, quando ele se retirou haviam 2267 sorovares registrados e quando Popov deixou o Instituto esse número subiu para 2555 sorovares.

Como Le Minor descreveu a maioria dos sorovares existentes, as fórmulas antigênicas se descrevem atualmente como pertencentes ao esquema de Kaufmann-White-Le Minor.

O grupo O, foi designado por letras. Desde que não existam letras suficientes, foi necessário continuar com números de 51 a 67. Porém é mais lógico designar cada grupo O usando a característica do fator O. As letras se mantêm provisoriamente entre parênteses. Exemplo O:4 (B); O:18 (K). Tem sido recomendado abandonar a designação por letras (GRIMONT; WEILL, 2007). A Tabela 3.3 mostra as antigas e as novas denominações.

Tabela 3.3 – Denominações antigas e novas dos sorovares de *Salmonella*

Antiga	Nova	Antiga	Nova	Antiga	Nova
A	2	G1-G2	13	Q	39
B	4	H	6,14	R	40
C1-C4	6,7	I	16	S	41
C2-C3	8	J	17	T	42
D1	9	K	18	U	43
D2	9,46	L	21	V	44
D3	9,46,27	M	28	W	45
E1-E2-E3	3,10	N	30	X	47
E4	1,3,19	O	35	Y	48
F	11	P	38	Z	50

Fonte: Grimont e Weill, 2007

3.2.2 Estruturas antigênicas

De acordo com Tizard (1985), as três estruturas antigênicas principais das superfícies bacterianas são: a parede celular; a cápsula e os flagelos. A parede celular de organismos Gram-negativos é uma estrutura polissacarídica-lipídica-proteica; os antígenos da parede celular são tóxicos (endotoxinas) e coletivamente classificados como antígeno O; e os flagelos bacterianos consistem de proteínas sendo totalmente antigênicos e conhecidos como antígeno H.

As bactérias do gênero *Salmonella* sp. são bastonetes gram-negativos, não esporulados, com flagelos peritríquios móveis, exceto os sorotipos *Pullorum* e *Gallinarum*, aeróbicos e anaeróbicos facultativos. As colônias crescem bem em meios de cultura para enterobactérias, à temperatura de 37°C e pH entre 4,5 e 9,5; medem de 2-4 mm de diâmetro; são arredondadas com bordas lisas, um pouco elevadas e brilhantes (HOLT, 1994; D'AOUST, 2001). Seu perfil bioquímico caracteriza-se por produção de ácido sulfídrico e gás carbônico a partir da glicose e outros carboidratos, exceto a lactose e a sacarose. Além disso, são oxidase e catalase positivas e capazes de se multiplicarem utilizando o citrato como única fonte de carbono. Em geral produzem ácido sulfídrico (H₂S), descarboxilam a lisina e a ornitina e não hidrolisam a uréia (QUINN, 1994; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

As salmonelas são capazes de resistirem por até nove meses sob solos úmidos, na água e em insumos para alimentação animal. Essas enterobactérias são sensíveis à luz solar e aos desinfetantes mais utilizados nas indústrias tais como fenóis, clorados e iodados. São capazes de permanecerem viáveis por 13 meses a -21°C no ambiente. Entretanto, são destruídas a 60°C por cinco minutos (OLIVEIRA, 2000).

No processo infeccioso é necessário uma interação entre o hospedeiro e o microrganismo, e uma série de eventos tais como: adesão, invasão, replicação, resistência aos mecanismos de defesa e dano ao hospedeiro (OCHOA; RODRÍGUEZ, 2005), para permitir a entrada, multiplicação e disseminação da bactéria no organismo.

A sobrevivência de um microrganismo em um determinado nicho depende da sua habilidade para aderir-se, favorecendo a invasão bacteriana e sobrevivência dentro das células do hospedeiro. Nas bactérias pode-se encontrar uma ampla

variedade de adesinas, nos quais em bactérias Gram negativas são: fímbria, fibrila, flagelo, lipopolissacarídeo (LPS) e cápsula (HULTGREN; JONES; NORMARK, 1996; OCHOA; RODRÍGUEZ, 2005). A presença de cápsula e flagelo em *Salmonella* depende da espécie, somente *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin* apresentam cápsula e todas as salmonelas são consideradas móveis com exceção da *S. Gallinarum*. Estudos recentes mostram que *S. Pullorum* tem motilidade em ágar semisólido ou em ágar Hektöen, inclusive em estudos de microscopia eletrônica se tem observado um flagelo pequeno e deformado (HUMPHRIES et al., 2001).

As fimbrias são uma das mais importantes estruturas de superfície para garantir a fixação bacteriana na célula.

Tabela 3.4 - Algumas fimbrias reportadas em *Salmonella*

Fímbrias	Função
pef ^a	Adesão ao revestimento interno do intestino delgado em camundongos
lpf ^b	Codifica a fimbria polar longa e está envolvido na colonização intestinal em camundongos
fim ^c (Tipo 1)	Aderências às células epiteliais intestinais, importante durante a colonização bacteriana na mucosa do intestino e pode potencializar a virulência das enterobactérias
agf ^d	Associada com a persistência inicial no trato gastrointestinal das aves
sef ^e	O operon <i>sef</i> contém quatro genes, <i>sefC</i> codifica uma proteína de membrana externa que conduz a subunidade Sef A e a adesina Sef D para a superfície celular

Fontes: Kwag et al., 2008; Ledeböer et al., 2006; van der Velden et al., 1998

Notas: ^apef(fimbria encoded plasmid)

^blpf(long polar fimbria)

^cfim (type I fimbriae)

^dagf (thin aggregative fimbria)

^esef (*Salmonella* fimbrial)

Sorotipos de *Salmonella* são determinados pelos antígenos somáticos e flagelares. Genes responsáveis pela expressão de antígenos “O” se localizam no “cluster” *rfb*. Os antígenos flagelares “H” da fase 1 e fase 2 se expressam alternativamente por um mecanismo de variação de fase, os genes responsáveis por cada fase são *fliC* e *fljB*, respectivamente (ECHEITA et al., 2002). FliC é uma

proteína denominada flagelina. Existem algumas evidências que indicam que o flagelo é importante após a invasão de tecidos internos (LEDERBERG; LINO, 1956).

A *Salmonella* deve passar barreiras e manipular as células do hospedeiro em sítios específicos ao longo do curso da infecção, ela inicia seu ciclo invadindo o hospedeiro através do tecido linfóide, incluindo as placas de Peyer e tonsilas cecais nas aves (GALÁN; SANSONETTI, 1996; JENSEN et al., 1998; MURRAY et al., 1998).

Os mecanismos de patogenicidade com que a *Salmonella* induz diarreia e defesa do hospedeiro (D'AOUST, 1997), embora muito deles sejam capazes de ativar o sistema imune, como por exemplo as fímbrias (HUMPHRIES et al, 2001).

Plasmídios de virulência são estruturas citoplasmáticas de DNA que se replicam independentemente do cromossomo bacteriano. A presença dentro do gênero é limitada e foi confirmada em *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, *S. Cholerae-suis* e *S. Abortus-ovis* (GUINEY et al., 1994; RYCHLIK; GREGOROVA; HRADECKA, 2006). Sugere-se que o plasmídio de virulência facilite a multiplicação dentro da célula do hospedeiro e possa destruir o mecanismo de defesa do hospedeiro (KOWARZ et al., 1994; LIBBY et al., 2000; TAIRA et al., 1995). O operon *spv*, presente em plasmídio, consiste em um grupo de genes que codificam proteínas para a multiplicação da bactéria no tecido retículo-endotelial do hospedeiro, aumentando o potencial invasivo de *S. Typhimurium* (FIERER et al., 1992; POPOFF; NOREL, 1992).

As ilhas de patogenicidade (SPI – *Specific Pathogenicity Island*) se constituem em um grupo de genes envolvidos na codificação de fatores específicos de virulência (GROISMAN; OCHMAN, 1996; MARCUS et al., 2000; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000). Atualmente sabe-se que a *Salmonella* conta com 17 ilhas de patogenicidade que codificam os mais proeminentes fenótipos de virulência (SAROJ et al., 2008). A grande quantidade de ilhas de patogenicidade identificadas é uma indicação da capacidade de adaptação desta bactéria, alguma delas e suas funções estão descritas na Tabela 3.4. As ilhas de patogenicidade SPI-15, SPI-16 e SPI-17 foram caracterizadas por Vernikos e Parkhill em 2006.

A SPI-1 é necessária para que se produza a infecção intestinal, mediando a invasão de células não fagocíticas pela *Salmonella*, ela contém pelo menos 29 genes que codificam os componentes estruturais de um sistema de secreção tipo III (SSTIII) (*invA*), proteínas que formam um poro (*sipB*, *sipC*), por onde penetram no

citosol da célula eucariota proteínas efetoras secretadas por este sistema (*spt*, genes *sip*) e proteínas reguladoras (COLLAZO; GÁLÁN, 1997).

As funções de virulência de cada uma destas ilhas de patogenicidade estão sumarizadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Características de algumas ilhas de patogenicidade de *Salmonella*

Ilhas de Patogenicidade	Funções de virulência
SPI-1	Sistema de Secreção do Tipo III. Iron uptake
SPI-2	Sistema de Secreção Tipo III
SPI-3	Mg uptake
SPI-4	Sistema de Secreção do Tipo I
SPI-5	Proteínas efetoras do SSTIII
SPI-6	Fímbrias
SPI-7	Antígeno Vi, fago <i>sopE</i> codifica a proteína efectora <i>sopE</i>
SPI-8	Genes bacteriocina
SPI-9	Sistema de Secreção Tipo I
SPI-10	Fimbrias <i>sef</i>
SPI-11	Sobrevivência no macrófago e infecção sistêmica
SPI-12	Proteína efectora do Sistema de Secreção Tipo II
SPI-13	18 genes identificados e somente 3 associados com virulência <i>gacD</i> , <i>gtrA</i> e <i>gtrB</i> em <i>S. Gallinarum</i>
SPI-14	Genes <i>gpiAB</i>

Fontes: Adaptado de Hensel, 2004; Morgan, 2007.

A SPI-2 está relacionada com a capacidade da bactéria sobreviver no interior dos macrófagos e de multiplicar-se dentro de vacúolos contendo *Salmonella* (SCV), resultando na infecção sistêmica (HENSEL, 2000; SCHMIDT; HENSEL, 2004).

A principal função de virulência da SPI-3 está codificada pelo operon *mgtCB*, um sistema de alta afinidade pelo Mg^{2+} , implicado na adaptação das limitações nutricionais do hábitat intrafagossômico (SCHMIDT; HENSEL, 2004). A SPI-3 também é requerida para a sobrevivência intracelular em macrófagos (BLANC-POTARD et al., 1999).

Como a *Salmonella Typhimurium* é capaz de induzir apoptose dos macrófagos infectados, se postula que SPI-4 estaria implicada na secreção de uma citotoxina, além de participar na adaptação da *Salmonella* ao ambiente intracelular nos macrófagos (OCHOA; RODRÍGUEZ, 2005; SCHMIDT; HENSEL, 2004). A SPI-5

codifica proteínas efetoras envolvidas na secreção fluida e reação inflamatória da mucosa intestinal, como o *sopB* (DEVINNEY et al., 2000).

As SPI-1 e 2 codificam componentes do sistema de secreção tipo III (SSTIII) que se ativa quando a bactéria se encontra intracelularmente dentro de um vacúolo, secretando proteínas para dentro de células do hospedeiro (HUECK, 1998; MILLS et al., 1995). O sistema é composto por aproximadamente 20 proteínas, a maioria localizada na membrana interna (LEE; SCHNEEWIND, 2001; HUECK, 1998; MARIE et al., 2003). Algumas das proteínas têm sido identificadas como: *AvrA*, *SipA*, *SipB*, *SipC*, *SipD*, *SopA*, *SopB*, *SopD*, *SopE*, *SopE2* e *SptP*.

Tabela 3.6 - Algumas proteínas secretadas pelo Sistema de Secreção Tipo III (SSTIII) da Ilha de Patogenicidade 1 (SPI-1) de *Salmonella* spp.

Proteínas	Funções
<i>SipB</i>	Translocação, Apoptose
<i>SipC</i>	Translocação,
<i>SptP</i>	Desorganização do citoesqueleto, Colonização esplênica
<i>SopE</i>	Reorganização do citoesqueleto, Invasão
<i>SopB</i>	Invasão, Sinalização transepitelial de células polimorfonucleadas (PMN)
<i>AvrA</i>	Inibe a ativação do fator de transcrição NF-B, Aumenta a apoptose nas células epiteliais humanas

Fonte: Darwin e Miller, 1999.

3.2.3 Patogenicidade

A transmissão de *Salmonella* sp. ocorre, usualmente, pela via oral. Há também suspeitas de infecção via membranas mucosas, conjuntivas e pelo trato respiratório superior. A ocorrência da doença entérica se dá com a colonização do intestino delgado distal e início do cólon. Desequilíbrios da flora intestinal e peristaltismo reduzido são alguns dos fatores que colaboram para a colonização pelas salmonelas (QUINN, 1994). A capacidade de um microrganismo obter sucesso na invasão de seus hospedeiros está diretamente relacionada aos seus fatores de virulência. Dentre estes, estão as fímbrias, as proteínas efetoras, os lipopolissacarídeos e os antígenos de superfície (OCHOA; RODRIGUEZ, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Figura 3.1 – Localização de fatores de virulências representativos de *S. enterica* (Madingan et al., 2004, modificado)

As fimbrias estão associadas à adesão em diferentes células epiteliais e possivelmente, à matriz celular, fato que facilita a entrada e permanência das bactérias no organismo alvo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). As proteínas de superfície estão associadas à colonização do ceco e na excreção prolongada de *Salmonella* sp. nas fezes (CAMPOS, 2005). Além disso, os sorotipos de *Salmonella* sp. são capazes de sobreviver e se multiplicar também nos macrófagos, fato que auxilia na sua manutenção e replicação no hospedeiro (ZHOU; GALÁN, 2001). A patogênese da *Salmonella* sp. está diretamente relacionada com a translocação de proteínas bacterianas para o interior da célula eucariótica e com a conseqüente alteração das funções celulares (QUINN, 1994).

As bactérias de *S. enterica* expressam pelo menos dois tipos de sistemas de secreção de proteínas do tipo III (SSTIII), e que estão localizadas em ilhas de patogenicidade designadas por SPI-1 e SPI-2 (*Specific Pathogenicity Island*). Tais sistemas possuem funções diferenciadas no ciclo patogênico: a expressão do SSTIII, codificado em SPI-1, é necessária para iniciar a entrada nas células epiteliais intestinais modulando uma variedade de processos celulares e a de SPI-2 assume importância após a internalização da bactéria para assegurar a replicação dentro das células e para o estabelecimento da infecção sistêmica (LARA TEJERO;

GALÁN, 2009; SANO et al., 2007; SANTOS et al., 2007). O sistema de secreção do tipo III é composto por um complexo de 20 proteínas que formam um canal na membrana da célula hospedeira. Uma vez formado, permite a exportação de outras proteínas, incluindo aquelas destinadas à captação da bactéria pela célula hospedeira (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). A interação de *Salmonella* sp. com a célula hospedeira induz uma gama de respostas celulares, dentre elas um rearranjo profuso do citoesqueleto de actina (PATEL; GALÁN, 2005), o qual leva à interiorização da bactéria. Outra reação provocada na célula é a produção de citocinas da resposta inflamatória, associadas à inflamação intestinal, diarreia e, nos casos crônicos, formação de fibrose com prejuízo da absorção (GOMEZ; CLEARY, 1998; ZHOU et al., 2001).

Depois de entrar no hospedeiro, a bactéria pode aderir-se diretamente à célula hospedeira ou à matriz extracelular. Quando o tecido está lesado a matriz extracelular subjacente é exposta. Após a ingestão de água e alimento contaminado, a *Salmonella* inicia seu ciclo de infecção invadindo o hospedeiro através do tecido linfóide, incluindo as placas de Peyer e tonsilas cecais nas aves, aderem-se apicalmente as células epiteliais do íleo e as células M que devido a ausência de borda assim como de glicocálix representam uma porta de entrada ideal para as enterobactérias (JENSEN et al., 1998; JEPSON; CLARK, 1998; ZHANG-BARBER; TURNER; BARROW, 1999).

A *Salmonella* spp. pode invadir várias linhas celulares e estimular mais de um caminho de transdução de sinais para promover sua entrada nas células do hospedeiro. Os mecanismos de patogenicidade com que a *Salmonella* induz diarreia e septicemia não têm sido descritos detalhadamente, porém parece ser um fenômeno complexo que envolve diversos fatores de virulência (GALÁN; SANSONETTI, 1996).

A *Salmonella* produz efeitos citotóxicos que resultam na destruição das células M e na invasão de enterócitos adjacentes tanto pelo lado apical como basolateral, induz apoptose de macrófagos ativados mediante a proteína efetora SipB (*Salmonella* invasion protein) e fagocitose induzida nos macrófagos não ativados, para poder ser transportada ao fígado e baço (CHEN; KANIGA; GALÁN; SANSONETTI, 1996; COTTER; DIRITA, 2000; MONACK et al., 2000).

A patogenicidade das salmonelas, ou seja, o estabelecimento dos sintomas de salmonelose, bem como a sua gravidade, varia de acordo com o

sorotipo de *Salmonella* spp. envolvido e com a competência dos sistemas de defesa específicos e inespecíficos do indivíduo afetado (FRANCO; LANDGRAF, 1996; CAMPOS, 2002). Estudos recentes mostraram que a resposta do hospedeiro à infecção por *Salmonella* spp. é complexa e envolve alguns aspectos de imunidade mediada por células (BABU et al., 2003; 2004).

3.2.4 Invasão dos órgãos e colonização do trato gastrointestinal em aves

A colonização intestinal por possuir um grande e diversificado número de bactérias é achado normal nas aves. Entre as bactérias capazes de colonizar o trato intestinal da galinha encontram-se diferentes sorovares de *Salmonella* causadores de infecções em humanos (NURMI; RANTALA, 1973; PIVNICK et al., 1982). Esta bactéria é hábil em explorar as funções celulares pré existentes do hospedeiro e usar estas funções para seu próprio benefício (DARWIN; MILLER, 1999).

A infecção do trato digestivo de frangos de corte por salmonelas paratífóides resulta na colonização intestinal, sendo mais eficaz e persistente no ceco e no inglúvio, locais de importância na patogenia das infecções paratífóides das galinhas (GAST; GUARD-BOULDIN; HOLT, 2005; HARGIS et al., 1995). A mucosa cecal é o local de maior colonização por *Salmonella* spp. e por outras espécies patogênicas da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, quando comparado com outros locais do trato digestivo (ANDREATTI FILHO; SILVA; BALEN, 1993) e sua colonização é utilizada como parâmetro para avaliar a eficácia de tratamentos contra salmonelose (CORRIER et al., 1990). Essa característica relaciona-se com a presença de receptores específicos no órgão e com a fisiologia do peristaltismo cecal, que determinam maior tempo de permanência do bolo alimentar e pH, entre outros fatores (McHAN et al., 1989).

A frequência e a duração da colonização intestinal nos lotes de aves são influenciadas pela idade, linhagem genética, *status* imunitário, amostra e dose de *Salmonella* spp. aos quais eles foram expostos (GAST; GUARD-BOULDIN; HOLT, 2005).

A *Salmonella* spp. invade rapidamente os tecidos do hospedeiro, sendo o intestino o órgão de predileção, onde a bactéria instala-se e reproduz-se. Se o

agente, porém, ingressar em capilares sanguíneos, poderá ocorrer a forma sistêmica e lesões hepáticas podem ser observadas, como o aumento do volume do órgão e formação dos nódulos paratíficos, bem como pneumonia lobular grave (POPIEL; TUMBULL, 1985; SATO et al., 1997).

Os macrófagos são os maiores efetores contra infecção por *Salmonella* spp. e também transportam a bactéria entre os tecidos do hospedeiro (VASQUEZ-TORRES et al., 1999), incluindo o trato reprodutivo da galinha (OKAMURA et al., 2001), e suprem um sítio protegido para replicação bacteriana intracelular (RICHTER-DAHLFORS et al., 1997).

As bactérias se aderem à mucosa através de polissacarídeos (moléculas de açúcares ramificadas), que se estendem da parede externa da bactéria formando uma estrutura, denominada glicocálix ou fímbria, que envolve a célula ou mesmo uma colônia de bactérias. Tal aderência à mucosa intestinal parece ser o mecanismo chave tanto para a colonização das bactérias patogênicas quanto para os efeitos nocivos sobre a saúde do animal (MACARI; MAIORKA, 2000). De acordo com Kramer et al. (2003), a aderência e a entrada da *Salmonella* spp. na célula eucariótica é um processo passivo ou induzido ativamente pela própria bactéria. Estudos *in vitro* mostram que, a *Salmonella* spp. induz o seu engolfamento, pela célula epitelial, em um processo ativo que requer gasto de energia pela célula hospedeira (CAMPOS, 2002).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria invasora e pode localizar-se no ovário das aves (TURNBULL; SNOEYENBOS, 1974; TURNBULL; RICHMOND, 1978), sendo transmitida aos ovos de forma vertical (via ovo) (METHNER; al SHABIBI; MEYER, 1995) e/ou horizontal, ocorrência freqüente na contaminação de ovos.

A salmonelose tem um período de incubação em média de 12 a 36 horas, possuindo extremos de 6 a 72 horas, onde a gastroenterite persiste de 24 a 72 horas. A dose infectante é de 10^5 a 10^8 microrganismos (CAFFER; TERRAGNO, 2001), podendo variar de acordo com a virulência do sorotipo, a sensibilidade do indivíduo e o alimento veiculado (ADAMS; MOSS, 1995). A susceptibilidade da ave à colonização intestinal por *Salmonella* spp. é maior durante os primeiros dias de vida, reduzindo-se à medida que ocorre o crescimento da microbiota intestinal normal (NURMI; RANTALA, 1973; PIVNICK et al., 1982).

Nas aves infectadas, as lesões macroscópicas que podem ser observadas na necropsia são: pele flácida com sinais de desidratação, saco da

gema coagulado ou não absorvido, congestão do fígado e do baço com pequenos pontos branco-acinzentados de áreas de necrose, perihepatite, rins congestos, pericardite com aderências, peritonite acompanhada, ocasionalmente, por focos necróticos e exsudato caseoso nos cecos (FERREIRA et al., 1990; BERCHIERI JÚNIOR, 1991; SILVA, 1991; BERCHIERI JÚNIOR; BARROW, 1995; NAVARRO, 1995; SILVA, 1996).

3.3 SALMONELAS PARATIFÓIDES EM AVES

Dentre os sorotipos de *Salmonella* causadores de grande impacto na avicultura, destacam-se as salmonelas específicas das aves: *Salmonella enterica* sorovar Pullorum e *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum, agentes da pulorose e do tifo aviário, respectivamente, que provocam prejuízos à avicultura em muitos países (CHACANA; TERZOLO, 2003).

Dentre as salmonelas paratifóides, destacam-se: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis; *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium; *Salmonella enterica* sorovar Infantis e *Salmonella enterica* sorovar Agona, causadoras de infecções alimentares e de grande importância em saúde pública (GAMA, 2001). Os sorotipos do grupo paratifóide não estão relacionados com enfermidades específicas, mas são potencialmente capazes de infectar, indistintamente, diversos animais e o próprio homem (LAX et al., 1995). Seu isolamento tem sido constante nos produtos de origem aviária (NASCIMENTO et al., 1997).

3.4 SALMONELLA TYPHIMURIUM EM AVES

Salmonella Typhimurium é um sorotipo ubiqüitário amplamente disseminado na natureza e de grande importância em saúde pública (LE MINOR; VÉRON; POPOFF, 1982). A grande maioria dos casos de infecções humanas por *S. Typhimurium* deve-se aos surtos de DTAs, causados pela ingestão de diversos

alimentos contaminados (CDC, 2003; CDC, 2004; CDC, 2006; de VALK, 2000; HORBY, 2003; VILLAR et al., 1999).

Em pintinhos recém-eclodidos, a infecção por *S. Typhimurium* provoca doença sistêmica com inflamação generalizada e patologia do fígado, baço e trato gastrointestinal resultando em uma alta taxa de mortalidade em pintos (WITHANAGE et al., 2004). Em contrapartida, as aves de 1 semana de idade apenas desenvolvem uma infecção sistêmica limitada, porém o trato gastrointestinal pode permanecer colonizado por muitas semanas (WITHANAGE et al., 2005). Embora os fatores de virulência de infecção por *S. typhimurium* em camundongos e bovinos têm sido amplamente estudados, em aves o seu papel ainda não tem sido bem compreendido (WALLIS; GALYOV, 2000).

3.5 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

As salmonelas são amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato intestinal do homem e dos animais os principais reservatórios naturais. Entre os animais, as aves (galinhas, perus, patos, gansos) são os reservatórios mais importantes, porque podem ser portadores assintomáticos, excretando continuamente *Salmonella* spp. nas fezes. Os suínos, bovinos, eqüinos e animais silvestres (roedores, anfíbios e répteis) também apresentam salmonelose e os animais domésticos (cães, gatos, passarinhos) podem ser portadores de *Salmonella* spp. (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Alguns sorotipos de *Salmonella* spp. têm um reservatório animal específico. Dessa forma, sua transmissão está vinculada a alimentos obtidos desses animais (BAÚ et al., 2001).

Do ponto de vista epidemiológico, a *Salmonella* spp. pode ser classificada em três grupos: as que não têm preferência por algum hospedeiro em especial, podendo infectar o homem e os animais; as que infectam só o homem (*Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A e *Salmonella* Paratyphi C) e que se transmitem de forma direta ou indireta de uma pessoa para outra; as que estão adaptadas a um hospedeiro em espécie animal: *Salmonella* Abortusovis (ovinos), *Salmonella*

Abortusequi (eqüinos) e *Salmonella* Gallinarum (aves) (CAFFER; TERRAGNO, 2001).

Carvalho et al. (2001) afirmam que as fezes podem constituir o fator principal na instalação e/ou disseminação de *Campylobacter* e *Salmonella* dentro de um galpão e que suas camas podem atuar na transmissão e / ou manutenção desses microrganismos no plantel. O *Campylobacter* e *Salmonella* são agentes conhecidos como causadores de gastroenterite bacteriana aguda em humanos e os produtos avícolas crus têm sido implicados como uma fonte importante dessas infecções (COX et al., 2005).

A epidemiologia das infecções por *Salmonella* spp. em aves é bastante complexa (HINTON, 1988), sendo difícil determinar como um lote foi infectado ou como ocorre a disseminação bacteriana no plantel. A persistência de *Salmonella* spp. no ambiente é uma importante característica na sua epidemiologia (WRAY, 1975; GUARD-PETTER, 2001). A *Salmonella* pode infectar um lote de aves e invadir lotes vizinhos sem apresentar nenhum sinal da doença. Essa infecção inaparente não se limita ao intestino, estendendo-se também aos órgãos internos, incluindo o sistema reprodutivo, com conseqüente contaminação da progênie ou de ovos comerciais para consumo humano (PEREIRA et al., 1999).

Segundo Kampelmacher (1987), as três maiores fontes de salmonelas para aves de interesse comercial são a introdução de lote contaminado, o ambiente e a ração contaminada. As aves jovens são infectados facilmente, excretam a bactéria por longos períodos e apresentam a doença na forma mais severa, enquanto aves adultas são mais resistentes à infecção e para manifestarem a doença (BARROW, 1992; NAGAJARA; POMEROY; WILLIAMS, 1991).

As salmonelas podem infectar as aves vertical e horizontalmente. De acordo com Gantois et al. (2009), os ovos podem ser contaminados na superfície da casca externa e internamente. Contaminação interna pode ser o resultado de penetração da casca ou pela contaminação direta do conteúdo dos ovos antes da oviposição, proveniente de infecção dos órgãos reprodutivos. Uma vez dentro do ovo, as bactérias precisam lidar com fatores antimicrobianos do albúmen e da membrana vitelínica antes da migração para a gema (GANTOIS et al, 2009).

A porosidade, espessura da casca, rachaduras e trincas na casca do ovo favorecem ainda mais a penetração bacteriana no ovo (NASCIMENTO et al., 1998; SONCINI; BITTENCOURT, 2003). Gantois et al. (2009) acreditam que o sorotipo

Enteritidis possuem características intrínsecas que permitem uma associação epidemiológica com ovos de galinha, que ainda estão indefinidos. Há indícios de que ataques por *Salmonella* Enteritidis sobrevivem com a ajuda de moléculas antimicrobianas durante a formação do ovo no oviduto da galinha e no interior do ovo, parecendo exigir uma combinação única de genes que codificam para uma melhor proteção da parede celular e reparação de dano celular e molecular, entre outros.

Muitas amostras de salmonela podem sobreviver por longos períodos de tempo na água e em materiais secos como poeira. Elevado número de microrganismos sobrevive no ambiente, em estado de latência, podendo multiplicar-se rapidamente se houver condições favoráveis. Essa habilidade especial, junto com a contribuição de vetores de vida livre, representa um problema real para o controle das salmonelose no ambiente avícola (LIEBANA et al., 2003).

A via horizontal tem como fonte de infecção: a ração e suas matérias primas; aves estranhas à criação; animais de estimação; veículos e seres humanos. A disseminação ocorre através das fezes, contaminando água, ração, cama, mosquitos e besouros, pó do galpão, ovos e roedores (BERCHIERI JÚNIOR, 1999).

Cox et al. (1990) mostraram que 75 % das amostras de fragmentos dos ovos, "pool" de material e de papel em incubadoras comerciais continham *Salmonella* spp., indicando muitas oportunidades para a contaminação de ovos recém incubados.

A contaminação externa da casca de um ovo íntegro pode resultar no estabelecimento da infecção no pinto durante a incubação. A contaminação horizontal dentro de incubadoras também é freqüente (BAILEY; COX; BERRANG, 1994; CASON et al., 1994), ocorrendo contaminação externa da casca e, conseqüentemente, penetração da bactéria através dos poros dos ovos. Nas incubadoras, ovos contaminados, especialmente aqueles contendo gás formado pela bactéria, contaminarão outros ovos (ROY et al., 2002).

A transmissão da *Salmonella* Enteritidis na forma vertical e horizontal constitui um importante risco na saúde dos plantéis avícolas e na saúde pública (SANTOME et al., 1999). A *Salmonella* spp. já foi isolada de *Alphitobius diaperinus* e sua presença é rotineiramente verificada na cama dos aviários através de pesquisa bacteriológica (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002). Skov et al. (2004) estudando o papel dos pequenos besouros como potencial reservatório de *Salmonella* enterica e

Campylobacter spp. entre lotes de frango, mostraram que os besouros podem estar positivos para os dois patógenos e funcionar como veículo transmissor.

Henzler e Optiz (1992) e Davies e Wray (1995) descreveram o importante papel do rato na disseminação e persistência de *Salmonella* Enteritidis em fazendas avícolas. Liebana et al. (2003) realizaram estudos moleculares para avaliar a contribuição de vetores de vida livre, na manutenção de infecção em granjas de poedeiras, por *Salmonella* Enteritidis, e concluíram que, em todas as granjas estudadas, foi isolada *Salmonella* tanto das amostras de populações de roedores residentes quanto do ambiente, sendo possível que a virulência da *Salmonella* Enteritidis aumente em decorrência da seleção ou passagem na população de ratos (GUARD-PETTER et al., 1997).

Em infecções humanas, as manifestações clínicas por salmonela variam de leves sinais intestinais à septicemia, com óbitos, em geral, restritos a recém-nascidos, idosos e pessoas imunocomprometidas. A diarreia é o principal sintoma e, na maioria dos casos, ocorre a cada 10-15 minutos, por várias horas, passando a ocorrer de duas a três horas, por um dia ou mais, e depois de duas a três vezes ao dia, por vários dias. Dores abdominais, cólicas, febre, náusea, vômito e dor de cabeça também podem manifestar-se (PELZER, 1989; SILVA, 1991).

Nos EUA, os custos médicos e as perdas de produtividade devido à infecção por *Salmonella* spp., foram estimados em um bilhão de dólares em 1987 (ROBERTS, 1988) e aumentaram para quatro bilhões em 1994.

Taunay et al. (1996) analisaram as alterações ocorridas na frequência dos sorotipos de *Salmonella* spp. isolados no período de 1950 a 1990, no estado de São Paulo, provenientes de infecções humanas e não humanas e observaram que no período de 1950-66 não houve predomínio de nenhum sorotipo, entretanto no período de 1970-76 a *Salmonella* Typhimurium passou a ser o sorotipo predominante com 77 % dos isolados.

3.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das infecções por *Salmonella* spp. é realizado através do isolamento e identificação do agente (CAMPOS, 2002). Estes devem ser realizados

em conjunto com a investigação epidemiológica na ocorrência e surtos de doenças. Para a identificação de determinado agente, faz-se necessário o conhecimento dos aspectos positivos e negativos de cada método diagnóstico disponível, de forma que a escolha do procedimento seja adequada a cada situação (BARON et al., 1994).

Os órgãos de predileção para o isolamento de *Salmonella* são o baço, fígado, coração, conteúdo intestinal, saco da gema, medula óssea, pulmão e locais lesionados, como a articulação (artrite) e os sacos aéreos (aerossaculite) (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

No Brasil, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) - Portaria nº 193 (BRASIL, 1994), criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), adotou normas que considerou importantes para tentar prevenir ou controlar a presença de *Salmonella* em aves e produtos alimentícios de origem aviária (PNSA) - Portaria nº 8 (BRASIL, 1995). Essas normas contêm recomendações sobre a rotina bacteriológica para a pesquisa de *Salmonella* (NASCIMENTO et al., 2000).

Segundo NAVARRO (1994), a detecção e identificação adequada de *Salmonella* são partes fundamentais no controle e prevenção da infecção. A identificação rápida e precisa ajudará na erradicação, mediante a destruição oportuna das aves infectadas, na implementação de medidas de controle em lotes infectados e na prevenção em lotes susceptíveis. Dessa forma, deve-se detectar a presença de *Salmonella* spp. no meio ambiente (cama), nas aves (órgãos internos) e em amostras de ovos frescos ou embrionados, sendo esta a forma mais direta para demonstrar que um lote de aves está transmitindo a *Salmonella* spp. através dos ovos.

Os métodos para o isolamento e identificação da *Salmonella* spp. de acordo com ISO 6579:2002 Amd 1:2007, obedecem às seguintes etapas: pré-enriquecimento; enriquecimento em caldo seletivo; plaqueamento e identificação presumtiva; confirmação bioquímica (LOGUERCIO et al., 2002); classificação sorológica e sorotipagem.

O isolamento e a identificação de *Salmonella* são processos demorados devido ao tempo necessário para obtenção dos resultados, sendo um dia para a etapa de enriquecimento seletivo, além de dois a três dias para as etapas de isolamento em ágar seletivo, identificação bioquímica e confirmação com testes sorológicos (ISO, 1993; CARDOSO; TESSARI, 2004; NAVARRO, 1994).

O pré-enriquecimento, geralmente, é empregado na análise de material desidratado ou quando é necessário para viabilizar o início da pesquisa da bactéria (NASCIMENTO et al., 2000), objetivando recuperar as células de *Salmonella* spp. que, normalmente, estão presentes em pequenas quantidades e em condições debilitadas nos alimentos processados. Foi demonstrado que o pré-enriquecimento de amostras avícolas e amostras do ambiente avícola aumentam a recuperação de *Salmonella* spp. de 10 para 25 % (THOMASON et al., 1977; THOMASON; DODD, 1978). As demais etapas da seqüência bacteriológica são elementares.

O enriquecimento e o plaqueamento são as etapas com maior número de possibilidades de meios de cultivo (FLOWERS et al., 1992; WRAY; DAVIES, 1994), pois essas etapas devem auxiliar no desenvolvimento e recuperação da bactéria, ao mesmo tempo em que devem impedir o desenvolvimento de microrganismos competidores.

O enriquecimento em caldo seletivo tem como objetivo inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella* spp. Nessa etapa recomenda-se a utilização de dois meios de enriquecimento, porque a resistência de *Salmonella* spp. aos agentes seletivos varia de cepa para cepa. Os meios de enriquecimento mais comuns são os caldos Selenito Cistina (SC), Tetrationato (TT), Rappaport-Vassiliadis (RV) e seus derivados acrescidos, ou não, de Novobiocina (NASCIMENTO et al., 2000).

O plaqueamento seletivo diferencial visa promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella* spp., com características típicas que as diferenciem dos microrganismos competidores, possuindo fatores inibitórios ao crescimento de outras bactérias (RALL et al., 2005). Os meios de cultivo para plaqueamento são muitos e os mais comumente utilizados são Ágar Verde Brilhante (VB), Ágar de MacConkey (MC), Ágar Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT₄), Ágar *Salmonella-Shigella* (SS), Ágar de Hektoen (HE) e Ágar Xilose Lactose Desoxicolato (XLD) (NASCIMENTO et al., 2000).

Os testes bioquímicos permitem analisar o perfil metabólico dos microrganismos pesquisados e seus resultados são comparados com aqueles descritos na literatura, permitindo a identificação (OLIVEIRA, 2000).

As bactérias do gênero *Salmonella* podem ser também caracterizadas sorologicamente de acordo com seu antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi), tendo o esquema de Kauffmann-White como base (EVEREST et al., 2001).

Testes sorológicos são recomendados para detecção de aves portadoras de *Salmonella* spp. ou que sofreram infecções prévias e, por esta razão, apresentam anticorpos séricos (NICHOLAS et al., 1990). Para medir a resposta de anticorpos, existem diversas provas, tais como: aglutinação rápida em placas com sangue total e soro (SAR), microaglutinação e ELISA (Imunoensaio com enzimas associadas) (NAVARRO, 1994).

Mais recentemente, estão sendo desenvolvidas técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) que reduzem o tempo para um resultado negativo a um dia ou menos (COHEN et al., 1994). A técnica reproduz em tubo de ensaio o processo natural de replicação do DNA, consistindo da amplificação cíclica e exponencial “in vitro” de um dado fragmento de DNA, a partir de iniciadores (“primers”) específicos. (ROLFS et al., 1992). O uso do diagnóstico molecular, por ter o DNA como alvo, não requer um grande número inicial de bactérias para que o agente possa ser identificado (FLÔRES et al., 2003).

A PCR tem sido utilizada em estudos sobre a detecção de genes flagelares de *Salmonella*, possibilitando a identificação de cepas monofásicas e a detecção rápida de sorotipos prevalentes (ECHEITA, USERA, 1998; ECHEITA et al., 2002; ALVAREZ et al., 2004), bem como, em estudos para a identificação de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência (SANDVANG et al., 1998; BRIGGS, FRATAMICO, 1999; NG et al., 1999; KHAN et al., 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AVES

Foram utilizados pintinhos *SPF* (*Specific Pathogen Free*), *White Leghorn*, com um dia de idade obtidos do laboratório BioVet – Vargem Grande Paulista – SP. As aves foram alimentadas com ração comercial sem aditivos nem anticoccidianos e água *ad libitum*. Foram identificadas individualmente, anilhadas e alojadas em baterias de 1,7m².

4.2 AMOSTRAS BACTERIANAS

Salmonella Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Enteritidis foram utilizadas como amostras positivas para os genes *agfA*, *avrA*, *cdtB*, *fliC*, *fimA*, *invA*, *iroN*, *lpfC*, *mgtC*, *pefA*, *sefC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA*, *sopB*, *sopE1*, *sptP* e *spvC*. *Escherichia coli* K12 e *Enterococcus* spp. foram utilizadas como amostras negativas. Todas as amostras foram cultivadas em ágar Luria Bertani (LB) por 24 horas a 37°C. Foram utilizadas oito amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de aves pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Ornitopatologia / FMVZ / USP e confirmadas a sorotipagem pelo Instituto Federal de Análises de Riscos

[Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)] em Berlim na Alemanha. A tabela 4.1 apresenta o número, origem e ano de isolamento das amostras.

Tabela 4.1 – Número de amostras de *Salmonella* Typhimurium e origem

Amostras	Número de Amostras	Origem
<i>Salmonella</i> Typhimurium	8	Ceco monitoria / Aves doentes
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1	Vacina viva liofilizada*

Nota: *Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Alemanha

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

O protocolo para a extração de DNA foi realizado segundo o método descrito por Boom et al. (1990).

As amostras foram retiradas do estoque e semeadas em ágar MacConkey (37°C/24h), uma colônia de cada amostra foi cultivada em 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) por 24 horas a 37°C.

Uma alíquota de 200 µL do crescimento bacteriano, um controle positivo e um controle negativo foram colocados em microtubos de 1,5mL e adicionados 1.000 µL de tampão de lise e 40 µL de suspensão carreadora. Os microtubos foram homogeneizados por 1 minuto e mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos com a tampa fechada. Após este período foram centrifugados a 12.800 rpm / 2 min. / 4°C. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 500 µL de tampão de lavagem ao *pellet*. O microtubo foi homogeneizado por 15 segundos, em seguida centrifugado a 12.800 rpm / 2 min. / 4°C. Este procedimento foi repetido mais uma vez com tampão de lavagem e duas vezes com etanol 70% refrigerado a -20°C e uma vez

com acetona, centrifugando a 12.800 rpm / 2,5 min. / 4°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o *pellet* foi mantido em estufa a 37°C durante 30 minutos com o tubo aberto. Após a completa secagem do *pellet*, adicionou-se 150 µL de tampão de eluição, o tubo foi homogeneizado por 1 minuto e mantido em termobloco (Barnstead International) à 55°C durante 10 minutos. Em seguida, novamente homogeneizado por 15 segundos e centrifugado durante 5 minutos a 12.800 rpm / 4°C. O sobrenadante (±80 µL) foi aliqotado e centrifugado a 12.800 rpm / 5 minutos / 4°C para observar resquícios de sílica. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até ser utilizado na reação de PCR.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para os genes *agfA*, *avrA*, *cdtB*, *fliC*, *fimA*, *invA*, *iroN*, *lpfC*, *mgtC*, *pefA*, *sefC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA*, *sopB*, *sopE1*, *sptP* e *spvC*, referências e tamanho do *amplicon* encontram-se na Tabela 4.2. Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen®. A amplificação foi realizada em termociclador (Biometra), com a temperatura inicial de desnaturação de 94°C por três minutos, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. As condições de amplificação de cada gene estudado estão descritas na Tabela 4.2. Em cada amplificação adicionou-se um controle negativo (*Escherichia coli* K12 ou *Enterococcus* spp.) e um controle positivo (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 ou *Salmonella* Enteritidis) para o gene estudado. Após o término do programa os tubos

foram retirados do aparelho e guardados sob congelamento até a realização da eletroforese.

Tabela 4.2 – Sequência de *primers* utilizados para a detecção dos genes de virulência de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg, tamanho dos fragmentos, condições de amplificação e referências ou números de acesso

(continua)

Genes	Primers 5'- 3'(senso e anti-senso)	Tamanho do amplicon	Condições de Amplificação	Referências ou números de acesso
			Ciclos / temperatura de desnaturação / temperatura de hibridização / temperatura de extensão	
<i>agfA</i>	F: TGCAAAGCGATGCCCCGTAAATC R: TTAGCGTTCCACTGGTCGATGGTG	151 pb	45 / 95°C por 1' / 48°C por 45" / 72°C por 1'	BÄUMLER et al, 1997
<i>avrA</i>	F: GTTATGGACGGAACGACATCGG R: ATTCTGCTTCCCCGCCGCC	385 pb	30 / 94°C por 1' / 55°C por 1' / 72°C por 1'	PRAGER et al., 2000
<i>cdtB</i>	F: ACAACTGTCGCATCTCGCCCCGTCATT R: CAATTTGCGTGGGTTCTGTAGGTGCGAGT	268 pb	25 / 94°C por 30" / 55°C por 30" / 72°C por 1'	SKYBERG et al., 2006
<i>fimA</i>	F: CCTTTCTCCATCGTCCTGAA R: TGGTGTTATCTGCCTGACCA	85 pb	45 / 94°C por 1' / 55°C por 30" / 72°C por 1'	COHEN; MECHANDA; LIN, 1996
<i>fliC</i>	F: TGTCTTCCGGTCTGCGTATCAACA R: TGCATAGTTTCACCGTCGTTGGCA	376 pb	35 / 94°C por 1' / 54°C por 45" / 72°C por 1'30"	EF057790.1/DQ838329.1 M68548.1
<i>invA</i>	F: TTGTTACGGCTATTTTGACCA R: CTGACTGCTACCTTGCTGATG	521 pb	30 / 94°C por 1' / 60°C por 1' / 72°C por 1'	SWAMY et al., 1996
<i>iron</i>	F: ACTGGCACGGCTCGCTGTCGCTCTAT R: CGCTTTACCGCCGTTCTGCCACTGC	1205 pb	25 / 94°C por 30" / 60°C por 30" / 72°C por 2'	NC003197
<i>lptC</i>	F: GCCCCGCCTGAAGCCTGTGTTGC R: AGGTCGCCGCTGTTTGAGGTTGGATA	641 pb	25 / 94°C por 30" / 60°C por 30" / 72°C por 2'	NC003197
<i>mgtC</i>	F: TGAATATCAATGCTCCAGTGAAT R: ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG	655 pb	30 / 94°C por 1' / 60°C por 1' / 72°C por 1'	SOTO et al., 2006
<i>pefA</i>	F: GGGAATTCTTGCTTCCATTATTGCACTGGG R: TCTGTGACGCGGGGATTATTTGTAAGCCACT	520 pb	30 / 95°C por 1' / 50°C por 1' / 72°C por 1'	BÄUMLER et al, 1996
<i>sefC</i>	F: GCGAAAACCAATGCGACTGTAG R: CCCACCAGAAACATTTCATCCC	1103 pb	30 / 95°C por 1' / 50°C por 1' / 72°C por 1'	BÄUMLER et al, 1997
<i>sifA</i>	F: TGCGATGTGTGGATTAAAA R: AACAGCCGCTTTGTTGTTCT	279 pb	35 / 94°C por 1' / 54°C por 45" / 72°C por 1'30"	U51867.1
<i>sipB</i>	F: CTAAAAACGGCGGAGACA R: AATCGTTTCGCCATCA	1397 pb	33 / 95°C por 30" / 50°C por 30" / 72°C por 2'	PRAGER et al., 2000
<i>sipC</i>	F: ATGTTAATTAGTAATGTGGGA R: TTAAGCGCGAATATTGCCTGC	1225 pb	33 / 95°C por 30" / 50°C por 30" / 72°C por 2'	PRAGER et al., 2000

Tabela 4.3 – Seqüência de *primers* utilizados para a detecção dos genes de virulência de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg, tamanho dos fragmentos, condições de amplificação e referências ou números de acesso

(conclusão)				
Genes	Primers 5'- 3'(senso e anti-senso)	Tamanho do amplicon	Condições de Amplificação	Referências ou números de acesso
			Ciclos / temperatura de desnaturação / temperatura de hibridização / temperatura de extensão	
<i>sitC</i>	F: CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC R: CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768 pb	25 / 94°C por 30'' / 60°C por 30'' / 72°C por 2'	NC003197
<i>slyA</i>	F: GCCAAACTGAAGCTACAGGTG R: CGGCAGGTCAGCGTGTCGTGC	700 pb	30 / 94°C por 1' / 60°C por 1' / 72°C por 1'	U03842
<i>sopB</i>	F: AGCTATAATGCCGAGGCGCTACAT R: TTTCATGGGCTAACATGGCAAGGC	226 pb	30 / 94°C por 1' / 55°C por 1' / 72°C por 1'	AF213335.2 / AF213334.1 / M68548.1
<i>sopE1</i>	F: ACACACTTTACCGAGGAAGCG R: GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	398 pb	30 / 94°C por 1' / 55°C por 1' / 72°C por 1'	PRAGER et al., 2000
<i>sptP</i>	F: GTTGAGAGGTGGGTTGATAAAGCC R: TGGTATTGGTCTATCGCTTCTCCC	496 pb	30 / 94°C por 1' / 55°C por 1' / 72°C por 1'	PRAGER et al., 2000
<i>spvC</i>	F: CGGAAATACCATCTACAAATA R: CCCAAACCCATACTTACTCTG	669 pb	30 / 94°C por 1' / 60°C por 1' / 72°C por 1'	SWAMY et al., 1996

4.5 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO (*amplicon*)

Os produtos da PCR (10 µL) foram separados por eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose 1,5% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), com uma voltagem de 10V/1 cm de gel. Os mesmos foram corados com brometo de etídio (10 µg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta em transiluminador (Biometra T3). A visualização dos fragmentos amplificados foram feitas com a adição do corante *BlueGreen*® (LGC Biotecnologia) junto as amostras. Os marcadores de pares de bases foram utilizados de acordo com o tamanho do produto esperado, ou seja, de 50pb, 100 pb ou 1Kb DNA *ladder* (Invitrogen®).

4.6 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo de cada amostra de *Salmonella*, utilizado para os testes de patogenicidade e de colonização e invasão em aves SPF, foi preparado de acordo com seguinte protocolo:

- a) Retirou a amostra de *Salmonella* do estoque e colocou para crescer em Caldo LB a 37°C por 24 horas.
- b) Cumprido o tempo de incubação, a amostra foi semeada em uma placa de Ágar MacConkey, e incubada a 37°C por 24 horas.
- c) Em seguida, uma colônia de aproximadamente 2 mm de diâmetro, foi colocada para crescer em 2mL de caldo LB (previamente preparado e testado para

esterilidade), em uma estufa sob agitação aproximadamente a 120 rpm por aproximadamente 90 minutos.

- d) O inóculo foi titulado para confirmar o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

4.7 PATOGENICIDADE EM PINTINHOS *SPF*

Para evitar a contaminação cruzada entre as amostras de *S. Typhimurium*, cada amostra estudada foi avaliada em salas individuais em grupo de 20 aves, onde 10 aves foram infectadas via oral e 10 animais foram infectados por via subcutânea.

Pintinhos *SPF* (*White Legorhn*) de um dia de idade (n=20), foram infectados com 0,1 mL, por via oral (n=10) e 0,1 mL, por via subcutânea (n=10), com a concentração de 10^5 a 10^6 UFC *Salmonella Typhimurium* / mL. Para a infecção por via oral foram utilizadas sondas para depositar a suspensão bacteriana no inglúvio, com o auxílio de uma seringa graduada de 1 mL. Os grupos controle (n= 20) receberam meio LB por via oral ou por via subcutânea. A mortalidade foi registrada por um período de 10 dias, e os dados tabulados para estabelecer a patogenicidade da amostra. Após esse período as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical.

4.8 COLONIZAÇÃO DE CECO E INVASÃO EM FÍGADO E BAÇO POR *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM PINTINHOS SPF

Com cada perfil genético encontrado, foi determinada a capacidade de colonização em ceco e invasão em órgãos. Foram utilizados pintinhos *SPF* (*White Leghorn*) de um dia de idade (n=20), infectados com 10^5 a 10^6 UFC *Salmonella* Typhimurium / mL por via oral. Os grupos controle (n= 20) receberam meio LB por via oral. Após 24 horas (n=10) e 7 dias (n=10) da infecção foram removidos assepticamente o fígado, baço e o ceco. Os órgãos foram colocados em sacos plásticos estéreis (Inlab), previamente pesados, macerados e diluídos (1:10) com água peptonada tamponada 0,1% (Merck). Após a homogeneização, 0,1 mL foi semeado em ágar XLT4 (Difco). As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 48 horas. As colônias suspeitas foram submetidas à série bioquímica pelo sistema Lac EMIC 9T (Probac) e a reação de aglutinação com soro polivalente somático para *Salmonella* (Probac), onde as colônias foram dissolvidas em água destilada sobre uma lâmina de vidro e uma gota de soro foi adicionada. Se o resultado do teste foi positivo para *Salmonella* sp. a aglutinação foi observada em poucos instantes.

As amostras negativas no ensaio de colonização, foram enriquecidas com caldo tetracionato, incubadas por 48 horas a 37°C, para confirmar a ausência ou presença da cepa inoculada.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste de U-Mann-Whitney. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

As amostras analisadas para os genes: *agfA*, *avrA*, *cdtB*, *fimA*, *fliC*, *invA*, *iroN*, *lpfC*, *mgtC*, *pefA*, *sefC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA*, *sopB*, *sopE 1*, *sptP* e *spvC* apresentaram os seguintes resultados: todas as amostras foram negativas para os genes *sopE1* ou *spvC* (0/9). As figuras 5.1 e 5.2 apresentam estes resultados. O gene *cdtB* estava presente em apenas uma amostra (11,11%), a figura 5.3 mostra este resultado. Em duas amostras (22,22%) o gene *pefA* foi encontrado, este resultado encontra-se na figura 5.4. O gene *sefC* foi encontrado em três amostras (33,33%) como demonstra a figura 5.5. Em oito amostras (88,88%) os genes *agfA*, *fimA*, *lpfC* ou *sptP* estiveram presentes, as figuras 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9 apresentam estes resultados. Os genes *avrA*, *fliC*, *invA*, *iroN*, *mgtC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC* ou *slyA* ou *sopB* estiveram presentes em 100% das amostras analisadas, estes resultados estão presentes nas figuras 5.10, 5.11, 5.12, 5.13, 5.14, 5.15, 5.16, 5.17, 5.18, 5.19 e 5.20.

Figura 5.1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sopE1*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – *Escherichia coli* K12 (Controle negativo).

Figura 5.2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *spvC*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Enteritidis (Controle positivo); 11 – *Escherichia coli* K12 (Controle negativo).

Figura 5.3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *cdtB*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – *Escherichia coli* K12 (Controle negativo).

Figura 5.4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *pefA*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Enteritidis (Controle positivo); 11 – *Enterococcus* spp. (Controle negativo).

Figura 5.5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sefC*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Enteritidis (Controle positivo); 11 – *Enterococcus* spp (Controle negativo).

Figura 5.6 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *agfA*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – *Enterococcus* spp (Controle negativo).

Figura 5.7 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *fimA*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – *Enterococcus* spp (Controle negativo).

Figura 5.8 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *ipfC*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – *Enterococcus* spp (Controle negativo).

Figura 5.9 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *spfP*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – *Escherichia coli* K12 (Controle negativo).

Figura 5.10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *avrA*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *fliC*. M (Marcador de peso molecular 1 Kb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.12 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *invA*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.13 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *iroN*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.14 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *mgtC*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.15 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sifA*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.16 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sipB*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.17 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sipC*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.18 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sitC*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.19 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *slyA*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – Escherichia coli K12 (Controle negativo).

Figura 5.20 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação para o gene *sopB*. M (Marcador de peso molecular 100 pb); 1 – SA 002; 2- SA 003; 3 – SA 004; 4 – SA 005; 5 – SA 006; 6 – 632; 7 - SA 633; 8 - SA 634; 9 – Amostra vacinal; 10 - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); 11 – *Escherichia coli* K12 (Controle negativo).

5.2 PERFIL GENOTÍPICO DAS AMOSTRAS DE *Salmonella* Typhimurium

Dentre as amostras analisadas, observou-se a presença de quatro perfis genotípicos. Nos perfis P1, P3 e P4 apenas uma amostra (11,11%) foi detectada para cada perfil, enquanto que o perfil P2 foi constatado seis amostras (66,77%). A tabela 5.2 mostra estes resultados.

Apesar da identificação de quatro perfis genotípicos nas amostras estudadas, a avaliação dos vinte genes (*agfA*, *avrA*, *cdtB*, *fimA*, *fliC*, *invA*, *iroN*, *lpfC*, *mgtC*, *pefA*, *sefC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA*, *sopB*, *sopE 1*, *sptP* e *spvC*) demonstrou que, independentemente do perfil genético identificado todas as amostras foram negativas para os genes *sopE1* e *spvC*. A amostra SA 634 foi negativa para os genes *agfA* e *sptP*, porém a SA 003 foi negativa para os genes *lpfC* e positiva para os genes *cdtB* e *sefC*. A amostra SA 632 foi negativa para o gene *fimA* e positiva para os genes *pefA* e *sefC*. Os genes *avrA*, *fliC*, *invA*, *iroN*, *mgtC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA* e *sopB* estiveram presentes em 100% das amostras analisadas.

Tabela 5.1 – Perfis genotípicos de *Salmonella* Typhimurium encontrados nas amostras estudadas – São Paulo – 2008-2009

Perfil Genotípico	Amostras	Genes ⁽¹⁾																			
		agfA	avrA	cdtB	fimA	fliC	invA	iroN	lpfC	mgtC	pefA	sefC	sifA	sipB	sipC	sitC	slyA	sopB	sopE1	sptP	spvC
P1	SA 634	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
P2	SA 002	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	SA 004	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	SA 005	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	SA 006	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	SA 633	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	Amostra vacinal	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
P3	SA 003	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
P4	SA 632	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Nota: + (Amostras positivas); - (Amostras negativas)

(1) Considerando os genes analisados

5.3 TITULAÇÃO DO INÓCULO

Os resultados de titulação do inóculo estão descritos na tabela 5.3, realizado de acordo com o procedimento descrito no item 4.6.

Tabela 5.2 – Titulação de *Salmonella Typhimurium* desafiadas por via oral – São Paulo – 2008-2009

Amostras	Titulação do desafio (Log 10 UFC/0,1mL)
SA 002	$7,0 \times 10^5$
SA 003	$7,0 \times 10^5$
SA 004	$1,5 \times 10^6$
SA 005	$1,7 \times 10^6$
SA 006	$1,5 \times 10^6$
SA 632	$1,0 \times 10^6$
SA 633	$3,0 \times 10^5$
SA 634	$9,0 \times 10^6$
Amostra vacinal	$1,7 \times 10^7$

Nota: *SPF* (*Specific Pathogen Free*)

Log (Logaritmo)

UFC (Unidade Formadora de Colônia)

mL (Mililitro)

5.4 PATOGENICIDADE EM PINTINHOS *SPF* INFECTADOS POR VIA ORAL OU SUBCUTÂNEA

As amostras inoculadas por via oral, não causaram mortalidade de pintinhos *SPF* de um dia de idade, na titulação utilizada, com a exceção da amostra SA 633 que apresentou 30% de mortalidade e da amostra SA 006 que mostrou somente 10%. Observou-se que a infecção por via subcutânea provocou uma maior mortalidade de pintinhos, sendo que as amostras SA 003, SA 004, SA 005 e a amostra vacinal mostraram somente 10% de mortalidade, porém o pintinho que

morreu após inoculação com a amostra vacinal apresentou ao exame necroscópico sinais de infecção por *Escherichia coli* e confirmadas com testes bioquímicos. A mortalidade observada foi: amostra SA 002 30%, as amostras SA 632 e SA 634 70% e a amostra SA 633 100%. A amostra SA 006 não provocou nenhuma mortalidade. A tabela 5.4 mostra estes resultados, assim como o título de cada desafio.

Tabela 5.3 – Patogenicidade de amostras de *Salmonella* Typhimurium desafiadas por via oral e por via subcutânea em pintinhos SPF – São Paulo – 2008-2009.

Amostras	Titulação do desafio (Log 10 UFC/0,1mL)	Mortalidade			
		Via Oral	%	Via Subcutânea	%
SA 002	$8,1 \times 10^5$	0/10 ^c	0	3/10 ^c	30
SA 003	$1,0 \times 10^6$	0/10 ^c	0	1/10 ^d	10
SA 004	$9,0 \times 10^5$	0/10 ^c	0	1/10 ^d	10
SA 005	$2,5 \times 10^5$	0/10 ^c	0	1/10 ^d	10
SA 006	$3,5 \times 10^5$	1/10 ^b	10	0/10 ^e	0
SA 632	$1,0 \times 10^5$	0/10 ^c	0	7/10 ^b	70
SA 633	$1,2 \times 10^5$	3/10 ^a	30	10/10 ^a	100
SA 634	$1,7 \times 10^5$	0/10 ^c	0	7/10 ^b	70
Amostra Vacinal	$1,7 \times 10^7$	0/10 ^c	0	1/10 ^{*d}	10

Nota: SPF (*Specific Pathogen Free*)

Log (Logaritmo)

UFC (Unidade Formadora de Colônia)

% (Porcentagem)

mL (Mililitro)

a,b,c,d,e letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as amostras.

OBS: * Animal apresentou sinais de infecção por *E. coli*

A amostra mais patogênica de acordo com o modelo de patogenicidade testado por via oral foi a amostra SA 633 e por via subcutânea a mesma amostra que mostrou diferenças significativas ($p < 0.05$) quando comparada com a mortalidade das outras amostras, seguida pelas amostras SA 634, SA 632 e SA 002.

5.5 COLONIZAÇÃO DE CECO E INVASÃO EM FÍGADO E BAÇO POR *Salmonella* Typhimurium EM PINTINHOS *SPF*

O ensaio de colonização foi realizado em pintinhos *SPF*, com as amostras SA 002, SA 003, SA 004, SA 005, SA 006, SA 632, SA 633, SA 634 e amostra vacinal. Verificou-se ausência de invasão no fígado e baço 24 horas pós - infecção, exceto para as amostras SA 632 (30%) e amostra vacinal (20%). Após sete dias da infecção houve invasão em dois pintinhos com a amostra SA 002 e um pintinho com as amostras SA 004 e SA 005. Apenas na amostra SA 632 constatou-se colonização em ceco após 24 horas em um pintinho (10%) e após 7 dias em sete pintinhos (70%) pós-infecção. Estes resultados encontram-se na tabela 5.5.

Tabela 5.4 - Reisolamento de *Salmonella* Typhimurium em fígado, baço e ceco de pintinhos *SPF* desafiados por via oral, após diluição em água peptonada 0,1 % - São Paulo – 2008-2009.

Amostras	Número de aves reisoladas / Número de aves desafiadas							
	Fígado/Baço				Ceco			
	24 horas	%	7 dias	%	24 horas	%	7 dias	%
SA 002	0/10 ^c	0	2/10 ^b	20	0/10 ^b	0	0/10 ^b	0
SA 003	0/10 ^c	0	0/10 ^d	0	0/10 ^b	0	0/10 ^b	0
SA 004	0/10 ^c	0	1/10 ^c	10	0/10 ^b	0	0/10 ^b	0
SA 005	0/10 ^c	0	1/10 ^c	10	0/10 ^b	0	0/10 ^b	0
SA 006	0/10 ^c	0	0/10 ^d	0	0/10 ^b	0	0/10 ^b	0
SA 632	3/10 ^a	30	10/10 ^a	100	1/10 ^a	10	7/10 ^a	70
SA 633	0/10 ^c	0	0/10 ^d	0	0/10 ^b	0	0/10 ^b	0
SA 634	0/10 ^c	0	0/10 ^d	0	0/10 ^b	0	0/10 ^b	0
Amostra vacinal	2/10 ^b	20	0/10 ^d	0	0/10 ^b	0	0/10 ^b	0

Nota: *SPF* (*Specific Pathogen Free*)

% (porcentagem)

^{a,b,c,d} letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0.05$).

Verificou-se que em 24 horas e em 7 dias a presença bacteriana no fígado e baço foi detectada em todas as amostras analisadas. Porém, no ceco 24 horas pós-infecção apenas na amostra vacinal não se confirmou a presença bacteriana, e em 7 dias as amostras SA 004 e vacinal também não foram confirmadas. A tabela 5.6 apresenta estes resultados.

Tabela 5.5 - Reisolamento de *Salmonella* Typhimurium em fígado, baço e ceco de pintinhos *SPF*, desafiados por via oral após enriquecimento em caldo tetrionato – São Paulo – 2008-2009.

Amostras	Número de aves reisoladas / Número de aves desafiadas							
	Fígado/Baço				Ceco			
	24 horas	%	7 dias	%	24 horas	%	7 dias	%
SA 002	1/10 ^d	10	1/10 ^e	10	6/10 ^c	60	2/10 ^b	20
SA 003	2/10 ^c	20	3/10 ^c	30	7/10 ^b	70	1/10 ^c	10
SA 004	2/10 ^c	20	2/10 ^d	20	4/10 ^e	40	0/10 ^d	0
SA 005	1/10 ^d	10	1/10 ^e	10	6/10 ^c	60	1/10 ^c	10
SA 006	2/10 ^c	20	2/10 ^d	20	3/10 ^f	30	0/10 ^d	0
SA 632	5/10 ^a	50	10/10 ^a	100	10/10 ^a	100	8/10 ^a	80
SA 633	2/10 ^c	20	3/10 ^c	30	6/10 ^c	60	2/10 ^b	20
SA 634	2/10 ^c	20	3/10 ^c	30	5/10 ^d	50	2/10 ^b	20
Amostra vacinal	3/10 ^b	30	4/10 ^b	40	0/10 ^g	0	0/10 ^d	0

Nota: *SPF* (*Specific Pathogen Free*)

% (Porcentagem)

^{a,b,c,d}letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

De acordo com BARROW (1999), a maior necessidade do controle de salmonelas paratíficas recai sobre aves jovens, pois, quando recém-eclodidas, apresentam uma imaturidade no sistema imunológico, não estando formada sua microbiota intestinal. Aves de produção nascem com uma microbiota intestinal incompleta ou em formação (SLAVIN, 1995) e essa microbiota possui papel importante no funcionamento intestinal, atuando como primeira defesa contra patógenos entéricos (GOODWIN, 1989).

A redução da colonização intestinal por *Salmonella*, durante o período de crescimento, é crucial para conferir segurança aos ovos, minimizar perdas econômicas e reduzir os surtos de salmonelose humana (KASSAIFY; MINE, 2004).

O estudo de genes de virulência vem ampliando o conhecimento da interação patógeno-hospedeiro, assim como a importância dos mecanismos resultantes desta interação e envolvidos na infecção. Para a maioria dos agentes patogênicos entéricos são requeridos múltiplos fatores de virulência (GROISMAN; OCHMAN, 1997). Foi estimado que 4% do genoma da *S. Typhimurium* é requerido para infecções fatais em camundongos, que se traduzem em mais de 200 genes de virulência (BOWE et al., 1998).

Inúmeros fatores bacterianos, como LPS, flagelos, fímbrias e algumas proteínas de membrana externa, foram relatados para atuar como iniciadores na adesão e / ou invasão do epitélio do trato digestivo por *Salmonella*. O papel destes fatores na patogênese permanece obscura (GUARD-PETTER et al., 1996; MIZUMOTO et al., 2005; WILSON et al., 2000). Há alguns indícios de que o antígeno do grupo O pode estar associado com a colonização do intestino das aves (CRAVEN et al., 1993; TURNER et al., 1998). Além disso, LPS parece desempenhar um papel na adesão às células epiteliais aviárias (TURNER et al., 1998). Estudo realizado por Berndt et al. (2007) demonstrou que sorovares de *Salmonella* utilizados possuíam diferentes habilidades para invadir regiões mais baixas da lâmina própria do ceco e desencadear reações imunes.

Em aves tem sido descrita a necessidade de inúmeros genes, entre eles os necessários para a colonização (TURNER et al., 1998), porém a possibilidade que diferentes sorotipos usem mecanismos alternativos para colonização não podem

ser descartados. Jones et al. (2007) demonstraram que a SPI-1 em aves está envolvida com infecção sistêmica e colonização intestinal, mas não parece absolutamente essencial em cada um dos processos. Estes mesmos autores, mostraram que em aves a SPI-2 é requerida para a infecção por *Salmonella* Typhimurium e tem um papel importante na colonização intestinal.

Neste estudo foram identificados quatro perfis genotípicos, porém analisando os resultados observou-se que a amostra SA 633 pertencente ao perfil P2 mostrou 30% de mortalidade após a inoculação oral e 100% após a inoculação subcutânea, a única dentro do perfil P2 que apresentou este comportamento. Esta amostra teve um isolamento de 100% nos órgãos das aves testadas e 80% nos cecos, indicando uma alta capacidade de invasão e colonização. Estes resultados sugerem que os genes estudados não estariam diretamente relacionados com a colonização e invasão da bactéria nas aves, porque todas as amostras com perfil genotípico P2 teriam apresentado o mesmo comportamento. Estes resultados e diferenças em um mesmo perfil confirmam que a colonização por *Salmonella* e por consequência a posterior invasão dos órgãos, pode ser afetada por muitos fatores (BAILEY, 1987). Estes fatores podem estar relacionados ao próprio hospedeiro, às características da cepa inoculada, à via de inoculação e ao meio ambiente especialmente o microambiente intestinal. Neste trabalho as modificações foram diretamente relacionadas às cepas de *Salmonella* assim como à sua origem, evidenciando que as diferenças obtidas estariam relacionadas à bactéria por um lado, sendo que existem cepas invasivas e não invasivas (MONACK et al, 1996), e à via de inoculação, tal como tem sido demonstrado também para mamíferos (FEDORKA et al, 1995).

Dos vinte genes analisados neste estudo, onze deles: *avrA*, *fliC*, *invA*, *iroN*, *mgtC*, *sifA*, *sipB*, *sipC*, *sitC*, *slyA* e *sopB*, foram positivos nos quatro perfis genéticos encontrados das nove amostras de *Salmonella* Typhimurium avaliadas. Os genes mencionados têm diferentes funções, interações e mecanismos de ação. Alguns deles estão associados com traços importantes na patogênese de *Salmonella*, como aquisição de ferro (*iroN* e *sitC*) (BAUMLER et al., 1998; JANAKIRAMAN; SLAUCH, 2000) e biossíntese de toxina (*cdtB*) (HAGHJOO; GALÁN, 2004).

Em 100% das amostras analisadas neste trabalho os genes *invA* e *slyA* estiveram presentes. O gene *invA* é indispensável para a invasão eficiente das

células M encontradas no intestino, tal como demonstraram estudos no epitélio intestinal de camundongos (RAHN et al., 1992; CLARK et al., 1998). As células M da mucosa intestinal são ligadas aos folículos linfóides, que fazem a mediação da resposta inflamatória, recrutamento de granulócitos, macrófagos, monócitos e linfócitos (CALDWELL et al. 2004).

Segundo Okada (2007), o gene *slyA* de *Salmonella* está envolvido na virulência, na sobrevivência em macrófagos de camundongos, resistência ao estresse oxidativo e resistência aos peptídeos antimicrobianos (BUCHMEIER et al., 1997; DANIELS et al., 1996; KANEKO et al., 2002; LIBBY et al., 1994; NAVARRE et al., 2005; SHI et al., 2004; WATSON et al., 1999). A codificação do gene (*slyA*) de hemolisina de *Salmonella* (salmolisina) tem sido determinada por uma triagem no banco de gene de *Salmonella* Typhimurium em *E. coli* para a atividade hemolítica (LIBBY et al., 1994).

Neste estudo todas as amostras foram negativas para os genes *sopE1* e *spvC*, contrariamente ao observado por Montenegro, Morelli e Helmuth (1991) que reportaram que 100% das cepas isoladas de órgãos animais e sangue humano foram positivas para o plasmídeo de virulência *spvC*.

Evidências epidemiológicas mostram que o gene *sopE1* está associado com fagotipos de *Salmonella* Typhimurium causando epidemias em bovinos (ZHANG et al., 2002), porém neste estudo todas as amostras de *Salmonella* Typhimurium foram negativas para este gene.

Gulig (1990) afirma que o consenso que emergiu ao longo dos anos é de que os plasmídeos de virulência das salmonelas causam infecção sistêmica progressiva dos órgãos reticuloendotelial em animais experimentais. No entanto, os plasmídeos não afetam a capacidade das salmonelas causarem infecção intestinal e danos ao hospedeiro. Swamy et al. (1996) sugeriu que o *spvC* não desempenha um papel crucial no estabelecimento da gastroenterite típica causada por salmonelas em humanos e reportou que 84,9% de 245 isolados de *Salmonella* foram negativos para o gene *spvC*.

A maioria das salmonelas possui o gene estrutural *agfA*, que codifica para a expressão de fímbrias SEF17 (DORAN et al. 1993). Doran et al. (1993), em uma pesquisa com 95 sorotipos de 24 sorogrupos de salmonelas demonstraram que a *agfA*, está amplamente distribuída e é provavelmente comum entre os sorovares do gênero. O estudo incluiu os sorovares mais freqüentemente responsáveis por

gastroenterite no mundo, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Da mesma maneira, neste trabalho 88,88% das amostras foram positivas ao gene *agfA* com uma amostra única negativa.

Apesar do gene *sptP* está ligado preferencialmente a invasão de *Salmonella* no baço, mas não colonização no ceco (GONG et al., 2009), a amostra SA 634 de perfil genotípico P1 com ausência da expressão deste gene mostrou habilidade de invasão dos órgãos similar a outras amostras positivas a este gene

Skyberg et al. (2006) afirmaram que a baixa prevalência do gene *cdtB* está limitado a certos sorovares de *Salmonella*. O gene *cdtB* tem sido demonstrado em uma linhagem de *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18 mas não em *S. Typhimurium* (PARKHILL et al., 2001). O gene *cdtB* está localizado dentro da região cromossômica da *S. Typhi* na qual não está presente em outros sorovares de *S. enterica*.

O Cdt foi descoberto como uma nova toxina sensível ao calor presente em *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp. associado a doenças diarréicas. O termo Cdt reflete as propriedades desta proteína causando distensão celular progressiva e citotoxicidade em culturas de células (OHARA; OSWALD; SUGAI, 2004). O gene *cdtB* foi descoberto no genoma de *Salmonella Typhi*, bactéria causadora de febre tifóide (HAGHJOO; GALÁN, 2004) porém mas recentemente foi encontrado no genoma de *Salmonella* sorovar Paratyphi A, onde ambos os sorovares são exclusivamente encontrados em humanos. Entretanto, Skyberg et al. (2006) detectaram *cdtB* em todos os isolados de sorovares Bredeney, Brandenburg, e Schwarzengrund, sendo a primeiro relato em sorovares de *Salmonella* não exclusivo de humanos. No presente trabalho o *cdtB* foi detectado em uma única amostra de *Salmonella Typhimurium* (SA 003) correspondente ao perfil P3, contrariamente ao descrito por Charles et al. (2009) que indicaram que esta proteína não estão presente no genoma de *Salmonella Typhimurium*.

As fimbrias polar longa (*lpf*) são codificadas pelos genes *lpfABCDE* e tem sido implicado na colonização da mucosa intestinal de camundongos. Nas amostras de origem aviária analisadas somente uma amostra SA 003 foi negativa para a expressão deste gene, porém houve colonização alta nos cecos nas 24 horas p.i. maior que aquela mostrada pelas amostras positivas, indicando que outros mecanismos e expressão de genes devem estar associados com a colonização da mucosa. Evidências recentes indicam que a expressão dos genes *lpf* ocorre por uma

variação da fase do mecanismo que ajuda a contornar a resposta imune do hospedeiro (LEDEBOER, 2006).

As fímbrias têm um papel importante na patogenicidade da bactéria, porque eles promovem o ataque às células epiteliais do intestino (FINLAY; FALKOW, 1989; van der VELDEN et al., 1998).

O gene *fimA* pode ser usado na diferenciação entre *Salmonella* e não-*Salmonella* spp. Ele é muito útil no diagnóstico de *Salmonella* ao nível de gênero, mas não na identificação espécie (COHEN, MECHANDA & LIN, 1996). Estudos têm mostrado que as fímbrias tipo 1 são expressas *in vivo* por *S. Typhimurium*, durante uma infecção (EWEN et al., 1997) e que algumas substâncias podem inibir a sua expressão (BOYEN et. al, 2008)

A proteína *avrA* do sorovar *Typhimurium* inibe a ativação do fator chave de transcrição pró-inflamatório NF- κ B e aumenta a apoptose em células epiteliais humanas. Curiosamente, o gene *avrA* é predominante na maioria dos sorovares de salmonelas entéricas, como foi confirmado neste estudo em todas as amostras testadas, entretanto, apenas um pequeno número delas costumam produzir a proteína (GIACOMODONATO, 2007).

O gene *pefA* é codificado por um plasmídeo de virulência, que pode não estar presente em todos os serovares. A razão mais importante do estudo da presença de plasmídeos específicos de *Salmonella* é sua contribuição à expressão da virulência desta bactéria. Dependendo do serovar os plasmídeos codificam para genes de virulência associados (RYCHLIK et al, 2005). Todas as amostras com exceção da SA 632 foram negativas ao *pefA*, indicando que a maioria dos isolados avaliados não contêm plasmídeos de virulência, tal como tem sido relatado anteriormente por alguns autores (SKYBERG et al., 2006; RYCHLIK et al., 2005).

A fímbria SEF14 é codificada pelo operon SEF, que contém genes *sefC*. Este gene codifica uma proteína da membrana externa que contém a subunidade *sefA* e a adesina *sefD*. A hipótese atual sugere que essas proteínas de membrana externa desempenham um papel ativo na dissociação da fímbria e das proteínas acessórias fimbriais (HULTGREN; NORMARK, 1992). O gene *sefC* é encontrado principalmente em salmonelas adaptadas aviárias, como *S. enterica* subsp. *Enteritidis*, *S. enterica* subsp. *Pullorum*, e *S. enterica* subsp. *Gallinarum* (BÄUMLER et al, 1997; CLOUTHIER et al., 1993; DODSON et al., 1999).

O gene *sefC* foi detectado somente em duas amostras SA003 e SA632 correspondentes aos perfis P3 e P4, sendo que as outras sete amostras foram negativas à expressão deste gene; resultados similares foram obtidos em aves de vida livre por Hudson et al. (2000) onde nenhuma amostra analisada foi positiva para o gene *sefC*. Em diferença a estes resultados há estudos demonstrando que *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 de diferentes origens apresentaram positividade na expressão deste gene de mais de 99% ou até 100% (CASTILLA et al., 2006; EDWARDS; SCHIFFERLS; STANLEY, 2000).

Representam um importante passo no desenvolvimento de novos métodos de profilaxia e terapia para infecções por *Salmonella*.

A detecção de genes de virulência bem como a capacidade de invasão e colonização de *Salmonella*, constituem um passo importante para melhor entender o processo infeccioso, bem como a interação patógeno-hospedeiro. Compreender os mecanismos envolvidos na patogênese das salmonelas é um passo importante no desenvolvimento de novas abordagens profiláticas e terapêuticas das infecções.

7 CONCLUSÕES

Detectou-se perfis genéticos diferentes entre as amostras de *Salmonella* Typhimurium analisadas baseando-se na presença ou ausência de genes de virulência.

A amostra vacinal assemelha-se a amostras de *S. Typhimurium* estudadas quanto a presença de genes de virulência.

Determinou-se a patogenicidade das amostras de *S. Typhimurium* em pintinhos *SPF* infectados tanto por via oral como por via subcutânea, na qual a amostra SA 633 apresentou-se mais patogênica nas duas vias administradas.

A amostra SA 632 mostrou-se com maior capacidade de colonização em ceco e invasão em fígado e baço, dentre todas as amostras de *Salmonella* Typhimurium analisadas.

REFERÊNCIAS²

ABEF. Associação brasileira dos produtores e exportadores de frangos. Relatório Anual 2008/2009. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2009.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. O. Microbiología de los alimentos, Acribia, S. A., p. 44, 1997.

ALOISI, G. Aspergilosis una Enfermedad Ambiental. Avicultura Professional, Santiago do Chile, v. 14, n. 2, p. 18-19, 1996.

ALVAREZ, J., et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of Salmonella in human clinical samples. Journal of Clinical Microbiology, v. 42, n. 4, p. 1734-8, 2004.

ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, E. N.; BALEN, L. Efeito da via de inoculação na patogenicidade de amostras patogênica e apatogênica de *Escherichia coli* em galinha. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 45, p. 475-486, 1993.

BABU, U. et al. Salmonella enteritidis clearance and immune responses in chickens following salmonella vaccination and challenge. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 101, p. 251-257, 2004.

BABU, U. et al. Effects of live attenuated and killed Salmonella Vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 91, p. 39-44, 2003.

BAILEY, J. S. Factors affecting microbial competitive exclusion in poultry. Food Technology, v. 7, p. 88-92, 1987.

BAILEY, J. S.; COX, N. A.; BERRANG, M. E. Hatchery-acquired Salmonella in broiler chicks. Poultry Science, v. 73, p. 1153-1157, 1994.

BARON, E. A. et al. Diagnostic microbiology. Missouri: Mosby, 9 ed, 1994.

BARROW, P. A. Salmonellosis in poultry. In: Salmonella and Salmonellosis Symposium. France: Ploufragan, 1992.

_____. Salmonella infections in poultry - problems and new thoughts on the possibilities of control. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v. 1, p. 9-16, 1999.

BARROW, P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A. Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning Salmonella serotypes: microbial characteristics associated with faecal excretion. Avian Pathology, v. 17, p. 571-588, 1988.

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de Salmonella em produtos de frango e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS. Ciência Rural, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BÄUMLER, A. J. et al. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of Salmonella serotypes. The Journal of Bacteriology, v. 179, n. 2, p. 317-322, 1997.

BÄUMLER, A. J. et al. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristics of *Salmonella enterica*. The Journal of Bacteriology, v. 180, p. 1446-1453, 1998.

BÄUMLER, A. J. et al. The pef fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. Infection and Immunity, v. 64, n. 1, p. 61-68, 1996.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Paratifo: Como podemos controlá-lo ou erradicá-lo a nível de produção. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1991, Santos. Anais... Campinas: FACTA, 1991. p 49-62.

_____. Salmonelose aviária no Brasil e no mundo. In: V SIMPÓSIO ACETAV – Atualidades Avícolas, 1999, Fortaleza. Anais... Fortaleza: ACETAV, 1999.

_____. Salmoneloses Aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. J.; MACARI, M. (Ed.). Doenças das Aves. Campinas: FACTA, 2000. p.185-196.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; BARROW, P. A. Patologia e métodos de diagnóstico de SE em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Curitiba. Anais... Campinas: FACTA, 1995. p. 01-05.

BERNDT, A. et al. Chicken cecum immune response to *Salmonella enteric* serovars of different levels of invasiveness. Infection and Immunity, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

BLANC-POTARD, A. B. et al. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. The Journal Bacteriology, v. 181, p. 998-1004, 1999.

BOOM, R., et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology, v. 28, p. 495-503, 1990.

BOYEN, F. et al. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. Veterinary Microbiology, v. 132, n. 3-4, p. 319-327, 2008.

BOWE, F. et al. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection in mice. Infection and Immunity, v. 66, p. 3372–3377, 1998.

BRASIL. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola e cria o Comitê Consultivo do PNSA. Ministério da Agricultura, Brasília, DF, 1994.

_____. Portaria nº 8, de 23 de janeiro de 1995: Estabelece o Método Analítico de Carcaças de Aves e Pesquisa de *Salmonella*. Ministério da Agricultura, Brasília, DF, 1995. 60 p.

BRIGGS, C. E.; FRATAMICO, P. M. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 43, n. 4, p. 846-9, 1999.

BUCHMEIER, N. et al. SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. Infection and Immunity, v. 65, n. 9, p. 3725-30, 1997.

CAFFER, M. I.; TERRAGNO, R. Manual de procedimientos para la caracterización de Salmonella. Ministerio de Salud. Subsecretaría de Investigación y Tecnología-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"- Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires, Argentina. 2001.

CALDWELL, H. D. et al. New insights in chlamydial immunology and pathogenesis. In: FIFTH MEETING OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR CHLAMYDIA RESEARCH, 2004. Proceedings..., Sept 1-4. 2004. p. 127-131.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N (Ed.). Microbiologia. São Paulo: Atheneu, v.3, 2002.

_____. Microbiologia. São Paulo: Atheneu, v.4. 2005.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Comparação de caldos de enriquecimento incubados em duas diferentes temperaturas e de meios de cultura na pesquisa de *Salmonella Gallinarum*. Arquivos do Instituto Biológico, v. 71, n. 1, p. 9-13, 2004.

CARVALHO, A. C. F. B.; LIMA, V. H. C.; PEREIRA, G. T; Schocken-Iturrino, R.P. *Campylobacter* em granja avícola. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 96, p. 191-195, 2001.

CASON, J. A.; BAILEY, J. S.; COX, N. A. Transmission of *Salmonella typhimurium* during hatching of broiler chicks. Avian Diseases, v. 38, p. 583-588, 1994.

CASTILLA, K. S. et al. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated Brazil. Brasilian Journal of Microbiology, v. 37, p. 135-139, 2006.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infections associated with drinking unpasteurized milk – Illinois, Indiana, Ohio, and Tennessee, 2002-2003. v. 52, n. 26, p. 613-615. 2003.

_____. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Salmonella* serotype Typhimurium outbreak associated with commercially processed egg salad – Oregon, 2003. MMWR, v. 53, n. 48, p. 1132-1134. 2004.

_____. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections associated with eating ground beef – United States, 2004. MMWR, v. 55, n. 7, p. 180-182. 2006.

CHACANA, P. A.; TERZOLO, H. R. Revisión sobre Pullorosis y Tifosis aviar: nuevos enfoques para viejos conceptos. Revista de Medicina Veterinária, v. 84, p. 14-20, 2003.

CHARLES, R. C. et al. Comparative proteomic analysis of the PhoP regulon in *Salmonella* entérica serovar Typhi versus Typhimurium. PlosONE, v. 4, n. 9, e6994. doi: 10.1371/journal.pone.0006994, 2009.

CHEN, L. M.; KANIGA, K.; GALÁN, J. E. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. Molecular Microbiology, v. 21, n. 5, p. 1101-15, 1996.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. et al. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. Brazilian Journal of Poultry Science, v. 4, n. 3, p. 243-247, 2002.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; Jepson, M. A. Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M- cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella* typhimurium. Infection and Immunity, v. 66, n. 2, p. 724-731, 1998.

CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella* sp. In: GYLES, C. L.; CHARLES, O. T. (Ed.). Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State University: Ames, v.2, 1996. p. 133-153.

CLOUTHIER, S. C., et al. Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella* enteritidis. Journal of Bacteriology, v. 174, p. 2523-2533, 1993.

COHEN, H. J.; MECHANDA, S. M.; LIN, W. PCR Amplification of the *fimA* Gene Sequence of *Salmonella typhimurium*, a Specific Method for Detection of *Salmonella* sp. Applied and Environmental Microbiology, v. 62, n. 12, p. 4303-4308, 1996.

COHEN, N. D. et al. Detection of *Salmonella enteritidis* in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. Poultry Science, v. 73, n. 2, p. 354-357, 1994.

COLLAZO, C. M.; GALÁN, J. E. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review. Gene, v. 192, p. 51-59, 1997.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. M. Paratífos em geral. Rio de Janeiro-RJ: MEDSI, v.2, 1992. p. 167-174.

CORRIER, D. E. et al. Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids and *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks. Avian Diseases, v. 34, p. 617-625, 1990.

COTTER, P. A.; DIRITA, V. J.,. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. Annual Review of Microbiology, v. 54, p. 519-565, 2000.

COX, N. A. et al. Presence of Naturally Occurring *Campylobacter* and *Salmonella* in the Mature and Immature Follicles of Late-Life Broiler Breeder Hens. Avian Diseases, v. 49, p. 285-287, 2005.

COX, N. A.; BAYLE, J. S.; BERRANG, M. E. Presence and impact of *Salmonella* contamination in commercial broiler hatcheries. Poultry Science, v. 69, p. 1606-1609, 1990.

CRAVEN, S. E., et al. Characterization of *Salmonella* californica and *S. typhimurium* strains with reduced ability to colonize the intestinal tract of broiler chicks. Avian Disease, v. 37, p. 339-348, 1993.

D'AOUST, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). International Journal of Food Microbiology. Washington: ASM Press, v.Cap 8, 1997. *Salmonella* species, p.129-158

D'AOUST, J. Y. *Salmonella*. In: LABBE, R. G.; GARCIA, S. (Ed.). Guide to Food-borne Pathogens. New York, NY: John Wiley and Sons Inc, 2001.

DANIELS, J. J. et al. The gene slyA of *Salmonella typhimurium* is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine. Infection and Immunity, v. 64, n. 12, p. 5075-84, 1996.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. . Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clinical Microbiology Reviews, v. 12, n. 3, p. 405-28, 1999.

DAVIES, R. H.; WRAY, C. Mice as carriers of *Salmonella enteritidis* on persistently infected poultry units. Veterinary Record, v. 137, p. 337-341, 1995.

de VALK, H. et al. A community-wide outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection associated with eating a raw milk soft cheese in France. Epidemiology and Infection, v. 124, p. 1-7, 2000.

DEVINNEY, R.; STEELE-MORTIMER, O.; FINLAY, B. B. Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. Trends in Microbiology, v. 8, p. 29-33, 2000.

DICKEL, E. L. Salmonella em produtos avícolas e aspectos da legislação. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos. Anais...Campinas: FACTA, 2004. p. 201-210.

DIEYE, Y. et al. The Salmonella pathogenicity island (SPI) I contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by Salmonella enteric serovar Typhimurium. BMC Microbiology, v. 9, n. 3, p. 1-14, 2009.

DODSON, S. V., et al. Temporal changes in the population genetics of Salmonella pullorum. Avian Diseases, v. 43, p. 685-695, 1999.

DORAN, J. L. et al. DNA-based diagnostic tests for Salmonella species targeting agfA, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. Journal of Clinical Microbiology, v. 31, n. 9, p. 2263-2273, 1993.

ECHEITA, M. A. et al. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common Salmonella second-phase flagellar antigens. Research in Microbiology, v. 153, n. 2, p. 107-113, 2002.

ECHEITA, M. A.; USERA, M. A. Rapid identification of Salmonella spp. phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using "multiplex PCR". Research in Microbiology, v. 149, p. 757-61, 1998.

EDWARDS, R. A.; SCHIFFERLS, D. M.; STANLEY, R. M. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., v. 97, p. 1258-1262, 2000.

EVEREST, P. E. A. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. Trends in Microbiology, v. 9, n. 7, p. 316-320, 2001.

EWEN, S. W. et al. Salmonella enterica var Typhimurium and Salmonella enterica var Enteritidis express type 1 fimbriae in the rat in vivo. FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 18, p. 185-192, 1997.

FEDORKA-CRAY, P. J. et al. Alternates routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. Infection and Immunity, v. 63, n.7, p. 2658-2664, 1995.

FERREIRA, A. J. P. et al. Infecção natural e experimental por *Salmonella enteritidis* em pintos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1990. Anais... Campinas: FACTA, 1990. p. 171.

FIERER, J. et al. *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. The Journal of Infectious Diseases, v. 166, n. 3, p. 639-642, 1992.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. *Salmonella* as an intracellular parasite. Molecular Microbiology, v. 3, n. 12, p. 1833-1841, 1989.

FLÔRES, M. L. et al. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. Ciência Rural. n. 33, v. 3, p. 553-557, 2003.

FLOWERS, R. S.; D'AOUST, J. ; ANDREWS, W. H., BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: C. VANDERZANT, SPLITTSTOESSER, D.F (Ed.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, USA: American Public Health Association, v.3, 1992. p. 371-422.

FRANCO, B. G. M. F.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu. 1996. 182 p.

GALÁN, J. E. *Salmonella* interaction with host cells: type III secretion at work. Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 17, n. 53-86, 2001.

GALÁN, J. E.; SANSONETTI, P. J. Molecular and cellular bases of *Salmonella* and *Shigella* interactions with hosts. In Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology, pp. 2757–2773. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington DC: American Society for Microbiology. 1996.

GAMA, N. M. S. Q. Salmonella sp. em aves de postura comercial. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2001. 59 p.

GANTOIS, I. et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 Jul;33(4):718-38. FEMS Microbiology Review, v. 33, n. 4, p. 718-38, 2009.

GAST, R. K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Heidelberg*. Avian Diseases, v. 49, p. 382-386, 2005.

GIACOMODONATO, M. N. et al. SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice. Microbiology, v. 153, n. 4, p. 1221-8, 2007.

GOMEZ, H. F.; CLEARY, G.G. Salmonella. Philadelphia, PA: The EB Saunders Co. 1998.

GONG, A. Y. et al. MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes. The Journal of Immunology, v. 182, n. 3, p. 1325-1333, 2009.

GOODWIN, M. A. Cryptosporidiosis in birds: a review. Avian Pathology, v. 18, p. 365-384, 1989.

GRIMONT, H. F.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars: Institut Pasteur, v.9. 2007.

GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. How *Salmonella* became a pathogen. Trends in Microbiology, v. 5, n. 9, p. 343-9, 1997.

GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell, v. 87, n. 5, p. 791-794, 1996.

GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. Environmental Microbiology, v. 3, p. 421-430, 2001.

GUARD-PETTER, J. et al. A novel relationship between O antigen variation, matrix formation, and invasiveness of *Salmonella enteritidis*. Epidemiology and Infection, v. 117, p. 219-231, 1996.

GUARD-PETTER, J. et al. On-farm monitoring of mouse-invasive *Salmonella enterica* serovar enteritidis and a model for its association with the production of contaminated eggs. Applied and Environmental Microbiology, v. 63, n. 4, p. 1588-93, 1997.

GUINEY, D. G. et al. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. FEMS Microbiology Letters, v. 124, n. 1, p. 1-9, 1994.

GULIG, P. A. Virulence plasmids of *Salmonella typhimurium* and other salmonellae. Microbial Pathogenesis, v. 8, n. 1, p. 3-11, 1990.

HARGIS, B.M. et al. Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. Poultry Science, v. 74, p. 1548-1552, 1995.

HAGHJOO E.; GALÁN, J. E. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. Proceedings National Academy Science U. S. A. v. 101, p. 4614-4619, 2004.

HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity island 2. Molecular Microbiology, v. 36, n. 5, p. 1015-23, 2000.

_____. Evolution of pathogenicity islands *Salmonella* entérica. International Journal of Medical Microbiology, v. 294, p. 95-102, 2004.

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

HINTON, M. Salmonella infection in chicks following the consumption of artificially contaminated feed. Epidemiology and Infection, v. 100, p. 247-256, 1988.

HOLT, J. G. E. A. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, v.9, 1994. 787 p.

HORBY, P. W. et al. A national outbreak of multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. Epidemiology and Infection, v. 130, p. 169-78, 2003.

HUDSON, C. R. et al. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. Journal of Clinical Microbiology, v. 38, p. 1860–1865, 2000.

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiology and Molecular Biology Review, v. 62, n. 2, p. 379-433, 1998.

HULTGREN, S. J.; JONES, C.H.; NORMARK, S. Bacterial adhesins and their assembly. In: NEIDHARDT, F. C. (Ed.). Escherichia coli and Salmonella. Washington, DC: ASM Press, 1996. p. 2730–2757.

HULTGREN, S. J.; NORMARK, S. Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. Annual Reviews Microbiology, v. 45, p. 383-415, 1992.

HUMPHRIES, A. D. et al. Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. FEMS Microbiology Letters, v. 201, p. 121-125, 2001.

ISO. International Organization for Standardization. Microbiology-General guidance on methods for the detection of *Salmonella*. International Standard ISO 6579. Geneva, 1993.

JANAKIRAMAN, A.; SLAUCH, J. M. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium. Molecular Microbiology, v. 35, p. 1146-1155, 2000.

JENSEN, E. C. et al. Prevalence of broad host-range lytic bacteriophage of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, v. 64, p. 575-580, 1998.

JEPSON, M. A., CLARK, M. A. Studying M cells and their role in infection. Trends in Microbiology, v. 6, p. 359-365, 1998.

JONES, B. D. SALMONELLOSIS: Host Immune Responses and Bacterial Virulence Determinants. Annual Review of Immunology, v. 14, p. 533-61, 1996.

JONES, M. A. et al. The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium in the chicken. Avian Pathology, v. 36, n. 3, p. 199-203, 2007.

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

KANEKO, A. et al. Association of a regulatory gene, *slyA* with a mouse virulence of *Salmonella* serovar *Choleraesuis*. Microbiology and Immunology, v. 46, p. 109-113, 2002.

KASSAIFY, Z. G.; MINE, Y. Effect of food protein supplements on *Salmonella* enteritidis infection and prevention in laying hens. Poultry Science, v. 83, p. 753-760, 2004.

KHAN, S.; PIERCE, D.; VALE, R.D. Interactions of the chemotaxis signal protein CheY with bacterial flagellar motors visualized by evanescent wave microscopy. Current Biology, v. 10, p. 927-930, 2000.

KOWARZ, L. et al. The *Salmonella typhimurium* *katF* (*rpoS*) gene: cloning, nucleotide sequence, and regulation of *spvR* and *spvABCD* virulence plasmid genes. The Journal of Bacteriology, v. 176, n. 22, p. 6852-6860, 1994.

KRAMER, J. et al. Entry and survival of *Salmonella enteritidis* PT4 in chicken macrophage and lymphocyte cell lines. Veterinary Microbiology, v. 91, p. 147-155, 2003.

KWAG, I. S. et al. Characteristics of persistent *Salmonella Enteritidis* strains in two integrated broiler chicken operations of Korea. Journal of Veterinary Medical Science, v. 70, p. 1031-1035, 2008.

LARA-TEJERO, M.; GALÁN, J. E. The *Salmonella* Typhimurium SPI-1 type III secretion translocases mediate intimate attachment to non-phagocytic cells. Infection and Immunology, v. 77, p. 2635-2642, 2009.

LAX, A. J. B. et al. Current perspectives in salmonellosis. British Veterinary Journal, v. 151, p. 351-377, 1995.

LE MINOR, L.; VÉRON, M.; POPOFF, M. Y. Proposition pour une nomenclature des *Salmonella*. Annual Microbiology, v. 133B, p. 245-254, 1982.

LEDEBOER, N. A. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. Infection and Immunity, v. 74, p. 3156-3169, 2006.

LEDERBERG, J.; LINO, T. Phase variation in *Salmonella*. Genetics, v. 41, p. 743-757, 1956.

LEE, V. T.; SCHNEEWIND, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. Genes & Development, v. 15, n. 14, p. 1725-1752, 2001.

LIAO, A. P. P. et al. *Salmonella* type II effector *avrA* stabilizes cell tight junctions to inhibit inflammation in the intestinal epithelial cells. PLoS ONE, v. 3, n. 6, e2369, 2008.

LIBBY, S. J. et al. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 91, n. 2, p. 489-93, 1994.

LIBBY, S. J. et al. The Salmonella virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. Cellular Microbiology, v. 2 n. 1, p. 49-58, 2000.

LIEBANA, E. et al. Molecular fingerprinting evidence of the contribution of 119 wildlife vectors in the maintenance of Salmonella Enteritidis infection in layer farms. Journal of Applied Microbiology, v. 94, p. 1024-1029, 2003.

LOGUERCIO, A. P. A. et al. Elisa indireto na detecção de Salmonella spp. em lingüiça suína. Ciência Rural, v. 32, n. 6, p. 1057-1062, 2002.

MACARI, M., MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. Anais... Campinas: FACTA, 2000. p. 161-174.

McHAN, F. et al. *In vitro* attachment of *Salmonella typhimurium* to chick ceca exposed to selected carbohydrates. Avian Diseases, v. 33, p. 340-344, 1989.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. São Paulo, Brasil: Pearson Education do Brasil, v.10. 2004.

MARCUS, S. L. et al. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes and Infection, v. 2, n. 2, p. 145-56, 2000.

MARIE, C. et al. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 16, p. 743-751, 2003.

MERCHANT, L. A.; PACKER, R. A. Bacteriologia e Virologia Veterinária. Zaragoza: Acribia, v. 3. 1980. p. 299-322.

METHNER, U. al SHABIBI, S.; MEYER, H. Experimental oral infection of specific pathogen-free laying hens and cocks with Salmonella Enteritidis strains. The Journal of Veterinary Medicine, v. 42, 1995. p. 459-469.

MILLS, D. M. et al. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. Molecular Microbiology, v. 15, n. 4, p. 749-59, 1995.

MIZUMOTO, N. K., et al. Specific adhesion and invasion of *Salmonella enteritidis* in the vagina of laying hens. Veterinary Microbiology, v. 111, p. 99-105, 2005.

MONACK, D. M. et al. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. The Journal of Experimental Medicine, v. 192, n. 2, p. 249-58, 2000.

MONACK, D. M. et al. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. Proceedings of the National Academy Science, v. 93, p. 9833-9838, 1996.

MONTENEGRO, M. A.; MORELLI, G.; HELMUTH, R. Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolates of defined sources. Microbial Pathogenesis, v. 11, n. 6, p. 391-397, 1991.

MORGAN, E. *Salmonella* pathogenicity islands. In: RHEN, M., MASKELL, D., MAESTROENI, P., THRELFALL, J (Ed.). Salmonella: molecular biology and pathogenesis. Norfolk: Horizon Bioscience, 2007. p. 67-88.

MURRAY, P. R. et al. Medical Microbiology, v. 3, p. 175-188, 1998.

NAGARAJA, K. V.; POMEROY, B.S.; WILLIAMS, J.E. Paratyphoid infections. In: CALNEK, E. A. (Ed.). Diseases of Poultry. Ames, USA: Iowa State University Press, v.9, 1991. p.99-130.

NASCIMENTO, M. S. et al. Comparação de meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados na pesquisa de *Salmonella* em carcaças de frango e fezes de aves. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v. 2, n. 1, p. 85-91, 2000.

NASCIMENTO, V. P. et al. Prevalência e perfis de resistência de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango frente a antimicrobianos e desinfetantes

selecionados. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. Rio de Janeiro, 1997. p. 291.

NASCIMENTO, V. P. et al. Salmonella enteritidis: diagnóstico e implicação em saúde pública. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA Y PRODUCCION AVÍCOLA, 6. Santiago: Anais. Santiago, 1998. p. 17-27.

NAVARRE, W. W. et al. Co-regulation of Salmonella enterica genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. Molecular Microbiology, v. 56, p. 492-508, 2005.

NAVARRO, M. P. Métodos de laboratorio para la detección de Salmonella enteritidis y programas de seguimiento en reproductoras pesadas. In: VIII SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIAR. Athens: Anais... Athens: AMEVEA, 1994. p. 365-389.

_____. Infecção por Salmonella enteritidis em reprodutoras pesadas na América Latina. In: CONFERÊNCIA APINCO 1995 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995. Anais... Curitiba, Paraná, 1995. p. 7-16.

NG, L. K. et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of Salmonella serovar Typhimurium DT104. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 43, n. 12, p. 3018-21, 1999.

NICHOLAS, R. A. et al. Detection of salmonella. The Veterinary Record. v. 126, n. 6, 1990.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. Nature, v. 241, p. 210-211, 1973.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature, v. 405, p. 299-304, 2000.

OCHOA, I. M. F., Rodriguez, A.R. Mecanismos moleculares de ptogenicidad de Salmonella sp. Revista Latinoamericana de Microbiología, v. 47, p. 25-42, 2005.

OHARA, M.; OSWALD, E.; SUGAI, M. Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. The Journal of Biochemistry, v. 136, n. 4, p. 409-13, 2004.

OKADA, N. et al. Identification of amino acid residues of Salmonella SlyA that are critical for transcriptional regulation. Microbiology, v. 153, n. 2, p. 548-60, 2007.

OKAMURA, M. et al. Differences among six Salmonella serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. Avian Diseases, v. 45, n. 1, p. 61-9, 2001.

OLIVEIRA, S. J. Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária. Canoas, RS: Ulbra. 1995. 142 p.

_____. Guia Bacteriológico Prático. Canoas, RS: Ulbra, v.2. 2000.

PARKHILL, J. et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18. Nature, v. 413, n. 6858, p. 848-52, 2001.

PATEL, J. C., GALÁN, J. E. Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella: all in the name of entry. Current Opinion and Microbiology, v. 8, p. 10-15, 2005.

PELZER, K. D. Salmonellosis. Zoonosis update, v. 195, n. 4, p. 456-463, 1989.

PEREIRA, V. L. A. et al. Presença de Salmonella em frangos de corte aparentemente sadios em unidades de criação industrial na região de São José do Vale do Rio Preto – RJ. Revista Brasileira de Ciências Veterinárias, v. 6, n. 3, p. 156-161, 1999.

PIVNICK, H. et al. Comparison of feces with lyophilized and frozen cultures of feces as inocula to prevent *Salmonella* infection in chicks. Journal of Food Protection, v. 45, p. 1188-1194, 1982.

POPIEL, I., TURNBULL, P. C. Passage of Salmonella enteritidis and Salmonella thompson through chick ileocecal mucosa. Infection and Immunity, v. 47, n. 3, p. 786-92, 1985.

POPOFF, M. Y.; NOREL, F. Bases Moléculaires de la pathogénicité des Salmonella. Medical Malpractice Infection, v. 22, p. 310-324, 1992.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. Formules antiigeniques des serovars de Salmonella. Paris: WHO. 1997. p. 1-15.

PRAGER, R. et al. Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of Salmonella enterica. International Journal of Medical Microbiology, v. 290, n. 7, p. 605-617, 2000.

QUINN, N. E. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe. 1994.

RAHN, K. E. A. Amplification of an InvA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Molecular and Cellular Probes, v. 6, p. 271–279, 1992.

RALL, V. L. M. et al. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for Salmonella detection in poultry. Brazilian Journal of Microbiology, v. 36, p. 147-150, 2005.

RICHTER-DAHLFORS, A. et al. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. The Journal of Experimental Medicine, v. 186, p. 569-580, 1997.

ROBERTS, T. Salmonellosis control: Estimated economic costs. Poultry Science, v. 67, p. 936-943, 1988.

ROLFS, A. et al. PCR: principles and reaction components. In: ROLFS, A.; SCHULLER, I; FINCKH, U.; WEBER-ROLFS, I (Ed.). PCR : and plasmid DNA analysis. Journal of Medical Micro and Research. Berlin: Springer-Verlag, 1992. PCR: principles and reaction components, p.1-16.

ROY, P. et al. Results of salmonella isolation from poultry products, poultry, poultry environment, and other characteristics. Avian Diseases, v. 47, p. 17-24, 2002.

RYCHLIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. Veterinary Microbiology, v. 112, p. 1-10, 2006.

SANDVANG, D. et al. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiology Letters, v. 160, p. 37-41, 1998.

SANO, G. E. A. Flagella facilitate escape of *Salmonella* from oncotic macrophages. Journal of Bacteriology, v. 189, n. 22, p. 8224-8232, 2007.

SANTOME, V. et al. Infeccion experimental con *Salmonella enteritidis* induce susceptibilidad a la colibacilosis en pollos de carne. In: XVI CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA. Lima: Anais... Lima: APA, 1999. p. 274-277.

SANTOS, F. B. E. A. Genotypes, serotypes, and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* isolated from commercial North Carolina turkey farms. Journal of Food Protection, v. 70, n. 6, p. 1328-1333, 2007.

SAROJ, S. D. et al. Distribution of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-8 and SPI-10 among different serotypes of *Salmonella*. Journal of Medical Microbiology, v. 57, p. 424-427, 2008.

SATO, Y. S., G. et al. Status of *Salmonella gallinarum*-pullorum infections in poultry in Zambia. Avian Diseases, v. 41, p. 490-495, 1997.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clinical Microbiology Review, v. 17, p. 14-56, 2004.

SHI, Y. et al. A Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance *ugtL* gene by the *Salmonella* PhoP and SlyA regulatory proteins. The Journal of Biological Chemistry, v. 279, p. 38618-38625, 2004.

SILVA, E. N. Salmonelose: Problemas atuais de patologia aviária e saúde pública. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1991, Anais... Campinas, São Paulo-Brasil, 1991. p. 37-45.

_____. Salmonella Enteritidis em avicultura. O que de pratico podemos fazer? In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, Curitiba. Anais... Campinas: FACTA, 1996. p. 207-210.

SKOV, M. N. et al. The role of litter beetles as potential reservoir for Salmonella enterica and Thermophilic Campylobacter spp. between broiler flocks. Avian Diseases, v. 48, p. 9-18, 2004.

SKYBERG, J. A. et al. Virulence genotyping of Salmonella spp. with multiplex PCR. Avian Diseases, v. 50, p. 77-81, 2006.

SLAVIN, D. Cryptosporidium meleagridis (sp.nov.). Journal of Comparative Pathology, v. 65, p. 262-266, 1995.

SONCINI, R. A.; BITTENCOURT, F.L. Contaminação dos ovos após a postura. In: M. G. Macari, E (Ed.). Manejo da Incubação. Campinas: FACTA, 2003. p.433-453.

SOTO, S. M. et al. Detection of virulence determinants in clinical strains of Salmonella enterica serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. Journal of Medical Microbiology, v. 55, n. 4, p. 365-373, 2006.

SWAMY, S. C. et al. Virulence determinants invA and spvC in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. Applied and Environmental Microbiology, v. 62, n. 10, p. 3768-3771, 1996.

TAIRA, S. et al. Evidence for functional polymorphism of the spvR gene regulating virulence gene expression in Salmonella. Molecular and General Genetics, v. 246, n. 4, p. 437-444, 1995.

TAUNAY, A. E. et al. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 38, n. 2, p.119-127, 1996.

THOMASON, B. M.; DODD, D. J. Enrichment procedures for isolation salmonellae from raw meat and poultry. Applied Environmental Microbiology, v. 36, p. 627-628, 1978.

THOMASON, B. M. et al. Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. Applied Environmental Microbiology, v. 34, p. 270-273, 1977.

TIZARD, I. R. Introdução à imunologia veterinária. São Paulo: ROCA, v.2. 1985. 329 p.

TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. São Paulo: Atheneu, v.4. 2005.

TURNBULL, P. C. B. R.; RICHMOND, J. E. A model of Salmonella enteritidis: The behaviour of Salmonella enteritidis in chick intestine studies by light and electron microscopy. British Journal of Experimental Pathology, v. 9, p. 64, 1978.

TURNBULL, P. C. B. S.; SNOEYENBOS, G. H. Experimental salmonellosis in the chicken. Fate and host response in alimentary canal, liver and spleen. Avian Diseases, v. 18, p. 153-177, 1974.

TURNER, A. K. et al. Identification of Salmonella typhimurium genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. Infection and Immunity, v. 66, p. 2099-2106, 1998.

USDA. United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://gain.fas.usda.gov/Lists/Advanced%20Search/AllItems.aspx>>. Acesso em: 02 jul. 2009.

van der VELDEN, A.W.M. et al. Multiple Fimbrial Adhesins Are Required for Full Virulence of *Salmonella typhimurium* in Mice. Infection and Immunity, v. 66, n. 2803–2808, 1998.

VAZQUEZ-TORRES, A. et al. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. Nature, v. 401, n. 6755, p. 804-808, 1999.

VERNIKOS, G. S.; PARKHILL, J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. Bioinformatics, v. 22, p. 2196-2203, 2006.

VILLAR, R. G. et al. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State. Journal of the American Medical Association, v. 281, p. 1811-1816, 1999.

WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. Molecular Microbiology, v. 36, n. 5, p.997-1005, 2000.

WATERMAN, S. R.; HOLDEN, D.W. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. Cellular Microbiology, v. 5, p. 501-511, 2003.

WATSON, P. R. et al. Differential regulation of enteric and systemic salmonellosis by slyA. Infection and Immunity, v. 67, p. 4950-4954, 1999.

WHITANAGE, G. S. et al. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Infection and Immunity, v. 72, p. 2152-2159, 2004.

WHITANAGE, G. S. et al. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. Infection and Immunity, v. 73, p. 5173-5182, 2005.

WILSON, R. L., et al. *Salmonella enterica* serovars Gallinarum and Pullorum expressing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type I fimbriae exhibit

increased invasiveness for mammalian cells. Infection and Immunity, v. 68, p. 4782 – 4785, 2000.

WRAY, C. I. M. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. Veterinary Bulletin, v. 45, p. 543-550, 1975.

WRAY, C. I. M.; DAVIES, R. H. Guildelines on detection and monitoring of Salmonella infected poultry flocks with particular reference of S. Enteritidis. Bulletin of the World Health Organization, v. 73, p. 1-48, 1994.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; BARROW, P. A. Vaccination for control of Salmonella in poultry. Vaccine, v. 17, p. 2538-2545, 1999.

ZHANG, S. et al. The Salmonella enterica serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. Infection and Immunity, v. 70, p. 3843–3855, 2002.

ZHOU, D.; GALÁN, J. Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. Microbes and Infection, v. 3, n. 14-15, p. 1293-1298, 2001.

ZHOU, D. E. A. A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. Molecular Microbiology, v. 39, n. 2, p. 248-259, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Preparo dos meios de cultura e soluções utilizadas

APÊNDICE B – Preparo dos reagentes para extração de DNA

APÊNDICE C – Preparo das substâncias utilizadas na eletroforese

APÊNDICE D – Ficha para padronização do primers

APÊNDICE E – Ficha de eletroforese

APÊNDICE F – Ficha de patogenicidade de pintinhos *SPF*

APÊNDICE G – Ficha de colonização de ceco e invasão em fígado e baço em
pintinhos *SPF*

APÊNDICE A – Preparo dos meios de cultura utilizados**❖ Caldo Luria Bertani (LB)**

Tryptona ou Peptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	5 g
Água destilada.....	1.000 mL

OBS: Acertar o pH 7,2 - 7,4.

❖ EPM (Meio desenvolvido na Escola Paulista de Medicina)

Tryptona	10 g
Extrato de carne	2 g
Ágar.....	12 g
L-Triptofano	1 g
NaCl	5 g
Fosfato de sódio dibásico.....	2 g
Solução alcoólica de azul de bromotimol a 1,5%	2 mL
Água destilada q. s. p.....	1 L

Solução B para EPM

Citrato de ferro amoniacal	2 g
Tiossulfato de sódio.....	2 g
Glicose	10 g
Uréia.....	40 g
Água destilada q. s. p.....	85 mL

❖ MILI (Motilidade-indol-lisina)

Extrato de levedura	3 g
Peptona	10 g
Triptona	10 g
L-Lisina	10 g
Glicose	1 g
Ágar	2 g
Bromocresol púrpura (1,0%)	1, 25 mL
Água destilada q. s. p.	1 L

❖ Citrato de Simmons

Cloreto de sódio	5 g
Sulfato de magnésio	0,2 g
Fosfato de amônio	1 g
Fosfato de potássio dibásico	1 g
Citrato de sódio	2 g
Ágar	20 g
Azul de bromotimol (1:500)	40 mL
Água destilada q. s. p.	1 L

❖ Reativo de Kovacs

Paradimetilaminobenzaldeído	10 g
Álcool amílico ou isoamílico.	150 mL
Ácido clorídrico concentrado	50 mL

APÊNDICE B – Preparo dos reagentes para extração de DNA**❖ EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M – pH 8,0**

EDTA..... 9,306 g
Água MilliQ 50 mL

OBS: Ajustar pH com NaOH 10 M e autoclavar a 121° C / 15 min.

❖ Tris-HCl [tris (hidroximetil) aminometano) 1M – pH 6,4

Tris 6,05 g
Água MilliQ 500 mL

OBS: Ajustar pH com HCl concentrado e autoclavar a 121° C / 15 min.

❖ Tampão de Lise

Isotiocianato de guanidina..... 120 g
Triton X 100..... 1 mL
EDTA 0,5 M (ph 8,0)..... 8,8 mL
Tris – HCl 1 M (pH 6,4)..... 10 mL
Água MilliQ q.s.p. 100 mL

❖ Solução carreadora

Sílica = Terra diatomácea..... 1 g
Água MilliQ 5 mL
HCl 37 % 50 µL

OBS: Agitar bem entre uma amostra e outra. Armazenamento em geladeira por até 15 dias.

❖ **Tampão de Lavagem**

Isotiocianato de guanidina	120 g
Tris-HCl 1 M (pH 6,4)	100 mL
Água MilliQ q.s.p.	100 mL

❖ **Tampão de Eluição (TE)**

Tris-HCl 1M (pH 8,0)	1 mL
EDTA 0,5 M.....	0,2 mL
Água MilliQ q.s.p.	100 mL

APÊNDICE C – Preparo das substâncias utilizadas na eletroforese**❖ TBE (Tampão Tris-Borato-EDTA) 5X**

Tris Base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	20 mL
Água MilliQ q.s.p.	1.000 mL

OBS: Para o TBE 0,5X, realiza-se a diluição de uma parte de TBE 5X para 9 partes de Água MilliQ.

❖ Gel de Agarose 1,5%

Agarose ultra pura	6 g
TBE 0,5 X	400 mL

❖ Brometo de Etídio (10 ug/mL)

Brometo de Etídio	40 µL
Água MilliQ	50 mL

❖ Ladder

Água destilada	400 µL
Corante 6X Blue	100 µL
DNA ladder	100 µL

[illegible]

[illegible]

**APÊNDICE G – Ficha de colonização de ceco e invasão em fígado e baço em
pintinhos *SPF***

Tempo de Colonização: () 24hs () 7 dias

Órgão: () Fígado+Baço () Ceco

Amostra	24 h	48 h	72 h
T1-1			
T1-2			
T1-3			
T1-4			
T1-5			
T1-6			
T1-7			
T1-8			
T1-9			
T1-10			
T2-1			
T2-2			
T2-3			
T2-4			
T2-5			
T2-6			
T2-7			
T2-8			
T2-9			
T2-10			
T3-1			
T3-2			
T3-3			
T3-4			
T3-5			
T3-6			
T3-7			
T3-8			
T3-9			
T3-10			
T4-1			
T4-2			
T4-3			
T4-4			
T4-5			
T4-6			
T4-7			
T4-8			
T4-9			
T4-10			

Amostra	24 h	48 h	72 h
T5-1			
T5-2			
T5-3			
T5-4			
T5-5			
T5-6			
T5-7			
T5-8			
T5-9			
T5-10			
T6-1			
T6-2			
T6-3			
T6-4			
T6-5			
T6-6			
T6-7			
T6-8			
T6-9			
T6-10			
T7-1			
T7-2			
T7-3			
T7-4			
T7-5			
T7-6			
T7-7			
T7-8			
T7-9			
T7-10			
T8-1			
T8-2			
T8-3			
T8-4			
T8-5			
T8-6			
T8-7			
T8-8			
T8-9			
T8-10			
T9-1			
T9-2			
T9-3			
T9-4			
T9-5			
T9-6			
T9-7			
T9-8			
T9-9			
T9-10			