

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

Dissertação de Mestrado

Karen Apellanis Borges

PORTO ALEGRE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

Autora: Karen Apellanis Borges

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Sanidade Avícola

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento
Co-orientadora: Anderlise Borsoi

PORTO ALEGRE

2011

B732p Borges, Karen Apellanis

Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. / Karen Apellanis Borges. – Porto Alegre: UFRGS, 2011.

75 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2011. Vladimir Pinheiro do Nascimento, Orient.

1. Medicina veterinária preventiva: aves 2. Avicultura 3. Sanidade avícola 4. *Salmonella* Enteritidis 5. PCR: aves I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, Orient. II. Borsoi, Anderlise, Co-orient. III. Título

CDD 619.4

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Karen Apellanis Borges

“PESQUISA DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA EM CEPAS DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.”

Aprovada em 31 MAR 2011

APROVADA POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Membro da Comissão

Prof. Dra. Laura Beatriz Rodrigues
Membro da Comissão

Prof. Dra. Luciana Ruschel dos Santos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que colocou em minha vida todas as pessoas que estão nestes agradecimentos.

Agradeço imensamente aos meus pais, Roberto e Tania, que sempre me incentivaram a me dedicar em tudo aquilo que eu fizesse, que me transmitiram seus valores e me ensinaram, com muito amor e carinho, que a família é a base de tudo. Também agradeço a minha irmã Michelle, que sempre foi uma ótima companhia e uma grande amiga. Agradeço ao meu namorado Thales, por todo o amor, carinho e apoio durante a realização deste projeto. A todos os meus tios, tias, primos, primas, agregados e a minha avó, por serem extremamente presentes na minha vida, e por me demonstrarem, na prática, o que é uma Grande Família.

Agradeço aos colegas, funcionários, estagiários e professores do C DPA, que de alguma maneira me ajudaram para a conclusão desta etapa. Agradecimento especial aos colegas Sílvio e Thales, que desde o início do experimento me auxiliaram muito, seja com palavras de incentivo ou com ensinamentos valiosos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento, pela oportunidade oferecida para que eu realizasse o mestrado e pela confiança para o desenvolvimento deste projeto. Também agradeço a minha co-orientadora, Prof. Dra. Anderlise Borsoi, pelo auxílio e ensinamentos ao longo desta caminhada.

RESUMO

Com a expansão da avicultura, ocorreu um aumento no número de aves alojadas, concentrando as produções e, conseqüentemente, facilitando a disseminação de doenças. Entre as doenças transmitidas pelo consumo dos produtos avícolas, a salmonelose tem especial importância. Nos últimos anos tem ocorrido um aumento na prevalência do sorovar *Salmonella* Enteritidis em todo o mundo, sendo o mais isolado. A patogenia da *Salmonella* e a forma como ela interage com seu hospedeiro são fenômenos multifatoriais e complexos. Entre os principais fatores de virulência da *Salmonella* estão os genes de virulência. O objetivo deste trabalho foi a pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *S. Enteritidis* oriundas de diferentes origens avícolas. Realizou-se a pesquisa de nove genes de virulência (*lpfA*, *agfA*, *sefA*, *invA*, *hilA*, *avrA*, *sopE*, *sivH*, *spvC*) em 84 amostras de *S. Enteritidis*. Os genes *invA*, *hilA*, *sivH*, *sefA* e *avrA* estiveram presentes em 100% das amostras (84/84); *lpfA* e *sopE* em 99% (83/84); *agfA* em 96% (81/84); e o gene *spvC* em 92% (77/84). Foi possível caracterizar as amostras em quatro diferentes perfis genéticos, sendo P1 positivo para todos os genes, P2 negativo apenas para *spvC*, P3 negativo apenas para *agfA* e P4 negativo para *lpfA*, *spvC* e *sopE*, sendo o grupo P1 o mais prevalente. Apesar de todas as cepas pertencerem a um mesmo sorovar, observou-se uma variação na presença dos genes de virulência. Os perfis estabelecidos e as frequências obtidas podem servir para a escolha de cepas a serem utilizadas para realização da PFGE e em futuros estudos *in vivo*.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, genes, virulência, PCR.

ABSTRACT

The poultry industry has been characterized by an increase in the number of housed animals in recent years, concentrating the production and facilitating the spread of many diseases. Among all illness transmitted by food, including meat and eggs, salmonellosis is of particular importance. Currently, there has been an increase in prevalence of islament of Salmonella Enteritidis all around the world. The pathogenesis of Salmonella and how it interacts with the host are a complex and multifactorial phenomenon. Among virulence factors of Salmonella, the virulence genes are the most important. The aim of this survey was to search for genes associated with virulence in strains of S. Enteritidis isolated from different origins, all from poultry. We conducted a search of nine virulence genes (lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC) in 84 samples of S. Enteritidis. The genes invA, hilA, sivH, sefA e avrA were present in 100% of samples (84/84); lpfA and sopE in 99% (83/84); agfA in 96% (81/84); and spvC in 92% (77/84) of them. It was possible to characterize the samples in four different genetic profiles, P1 being positive for all genes, P2 negative only for spvC, P3 negative only for agfA and P4 negative for lpfA, sopE and spvC. The P1 was the most prevalent. Despite all the strains belong to the same serovar, it is possible to observe a variation in the presence of virulence genes. These established profiles and gene frequencies obtained are useful to select strains to be used in PFGE and in future in vivo studies.

Key-words: Salmonella Enteritidis, genes, virulence, PCR.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sorovares mais prevalentes em aves vivas e carcaças de frango no Brasil	16
TABELA 2 - Genes alvo, <i>primers</i> utilizados, números de pares de bases dos <i>amplicons</i> (pb) e trabalhos de referência utilizados para os protocolos de amplificação.....	33
TABELA 3 - Controles positivos e negativos das reações de PCR.....	34
TABELA 4 - Resultado da pesquisa de genes associados à virulência nas 84 amostras de <i>Salmonella</i> Enteritidis analisadas.....	35
TABELA 5 - Perfis genéticos das 84 amostras de <i>Salmonella</i> Enteritidis analisadas.....	36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (<i>invA</i> , <i>hilA</i> , <i>sefA</i> , <i>lpfA</i> , <i>avrA</i> e <i>sopE</i>).....	36
FIGURA 2 -	Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (<i>agfA</i> , <i>spvC</i> e <i>sivH</i>).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Coleção Americana de Tipos de Cultura
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> - Infusão Cérebro-Coração
CEVS	Centro Estadual de Vigilância em Saúde (RS)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
HPI	<i>High Pathogenicity Island</i> – Ilha de Alta Patogenicidade
IL-8	Interleucina 8
IP	Ilha de Patogenicidade
kb	Quilobase (= 1.000 pares de base)
LPS	Lipopolissacarídeo
min	Minuto(s)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de campo pulsado
pH	Potencial hidrogeniônico
RS	Rio Grande do Sul
RV	Caldo Rappaport-Vassiliadis
seg	Segundo(s)
SGI-1	<i>Salmonella Genomic Island 1</i> – Ilha Genômica 1 de <i>Salmonella</i>
SP	São Paulo
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i> – Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	O gênero <i>Salmonella</i>	13
2.1.1	Características morfológicas e bioquímicas	13
2.1.2	Classificação	13
2.2	Salmonelose nas aves	14
2.3	Epidemiologia e importância das salmoneloses em saúde pública	15
2.4	<i>Salmonella</i> Enteritidis	18
2.5	Patogênese da infecção	19
2.6	Patogenicidade e Fatores de Virulência	20
2.6.1	Fatores relacionados à estrutura celular	21
2.6.2	Fatores relacionados à invasão e persistência intestinal	24
2.6.3	Fatores relacionados aos plasmídeos de virulência	29
2.7	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	30
3	MATERIAL E MÉTODO	32
3.1	Amostras de <i>Salmonella</i>	32
3.2	Pesquisa dos genes	32
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	APÊNDICE A – Amostras de <i>Salmonella</i> Enteritidis: ano de isolamento e origem	69
	APÊNDICE B – Genes de virulência pesquisados: sigla, significado e função	72
	APÊNDICE C – Protocolos utilizados para pesquisa dos genes: concentrações de reagentes do <i>mix</i> , condições do termociclador e número de ciclos de amplificação.....	73
	APÊNDICE D – Amostras de <i>Salmonella</i> Enteritidis: ano de isolamento, origem e perfil genético	74

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a produção brasileira de frango apresentou um aumento expressivo, sendo um importante fator de desenvolvimento econômico e social para o país. Apesar da grande crise que abalou a economia mundial em 2008, com reflexos em diferentes setores, a produção mundial de carne de frango aumentou em 2009. Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) a avicultura mundial produziu em 2009 cerca de 71,8 milhões de toneladas de carne de frango, aproximadamente 280.000 toneladas a mais que em 2008, indicando um aumento de 0,39%. Este aumento, mesmo que pequeno, é considerado positivo, visto que este foi um período de recuperação. Dados da União Brasileira de Avicultura (UBABEF, 2009) mostram que, assim como em 2008, o Brasil encerrou o ano de 2009 como o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, produzindo 10,9 milhões de toneladas, correspondendo a 15,3% da produção mundial. Em primeiro e segundo lugares encontram-se Estados Unidos e China, respectivamente. A previsão é que em 2010 o Brasil tenha produzido aproximadamente 11,5 milhões de toneladas de carne de frango. De acordo com o relatório anual da UBABEF, em 2009, o Brasil exportou 3,6 milhões de toneladas de carne de frango, 0,3% a menos que em 2008. Com a crise financeira internacional, alguns mercados compradores retraíram suas importações, como a Ásia, União Européia e as Américas, os quais apresentaram, respectivamente, redução de 7,6%, 5,8% e 34,3%. Por outro lado, outros mercados emergentes aumentaram as importações do produto brasileiro, como o Oriente Médio e a África, com um aumento de 22,7% e 22,2%, respectivamente. Os dados da UBA (2009) também demonstram que o Brasil foi o quarto maior consumidor de carne de frango em 2009, totalizando cerca de 7,8 milhões de toneladas, 11% do total consumido mundialmente. Os três maiores consumidores foram Estados Unidos, China e União Européia. Para 2010, ocorreu um aumento no consumo brasileiro de carne de frango, atingindo cerca de 8 milhões de toneladas.

Para que a produção de carne de frango alcançasse os níveis atuais, ocorreu uma expansão da avicultura industrial em todo o mundo. Durante esta expansão, aumentou-se o número de aves sendo produzidas, concentrando-se mais aves em um menor espaço físico.

Este aumento na concentração de aves gerou um maior risco de disseminação de doenças, que pode ser agravado se não houver boas medidas de biossegurança.

Entre as doenças que acometem as aves, têm especial importância aquelas que podem ser transmitidas ao homem através da carne e dos ovos. Desta forma, tornam-se ainda mais importantes os estudos que visam prevenir estas doenças nos plantéis avícolas. A *Salmonella* aparece como um dos principais agentes causadores de infecção alimentar em humanos. A presença desta bactéria na carne de frango é uma importante barreira para as exportações do produto, além de ser um risco potencial à saúde humana (WRAY; WRAY, 2000).

Devido à grande importância de se prevenir que alimentos contaminados com *Salmonella* cheguem aos países importadores e à mesa do consumidor, os principais países exportadores têm adotado medidas de controle para este e outros patógenos. No Brasil o controle é baseado em dois programas principais que buscam a redução e prevenção contra agentes causadores de importantes doenças nas aves e no homem. O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) e o Programa de Redução de Patógenos (PRP) visam a obtenção de alimentos inócuos através de medidas de controle na cadeia de produção avícola. Devido a estes programas, muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de se conhecer melhor esta bactéria e de se estabelecer medidas mais eficazes para o controle de *Salmonella* spp. nos plantéis avícolas e no produto final (BRASIL, 1994; BRASIL, 2003).

Devido a esta importância, os aspectos fisiológicos, estruturais e antigênicos da *Salmonella* são bastante pesquisados e conhecidos. Por outro lado, estudos moleculares ainda são insuficientes para se definir a forma exata de como ela interage com seus hospedeiros para causar doenças. Recentemente, têm surgido novos dados a respeito da identificação de genes que sintetizam os fatores responsáveis pela sua virulência.

O objetivo deste trabalho foi pesquisar nove genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras de diferentes origens avícolas e determinar perfis genéticos das amostras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Salmonella*

2.1.1 Características morfológicas e bioquímicas

O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído no ambiente em todo o mundo. Foi isolado e identificado pela primeira vez em 1885, por Daniel Elmer Salmon. Pertencente à família das enterobactérias, é um bacilo curto, Gram negativo, aeróbio e anaeróbio facultativo, não capsulado, não formador de esporo e móvel (com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), com flagelos peritríquios. A temperatura para ótimo crescimento é de 37°C, mas crescem entre 5° e 45°C. Crescem em pH entre 4 e 9, sendo 7 o pH ideal. Os membros deste gênero são oxidase negativos, catalase positivos, indol, urease e Voges Proskauer negativos, vermelho de metila e citrato de Simmons positivos, lisina e ornitina descaboxilase positivos. A maioria dos sorovares produz gás sulfídrico (H₂S). A glicose e outros carboidratos são metabolizados com produção de gás e ácido pela maioria dos sorovares. Normalmente são fermentadores de L-arabinose, D-sorbitol, maltose, D-manitol, D-manose, L-rhamnose, trehalose e D-xylose, porém não fermentam a lactose e a sacarose (GAST, 1997; GAST, 2008).

2.1.2 Classificação

O gênero *Salmonella* consiste de apenas duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II), *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb) , *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV) e *S. enterica* subespécie *indica* (VI). Essas subespécies podem ser diferenciadas bioquimicamente ou por análise antigênica. Bactérias classificadas como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* consistem em 99,5% dos micro-organismos isolados deste gênero (GRIMONT; WEILL, 2007).

Além da classificação em espécies e subespécies, existe a classificação das cepas em sorogrupos. A *Salmonella*, assim como outras enterobactérias, possui antígenos O (somáticos) e antígenos H (flagelares). Alguns grupos desta bactéria também possuem o antígeno Vi (capsular) (BRENNER *et al.*, 2000). Os antígenos O são polissacarídeos termoestáveis localizados na superfície da parede celular bacteriana, enquanto os antígenos H são constituídos por proteínas termolábeis, sendo algumas vezes produzidas em duas diferentes fases (1 e 2) (POPOFF; LE MINOR, 1997). As subespécies de *Salmonella* são divididas em 50 sorogrupos, classificadas com base no antígeno O. Os dois principais sorogrupos são o B e o D₁. No grupo B estão sorovares como *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*, enquanto que no grupo D₁ se destaca a *S. Enteritidis* (POPOFF, 2001). Dentro dos sorogrupos, existe, ainda, a classificação em sorovares. Atualmente, já foram identificados mais de 2.500 sorovares dentro do gênero *Salmonella*, sendo que cerca de 60% dos sorovares isolados de diferentes fontes pertencem à subespécie *enterica* (GRIMONT; WEILL, 2007; LIBBY *et al.*, 2008). Quando foram feitas as primeiras identificações de *Salmonella* spp., o nome do sorovar era escolhido com base no hospedeiro na qual ocorreu o primeiro isolamento. Conforme o *Center of Disease Control and Prevention* (CDC – EUA), nas cepas isoladas atualmente, o nome do sorovar deve ser escolhido conforme a região geográfica em que foi isolado. Os sorovares também podem ser denominados através de sua fórmula antigênica: designação da subespécie (I a VI), antígenos O e antígenos H (BRENNER *et al.*, 2000).

2.2 Salmonelose nas aves

A *Salmonella* spp. pode causar três doenças clínicas nas aves: Pulorose, Tifo e Paratifo Aviário. A Pulorose é uma doença causada pela *Salmonella Pullorum*, de ocorrência em aves jovens, com menos de três semanas de idade. A transmissão ocorre pela via horizontal (contato direto com aves portadoras, roedores, aves silvestres) ou pela via vertical (transovariana e extragenital). A sintomatologia em aves jovens é caracterizada pela presença de uma diarreia pastosa, de coloração esbranquiçada, e alta mortalidade, enquanto que as aves adultas geralmente são assintomáticas, podendo apresentar queda de postura de 30%. O Tifo é causado pela *Salmonella Gallinarum*, sendo mais comum em aves

adultas. A transmissão ocorre principalmente pela via horizontal, através do contato de aves suscetíveis com aves portadoras, roedores e aves silvestres. O principal sinal clínico é a presença de diarreia amarelo-esverdeada, e na necropsia observa-se uma coloração “bronzada” (marrom-esverdeada) do fígado (CHARLTON *et al.*, 2006; SHIVAPRASADI; BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). No passado, estas duas doenças representavam um grande problema para a indústria avícola, pois ocasionavam perdas econômicas nos plantéis avícolas, devido à perda de peso, às condenações ao abate, ao aumento da mortalidade, entre outras. Com o aumento das medidas de controle e biossegurança nos últimos anos, estes sorovares foram praticamente erradicados dos plantéis avícolas industrializados (SILVA; DUARTE, 2002; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). O Paratifo Aviário é causado pelos sorovares de *Salmonella* que não são adaptados às aves, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (GAST, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). Estes sorovares são mais importantes em questões de saúde pública do que pelo impacto econômico que causam em plantéis acometidos (CHARLTON *et al.*, 2006). As aves jovens são mais suscetíveis, podendo apresentar uma sintomatologia semelhante àquela causada por *Salmonella Pullorum*. Assim como na Pulorose, as aves mais velhas são mais resistentes e geralmente são assintomáticas ou apresentam queda de postura em torno de 10%. Os sorovares causadores do Paratifo podem permanecer no trato digestivo das aves até o período de abate, contaminando o produto final. Nas aves poedeiras, a bactéria permanece no trato reprodutor, contaminando os ovos produzidos. Estes sorovares são os principais responsáveis pelas infecções alimentares em humanos (CHARLTON *et al.*, 2006; GAST, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

2.3 Epidemiologia e importância das salmoneloses em saúde pública

A *Salmonella* spp. é considerada uma bactéria cosmopolita, com distribuição em praticamente todos os países. Surtos de salmoneloses são bastante comuns no continente Africano e no Asiático. Estudos realizados nestes locais demonstraram que a prevalência de *Salmonella* spp. varia de 11,6% até 32% em carcaças e cortes de frango (VERMA; GUPTA, 1997; LIMAWONGPRANEE *et al.*, 1999; CARDINALE *et al.*, 2003; MORITA

et al., 2003). Ainda hoje há isolamento de *Salmonella* spp. de produtos de origem avícola na Europa. As taxas de prevalência variam entre 35,83% na Espanha e 91,3% na Polônia. Em outros países, a taxa permanece inferior a 50% (BERNARDO; MACHADO, 1989; MACHADO; BERNARDO, 1990; ARVANITIDOU *et al.*, 1998; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2002; GLÓSNICKA; KUNIKOWSKA, 2002).

No Brasil existem muitos estudos de prevalência e frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em produtos de origem avícola. Um estudo realizado em 1996 pesquisou este micro-organismo em 45 cortes (15 peitos, 15 asas e 15 coxas) oriundos do comércio de Jaboticabal (SP). Dos cortes examinados, 35% estavam contaminados, sendo 46,6% de asas, 40% de peito e 20% de coxas. Neste estudo foram identificados 10 sorovares de *Salmonella* spp., sendo que o sorovar mais prevalente foi *S. Enteritidis* (COSTA *et al.*, 1997). No período de 1996 a 1997, 32% das amostras de carcaças de frango analisadas em São Paulo apresentaram a bactéria (SANTOS *et al.*, 2000). Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008), os dez sorovares mais frequentemente isolados de carcaças de frango e aves vivas no Brasil em 2008 estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sorovares mais prevalentes em aves vivas e carcaças de frango no Brasil.

Sorovares	Prevalência (%)
<i>S. Enteritidis</i>	48,8
<i>S. Infantis</i>	7,6
<i>S. Typhimurium</i>	7,2
<i>S. Heidelberg</i>	6,4
<i>S. Mbandaka</i>	4,8
<i>S. Agona</i>	3,6
<i>S. Rissen</i>	3,2
<i>S. Panamá</i>	2,0
<i>S. Give</i>	2,0
<i>S. Ohio</i>	1,2
<i>S. Senftenberg</i>	1,2

Fonte: BRASIL (2008)

Um trabalho realizado em Pelotas (RS) de 1997 a 1998 encontrou *Salmonella* spp. em 10,48% das amostras (13/124) de produtos de frangos pesquisados (BAÚ *et al.*, 2001). Pesquisou-se *Salmonella* spp. em 470 amostras de superfícies, água, carcaças de frango, cortes, vísceras e resíduos de matadouros-frigoríficos da região sul do Brasil. Foi

encontrada uma prevalência de 2,6%, sendo 10% de água de escaldagem, 6,7% de pernas frescas, 10% de asas congeladas, 20% de pele de peito e pernas e 10% da pele do pescoço (REITER *et al.*, 2007). Outro estudo realizado no RS detectou *Salmonella* spp. em 15,1% das carcaças analisadas e em 26,1% amostras de cortes de frango. Os principais sorovares identificados foram *S. Enteritidis* (51%), *S. Hadar* (26%) e *S. Heidelberg* (11%) (NASCIMENTO *et al.*, 1996). Contudo, não foi isolada *Salmonella* spp. em nenhum dos 564 ovos analisados em Pelotas em 1996 (BAÚ *et al.*, 2001). Estima-se que apenas um de cada 20.000 ovos comerciais produzidos nos Estados Unidos (EUA) esteja contaminado pelo micro-organismo (EBEL; SCHLOSSER, 2000). Ovos com casca íntegra, artificialmente contaminados com fezes contendo *S. Enteritidis* e armazenados em ambientes com oscilações de temperatura e umidade não apresentaram tendência de invasão do micro-organismo para o interior do ovo (BORGES *et al.*, 2009).

Mesmo com a crescente preocupação com os patógenos emergentes nos últimos anos, a *Salmonella* continua sendo a principal causa de infecção alimentar no mundo. Segundo o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), a salmonelose é responsável por, pelo menos, 1,4 milhões de doentes, 15.000 hospitalizações e 400 mortes por ano nos Estados Unidos (GAST, 2008). Alguns sorovares são espécies-específicos, mas a maioria pode afetar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo o homem (DARWIN; MILLER, 1999). Durante o período de 1997 a 2007, o Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS/RS) recebeu 1.777 notificações de surtos de doenças transmitidas por alimentos. Deste total, 669 (37,6%) deles foram causados por diferentes sorovares de *Salmonella*. Mais de 50 casos estão relacionados ao consumo de carne de frango, e quase 400 foram ocasionados pelo consumo de salada de maionese contendo ovos crus (FIGUEIREDO, 2008). Apesar desta alta relação entre o consumo de ovo e os surtos alimentares envolvendo micro-organismos do gênero *Salmonella*, poucos estudos demonstram o isolamento da bactéria diretamente dos ovos disponíveis para o consumo. Em uma tentativa de isolamento de *Salmonella* em 19 amostras de alimentos envolvidos em dez surtos alimentares relacionados à salmonelose em 2005 no RS, relacionaram-se ovos, maionese e carne de frango em oito destes surtos. As maiores contagens de *Salmonella* foram encontradas em alimentos contendo maionese (MUERMANN *et al.*, 2008).

2.4 *Salmonella* Enteritidis

Nos países europeus, o isolamento de *S. Enteritidis* tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Em Portugal, no período de 1986 a 1987, foram analisadas 300 amostras de carcaças de frango, onde se isolou *Salmonella* spp. de 55% delas, sendo *S. Enteritidis* o sorovar mais prevalente (65,5%) (BERNARDO; MACHADO, 1989; MACHADO; BERNARDO, 1990). Em relação à prevalência de sorovares circulantes na Europa, de 1962 a 1991, observou-se um aumento da ocorrência de *S. Enteritidis* de 93,8% (GLÓSNICKA; KUNIKOWSKA, 2002). De 1978 a 1988, detectou-se a presença de *S. Enteritidis* em 5,45% dos 118.685 isolados de *Salmonella* a partir de humanos e 2,65% dos 3.315 isolados a partir de alimentos na Itália. *S. Enteritidis* foi relatada em 7,4% dos 568 isolados de *Salmonella* a partir de ovos e carne de frango (FANTASIA *et al.*, 1991). Já no período de 1982 a 1992, observou-se que o isolamento de *S. Enteritidis* em humanos acometidos pela salmonelose aumentou de 2,4% para 57,1%, e a partir das amostras de alimentos aumentou de 0,5% para 22,8% (FANTASIA; FILETICI, 1994).

O isolamento de *S. Enteritidis* em surtos de intoxicação alimentar tem aumentado nos últimos anos na América do Norte, segundo alguns estudos. No Canadá, a prevalência de *S. Enteritidis* em humanos aumentou de 9% para 12% de 1989 a 1991 (POPPE, 1994). Nos Estados Unidos, a *S. Enteritidis* é o segundo sorovar mais frequente em fontes humanas, sendo *S. Typhimurium* o mais frequente, e o nono em amostras clínicas não humanas em 2001 (OLSEN *et al.*, 2001).

Esse aumento na prevalência do sorovar *S. Enteritidis* também foi observado nos países da América do Sul. Desde 1994, a ocorrência de *S. Enteritidis* no Chile aumentou 3.000%, se comparada às baixas taxas dos anos anteriores, sendo que as razões para a emergência deste sorovar não estão bem esclarecidas (PRAT *et al.*, 2001). Assim como nos outros países, também houve um aumento de *S. Enteritidis* na Argentina desde 1986. Entre 1986 e 1993, foram relatados 150 surtos de infecções alimentares por *S. Enteritidis*, afetando cerca de 6.230 pessoas (CAFFER; EIGUER, 1994).

A partir de 1993, a *S. Enteritidis* emergiu como um grande problema de saúde pública no Brasil, visto que era raramente isolada de infecções humanas até 1990. Desde

então sua prevalência tem aumentado e passou a corresponder a mais de 60% dos sorovares isolados no Instituto Adolfo Lutz, a partir de 1995. Alguns autores afirmam que a grande prevalência de *S. Enteritidis* em aves pode estar relacionada com as tentativas de erradicação de *S. Gallinarum* dos plantéis, uma vez que este excluía competitivamente a *S. Enteritidis* (SILVA; DUARTE, 2002). Um estudo analisou 2.254 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de infecções humanas de 1991 a 1995. Em 1991, apenas 1% das amostras pertencia ao sorovar *S. Enteritidis*, aumentando para 2% em 1992, 10,1% em 1993, 43,3% em 1994 e 64,9% em 1995 (TAVECHIO *et al.*, 1996). De 4.581 amostras de *Salmonella* spp. isoladas no Brasil a partir de fontes não humanas entre 1996 e 2000, 32,7% pertenciam ao sorovar *S. Enteritidis* (TAVECHIO *et al.*, 2002). Das 669 notificações de doenças transmitidas por alimentos relacionadas ao gênero *Salmonella*, recebidas pelo CEVS/RS, entre 1997 e 2007, 80,8% foram causadas pelo sorovar *S. Enteritidis* e 3,5% pelo sorovar *S. Typhimurium* (FIGUEIREDO, 2008).

2.5 Patogênese da infecção

A transmissão para o homem geralmente ocorre através do consumo de alimentos contaminados, principalmente carnes e ovos, mas a infecção entre humanos e entre animais e humanos também pode ocorrer (PROST; RIEMANN, 1967; DARWIN; MILLER, 1999). Após a ingestão oral, as bactérias que sobreviveram ao baixo pH provocado pelo ácido clorídrico, colonizam o intestino, principalmente nas Placas de Peyer, onde estão localizadas as células M. Depois da colonização intestinal, a *Salmonella* invade as células M e os enterócitos, com auxílio do Sistema de Secreção do Tipo III (GAL-MOR, 2010). Estudos com camundongos demonstram que, das bactérias ingeridas e que resistiram ao baixo pH, 80% delas são eliminadas diretamente nas fezes, 15% permanecem na superfície das células intestinais e apenas 5% delas invadem o epitélio. Após a invasão celular, as células bacterianas são fagocitadas por macrófagos. Quando os macrófagos conseguem deter a bactéria, ela causa apenas a infecção local no trato digestivo. Por outro lado, quando as bactérias conseguem permanecer viáveis dentro dos macrófagos, ocorre a infecção sistêmica. Dentro dos macrófagos, a *Salmonella* consegue se multiplicar e é levada a todo o organismo (BÄUMLER *et al.*, 1997). Através de proteínas efectoras, a bactéria provoca a

apoptose desses macrófagos e, utilizando-se de um segundo tipo de Sistema de Secreção do Tipo III (codificado por outra região do DNA bacteriano), o micro-organismo consegue sair desta célula e voltar para o lúmen intestinal para ser eliminado através das fezes (GALMOR, 2010). Esta sequência de fatos leva a uma lesão dos vilos intestinais e à redução da superfície de absorção. A *Salmonella* também faz com que ocorra influxo de células polimorfonucleares para a mucosa infectada, induzindo a uma diarreia aquosa que pode conter sangue (WALLIS; GALYOV, 2000). A salmonelose pode causar diversos sintomas, como infecções focais, febre entérica, septicemia e enterocolite, sendo este último o mais comum (DARWIN; MILLER, 1999). A severidade da doença depende do sorovar e da imunidade do hospedeiro. Pessoas muito jovens ou imunologicamente debilitadas tendem a apresentar quadros clínicos mais severos, enquanto que em adultos saudáveis a enterite tende a ser auto-limitante (WALLIS; GALYOV, 2000). O período de incubação varia de 6 a 48 horas e é seguido de cefaléia, dor abdominal, vômito e diarreia (DARWIN; MILLER, 1999).

2.6 Patogenicidade e Fatores de Virulência

Os micro-organismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie por possuírem e expressarem genes que codificam os fatores de virulência (VIEIRA, 2009), que conferem à bactéria a habilidade de causar doença no seu hospedeiro (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). Estes fatores propiciam a invasão e colonização das células do hospedeiro pelo micro-organismo, levando à ocorrência de uma série de eventos que levam ao aparecimento da doença. Estes fatores podem ser mecanismos de invasão, que interfiram na resposta imune do hospedeiro ou mecanismos de resistência a antimicrobianos (VIEIRA, 2009). Os fatores de virulência podem estar localizados no próprio cromossomo da bactéria, como nas Ilhas de Patogenicidade, ou em elementos genéticos transmissíveis, como *transposons*, plasmídeos e bacteriófagos (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

A *Salmonella* spp. encontra uma série de microambientes ao longo do seu processo de infecção, além da necessidade de sobreviver aos processos do sistema imune do hospedeiro. Para se adaptar a estas condições, a bactéria necessita de um grande número de genes. Os genes envolvidos nos processos de captação e/ou biossíntese de nutrientes, de resposta ao *stress* e de recuperação dos danos à célula bacteriana são chamados de

housekeeping genes. Estes genes são necessários para a manutenção da viabilidade da célula bacteriana e são comuns a bactérias da mesma família, como *Escherichia coli*. Um segundo grupo de genes distingue a *Salmonella* spp. de outras bactérias de gêneros semelhantes. Neste grupo estão aqueles genes necessários para a adaptação da bactéria à célula hospedeira e para que ela supere os mecanismos de defesa do hospedeiro (HACKER; CARNIEL, 2001).

A virulência da *Salmonella* está relacionada à combinação dos fatores cromossômicos e plasmidiais (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Entre eles estão aqueles relacionados à habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, à resistência à ação do sistema complemento, à produção de toxinas e à resistência a antimicrobianos (RODRIGUES, 2005). A patogenia da *Salmonella* é um fenômeno multifatorial e complexo (WALLIS; GALYOV, 2000), de forma que as estratégias tradicionais de epidemiologia, as quais são baseadas em métodos de análise fenotípica, são bastante úteis, mas também são limitadas (OLIVEIRA *et al.*, 2007). O uso da biologia molecular, em associação com modelos de estudo *in vivo*, tem permitido um maior entendimento dos mecanismos pela qual a *Salmonella* interage com o hospedeiro (WALLIS; GALYOV, 2000).

2.6.1 Fatores relacionados à estrutura celular

2.6.1.1 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) está situado na parede de bactérias Gram negativas e é composto por três regiões: cadeia de polissacarídeos (antígenos O), oligossacarídeo (região do *core*) e molécula lipídica (lipídeo A). As propriedades tóxicas do LPS estão relacionadas ao lipídeo A. O LPS provoca uma série de reações que estão envolvidas com a patogênese das infecções por *Salmonella* spp., sendo considerada uma endotoxina (PERRY, 1993). O LPS é responsável pela indução de efeitos patofisiológicos no hospedeiro, como febre, hipotensão, leucocitose, inflamação, choque séptico e morte (PERRY, 1993; FREUDENBERG *et al.*, 2001).

2.6.1.2 Flagelos

A maioria dos sorovares de *Salmonella* possui cerca de 5 a 10 flagelos que conferem motilidade às bactérias. Os genes responsáveis pelos antígenos flagelares de fase

1 e 2 para *Salmonella* são expressas pelos genes *fliC* e *fljB*, respectivamente. Estes genes estão localizados em duas regiões diferentes no cromossomo, podendo ser transcritos de forma alternada. Desta forma, pode ocorrer uma inversão reversível de fase flagelar (ECHEITA *et al.*, 2002). A variação de fase flagelar pode estar relacionada com a capacidade da *Salmonella* de não ser inativada pelo sistema de defesa do hospedeiro (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

2.6.1.3 Fímbrias

As fímbrias são filamentos protéicos mais curtos que os flagelos e são produzidas na superfície da bactéria (CLOUTHIER *et al.*, 1993). São compostas por apenas uma proteína estrutural, a pilina, e estão dispostas de maneira helicoidal na superfície bacteriana. As fímbrias são responsáveis pela fixação da bactéria à célula do hospedeiro, sendo essenciais para a patogenicidade de *Salmonella* (CLOUTHIER *et al.*, 1993; BISHOP *et al.*, 2006). Esta adesão à superfície é importante na interação bactéria-hospedeiro, na colonização e invasão de células intestinais, na persistência ambiental e na formação de biofilmes (GIBSON *et al.*, 2007).

Existem diferentes tipos de fímbrias, sendo que os mais importantes e estudados são: fímbrias do tipo I (Fim), fímbrias codificadas por plasmídeos (*Plasmid Encoded Fimbriae* – PEF), fímbria polar longa (*Long Polar Fimbriae* – LPF) e fímbrias agregativas (*Aggregative fimbriae* -AGF). Estudos demonstram que cada uma destas fímbrias possui tropismo por diferentes tipos de células em diferentes hospedeiros. As cepas pertencentes ao grupo D₁, incluindo o sorovar *S. Enteritidis*, também possuem a fímbria de *Salmonella* Enteritidis (*Salmonella Enteritidis Fimbriae* – SEF) (DARWIN; MILLER, 1999).

2.6.1.3.1 Gene *lpfA*

A fímbria longa polar é mais longa do que as demais fímbrias e está polarmente localizada na célula bacteriana. O *operon lpfABCDE*, que apresenta cinco genes, foi identificado pela primeira vez em uma cepa de *S. Typhimurium*. Este *operon* não é encontrado em outras bactérias pertencentes à família das enterobactérias, como *Escherichia coli*, e parece estar presente somente em alguns sorovares de *S. enterica* e em *S. bongori* (BÄUMLER; HEFRON, 1995; DARWIN; MILLER, 1999). O *operon lpf* pode

estar ativado (modo *on*) ou desativado (modo *off*), conforme o meio em que a bactéria se encontra (KINGSLEY *et al.*, 2002). Está relacionado com a adesão da *Salmonella* às células M do intestino. Em estudos com ratos, foi demonstrado que a fimbria longa polar está envolvida no tropismo pelas placas de Peyer do intestino, primeiro sítio de infecção desta bactéria. Desta forma, ela é importante no início da infecção, após contaminação oral, juntamente com outros genes relacionados à invasibilidade (BÄUMLER *et al.*, 1996a; BÄUMLER *et al.*, 1996b). O gene *lpfA* codifica a maior subunidade da fimbria longa polar (HEUZENROEDER, *et al.*, 2000). Outra função que pode estar relacionada a esta fimbria é a de conferir imunidade cruzada entre os diferentes sorovares de *Salmonella* (NORRIS; BÄUMLER, 1999). O operon *lpf* não é conservado entre os sorovares, provavelmente devido à seleção entre bactérias com e sem o gene em diferentes hospedeiros (BÄUMLER *et al.*, 1997).

2.6.1.3.2 Gene *agfA*

O operon *agf*, em *Salmonella* Enteritidis, codifica a fimbria SEF17 ou Tafi (*Thin Aggregative Fimbriae*) (COLLINSON *et al.*, 1993; WHITE *et al.*, 2003), um polímero multifuncional conservado na maioria dos sorovares de *Salmonella* (DORAN *et al.*, 1993; BÄUMLER *et al.*, 1997). Esta fimbria é semelhante a fimbrias de outras espécies de enterobactérias, tais como a fimbria curli de *E. coli* (WHITE *et al.*, 2003). O gene *agfA* codifica a subunidade AgfA da fimbria agregativa, que na *S. Enteritidis* consiste de dois domínios (COLLINSON *et al.*, 1999). Um das principais funções desta fimbria é promover a interação inicial da bactéria com o intestino do hospedeiro (SUKUPOLVI *et al.*, 1997). Estudos têm demonstrado que esta fimbria se liga a várias proteínas do hospedeiro, entre elas a fibronectina, facilitando a sobrevivência da bactéria e a sua associação deste com o epitélio intestinal (COLLINSON *et al.*, 1993). Também está relacionada com a autoagregação da *Salmonella* spp., que é importante para aumentar a sobrevivência desta frente aos ácidos estomacais do hospedeiro, de surfactantes e de outros agentes bactericidas, uma vez que a agregação reduz a superfície de contato (COLLINSON *et al.*, 1991; COLLINSON *et al.*, 1993). A produção de Tafi também está relacionada com a formação de biofilmes por *S. Enteritidis* em superfícies inertes, pois facilita a adesão da bactéria (AUSTIN *et al.*, 1998; WHITE *et al.*, 2003).

2.6.1.3.3 Gene *sefA*

O operon *sef* contém quatro genes (*sefABCD*) necessários para a translocação e formação da fimbria SEF14 (EDWARDS *et al.*, 2000), uma das principais do gênero *Salmonella* (MURUGKAR *et al.*, 2003). A SEF14 contém quatro subunidades protéicas: SefA, SefB, SefC e SefD, que estão distribuídas em sequência na fimbria (MURUGKAR *et al.*, 2003). O gene *sefA* codifica a maior subunidade da proteína SefA, que compõe a fimbria SEF14 (MIRMOMENI *et al.*, 2008). O *sefB* codifica uma proteína da membrana externa, *sefC* codifica o maior componente da fimbria (MURUGKAR *et al.*, 2003), e *sefD* uma adesina (EDWARDS *et al.*, 2000). Este gene está restrito ao sorovar *S. Enteritidis* e outros do grupo D₁ (TURCOTTE; WOODWARD, 1993; COLLINSON *et al.*, 1996; EDWARDS *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2006; RANK *et al.*, 2009), tais como *S. Blegdam*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Rostock*, *S. Seremban* e *S. Typhi* (TURCOTTE; WOODWARD, 1993).

2.6.2 Fatores relacionados à invasão e persistência intestinal

A interação inicial entre a bactéria e as células epiteliais do hospedeiro não são muito conhecidas, mas sabe-se que neste processo estão envolvidos o Sistema de Secreção do Tipo III (*Type III Secretion System* – TTSS) e as Ilhas de Patogenicidade (IP) (BARROW *et al.*, 2010).

O Sistema de Secreção do Tipo III é um complexo sistema de proteínas presente em todas as bactérias Gram negativas (MIRMOMENI *et al.*, 2008). Nas bactérias patogênicas, este complexo serve como um canal para secreção de proteínas efetoras para o interior da célula eucariótica. Estas proteínas possuem propriedades que auxiliam a bactéria a infectar as células do hospedeiro (HUECK, 1998). Os TTSS possuem mais de 40 genes codificadores de proteínas estruturais, chaperonas e proteínas efetoras (GROISMAN; OCHMAN, 1996).

As ilhas (mais de 10kb) ou ilhotas (menos de 10kb) genômicas são grandes elementos genéticos com propriedades diferentes do restante do genoma bacteriano. Cada uma destas ilhas possui uma função específica. Aquelas sequências responsáveis pelas

funções patogênicas da bactéria são chamadas de “Ilhas de Patogenicidade” (HACKER; CARNIEL, 2001). As IPs foram descritas pela primeira vez em *E. coli*, mas depois também foram observadas em outros micro-organismos (BARROW *et al.*, 2010). Apresentam pelo menos um gene associado à patogenicidade, podendo também codificar vários fatores de virulência ou o arsenal necessário para que estes fatores consigam alcançar o alvo na célula hospedeira. Estão localizadas em regiões específicas do genoma bacteriano (VIEIRA, 2009; BARROW *et al.*, 2010). A aquisição das IPs através da transferência horizontal permite que rapidamente a bactéria apresente novas funções de virulência oriundas de outras cepas de *Salmonella* spp. ou outras espécies de micro-organismos. Apesar de estas ilhas serem diferentes, muitas características são comuns e conservadas entre elas (HENSEL, 2004). A maioria dos fatores de virulência das bactérias do gênero *Salmonella* está codificada em genes agrupados em IPs (VIEIRA, 2009), que nestas bactérias são chamadas de *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI). Já foram descritas dezessete diferentes ilhas em *Salmonella* spp. até o momento (BARROW *et al.*, 2010). Algumas delas são conservadas entre os diferentes sorovares de *Salmonella*, indicando que foram adquiridas há muitos anos, como SPI-1. Outras ilhas são específicas de determinados sorovares e, provavelmente, adquiridas recentemente como SPI-7, SPI-8 e SPI-15 (HENSEL, 2004; BARROW *et al.*, 2010). A presença destas SPI comprova a tese de que bactérias deste gênero teriam um ancestral em comum com *Escherichia coli*, já que estes micro-organismos possuem em seu DNA algumas regiões homólogas (RYCHLIK *et al.*, 2009).

Diferentes genes associados à virulência de *Salmonella* spp. estão presentes nestas ilhas. As ilhas mais bem descritas e estudadas são SPI-1 e SPI-2. A SPI-1 possui genes que codificam proteínas para o T TSS (VIEIRA, 2009). A invasão e sobrevivência da *Salmonella* spp. nas células hospedeiras estão relacionadas com uma série de proteínas bacterianas, entre elas SopE, AvrA e SptP, que chegam até o citoplasma da célula hospedeira através dos sistemas de secreção (MIRMOMENI *et al.*, 2008). A SPI-1 está presente em *S. bongori* e em todos os sorovares de *S. enterica* analisados (HENSEL, 2004). A principal função da SPI-1 é conferir uma maior capacidade de invasão da célula hospedeira pela bactéria, visto que possui mais de 25 genes associados à invasão (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001). Também está relacionada com a captação de ferro (BORROW *et al.*, 2010). A SPI-2 é composta por duas diferentes porções, uma delas

presente apenas nos sorovares de *S. enterica* e outra comum às espécies *S. bongori* e *S. enterica*. A porção maior está relacionada com outro tipo de TTSS, que é ativado pela bactéria quando ela já está dentro da célula do hospedeiro, ao contrário do TTSS da SPI-1 (HANSEL, 2004). O TTSS da SPI-2 transporta proteínas que protegem a bactéria dos mecanismos de defesa, permitindo que ela sobreviva dentro das células fagocíticas, especialmente os macrófagos (RYCHLIK *et al.*, 2009; VIEIRA, 2009). As proteínas efetoras secretadas pelo TTSS da SPI-1 mediam os primeiros estágios da infecção (GALLAN; COLLMER, 1999; WALLIS; GALLYOV, 2000), enquanto que aquelas secretadas pelo TTSS da SPI-2 atuam na infecção sistêmica (HANSEL, 2000). Aparentemente, ambas as IPs foram adquiridas por transferência horizontal de genes, pois as concentrações das bases nitrogenadas guanina e citosina (concentração GC) nestas ilhas são diferentes da concentração normalmente encontrada nos genes típicos de *Salmonella* spp. (OCHMAN; GROISMAN, 1996). As ilhas 1 e 2 são as mais importantes para a virulência de *S. Enteritidis* em galinhas, resultando em aumento significativo na colonização do fígado e baço por este sorovar (RYCHLIK *et al.*, 2009).

A SPI-3 codifica elementos que protegem a bactéria dentro da célula hospedeira (VIEIRA, 2009; BARROW *et al.*, 2010). A principal função desta ilha é codificar um sistema de captação e alta afinidade por magnésio (Mg^{2+}), cátion necessário para a adaptação nutricional da bactéria, permitindo sua sobrevivência no interior das células fagocíticas. Esta IP está conservada entre os sorovares *S. Typhi* e *S. Typhimurium*, e na espécie *S. bongori*. A SPI-4 é conservada entre os diferentes sorovares de *S. enterica*. A SPI-4 é necessária para a sobrevivência de *Salmonella* spp. dentro dos macrófagos e também possui o Sistema de Secreção do Tipo I (HANSEL, 2004). A SPI-5 codifica proteínas efetoras dos TTSS codificados por SPI-1 e SPI-2 (HANSEL, 2004; BARROW *et al.*, 2010). A SPI-6 ou Ilha Cromossomal de *Salmonella* spp. está presente nos sorovares *S. Typhi* e *S. Typhimurium*. Nesta IP estão localizados os genes *saf*, codificador de fimbrias, e *pagN*, codificador de uma invasina, e de proteínas sem função conhecida. Esta IP não está relacionada com a infecção sistêmica, mas possui influência na capacidade de invasão da bactéria. A SPI-7 ou Ilha Maior de Patogenicidade está presente apenas nos sorovares *S. Typhi*, *S. Dublin* e *S. Paratyphi C* (HANSEL, 2004; BARROW *et al.*, 2010). A SPI-8 parece estar restrita ao sorovar *S. Typhi*. Ainda não se sabe exatamente qual é sua função.

A SPI-9 contém genes para o TTSS, sendo descrito principalmente nos sorovares *S. Typhi* e *S. Typhimurium*. A SPI-10 está relacionada com o *operon sef* para fímbrias. Está presente somente nos sorovares *S. Enteritidis* e outros do grupo D₁, sendo considerado um dos fatores determinantes da especificidade do hospedeiro (HANSEL, 2004). A SPI-11 está relacionada com as proteínas efetoras do TTSS. SPI-12, SPI-14 e SPI-15 são responsáveis pela produção de proteínas sem função conhecida. A SPI-13 está relacionada com a sobrevivência de *Salmonella* spp. no interior dos macrófagos. SPI-16 e SPI-17 estão relacionadas com genes de modificação do LPS (BARROW *et al.*, 2010). Além destas IPs, outras duas ilhas foram descritas: Ilha Genômica 1 de *Salmonella* (*Salmonella Genomic Island 1* - SGI-1) e a Ilha de Alta Patogenicidade (*High Pathogenicity Island* - HPI) (HANSEL, 2004; KARASOVA *et al.*, 2010). A SGI-1 está relacionada com a resistência a antimicrobianos, enquanto que a HPI parece estar relacionada com a habilidade de algumas cepas provocarem septicemia (HANSEL, 2004) e de captarem de ferro (BARROW *et al.*, 2010).

2.6.2.1 Gene *invA*

O mecanismo pelo qual a *Salmonella* spp. invade as células hospedeiras é bastante complexo. A bactéria promove sua internalização através da estimulação de células não fagocíticas. Um dos genes envolvidos neste processo é o *invA*, que está localizado no *operon invABCD*, presente na SPI-1. Este gene codifica a proteína InvA da membrana interna da bactéria, sendo essencial para a invasão das células epiteliais do hospedeiro (DARWIN; MILLER, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Este gene é conservado em todos os sorovares de *Salmonella* (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Por ser considerado específico deste gênero, o *invA* é utilizado como gene alvo para detecção de *Salmonella* spp. através da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (SALEHI *et al.*, 2005).

2.6.2.2 Gene *hilA*

A expressão dos genes relacionados à invasão da célula hospedeira depende do regulador central HilA, codificado pelo gene *hilA* (*Hiperinvasive*) da SPI-1 (DARWIN; MILLER, 1999; GUO *et al.*, 2000). Esta proteína é necessária para a expressão dos componentes do TTSS. A invasão das células epiteliais e a indução de apoptose dos

macrófagos é totalmente dependente da proteína HilA. A expressão deste gene está relacionada com sua ativação pela proteína SirA, influenciada por sinais ambientais que ativam a invasão celular (DARWIN; MILLER, 1999).

2.6.2.3 Gene *avrA*

A proteína AvrA foi descrita recentemente como uma proteína efetora do TTSS, contribuindo com o complexo de virulência da *Salmonella* spp. Os primeiros estudos relatavam AvrA como uma proteína anti-virulência, codificada pelo gene *avrA* (*Avirulence*), e que evitaria a invasão e colonização de patógenos (HARDT; GALÁN, 1997). Outros estudos já demonstraram que AvrA é, na verdade, uma proteína que limita a virulência de *Salmonella* spp. Nos hospedeiros. É uma protease que ajuda a induzir a apoptose celular, especialmente dos macrófagos, e a inibir a produção da Interleucina 8 (IL-8) e do Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), prejudicando a resposta inflamatória do hospedeiro (COLLIER-HYAMS *et al.*, 2002). Este gene também está localizado na SPI-1, sendo que esta proteína não é produzida em grande quantidade (DARWIN; MILLER, 1999). Alguns sorovares não possuem este gene, como é o caso dos sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi* (BEN-BARAK *et al.*, 2006).

2.6.2.4 Gene *sopE*

As proteínas Sop (*Salmonella Outer Protein*) são codificadas pelo operon *sop* (*sopABCDE*). Uma destas proteínas é a SopE, codificada pelo gene *sopE* (RAHMAN *et al.*, 2004; MIRMOMENI *et al.*, 2008), localizado em um bacteriófago (MIROLD *et al.*, 1999). Esta proteína contribui para a invasão de *Salmonella* spp. nas células do hospedeiro através da estimulação de deformações da membrana (RAHMAN *et al.*, 2004; MIRMOMENI *et al.*, 2008) e rearranjos do citoesqueleto (HOPKINS; THRELFALL, 2004). A aquisição deste gene é importante na emergência de cepas epidêmicas, e a identificação do gene *sopE* pode auxiliar a identificar aquelas cepas de *Salmonella* spp. que possuem um alto potencial para causarem surtos epidêmicos. Como é bastante detectado em *S. Enteritidis* é provável que contribua para uma maior circulação deste sorovar entre a população de hospedeiros (HOPKINS; THRELFALL, 2004). Segundo Rahman *et al.* (2004), a prevalência do gene nos diferentes sorovares não é influenciada pela origem de isolamento da cepa.

2.6.2.5 Gene *sivH*

O gene *sivH* codifica uma proteína da membrana externa da bactéria que também está relacionada com a colonização intestinal por *Salmonella*, sendo importante para a colonização das placas de Peyer. Porém, possivelmente não está relacionado com a infecção no ceco e no baço (KINGSLEY *et al.*, 2003) e também não está relacionado com a eliminação da bactéria nas fezes (BARROW *et al.*, 2010). Este gene está localizado na ilha CS54, identificada inicialmente em *S. Typhimurium* (KINGSLEY *et al.*, 2003).

2.6.3 Fatores relacionados aos plasmídeos de virulência

Os plasmídeos são elementos genéticos que se replicam independentemente do cromossomo do hospedeiro, sendo encontrados na forma circular no interior de células procarióticas. São pequenas quantidades de DNA circular extracromossomal que contém genes que conferem propriedades especiais às bactérias, diferindo dos genes localizados no cromossomo por não serem vitais à célula bacteriana (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os plasmídeos de virulência são um dos vários fatores determinantes da virulência de *Salmonella*, estando envolvidos na sobrevivência e crescimento da bactéria no interior da célula hospedeira. Apesar de não estarem associados à interação inicial dela com a mucosa intestinal e nem à invasão de tecidos mais profundos, permitem a persistência do micro-organismo nas células reticuloendoteliais do fígado e do baço (SWAMY *et al.*, 1996; CASTILLA *et al.*, 2006), e são necessários para iniciar o processo de infecção sistêmica (ROTGER; CASADESÚS, 1999). A maioria dos sorovares de *Salmonella* normalmente não possui plasmídeos, como os sorovares *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Hadar* e *S. Infantis*. Contudo, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* frequentemente possuem estes elementos genéticos. Cepas de *S. Enteritidis* contendo plasmídeos são mais frequentes em amostras isoladas do sangue e de material extraintestinal do que aquelas isoladas de fezes (ROTGER; CASADESÚS, 1999).

2.6.5.1 Gene *spvC*

Os plasmídeos de virulência de *Salmonella* medem, em geral, de 50 a 90kb, mas apenas uma região de 7.8kb, presente em todos os plasmídeos, é necessária para conferir à bactéria um fenótipo de virulência. Nesta região está localizado o *operon spv* (*Salmonella Plasmid Virulence*), que contém cinco genes (*spvRABCD*). O gene *spvR* é o regulador, sendo conservado entre os diferentes plasmídeos de virulência (ROTGER; CASADESÚS, 1999). Estes plasmídeos podem estar presentes em sorovares como *S. Abortusequi*, *S. Abortusovis*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (BARTH; BAUERFEIND, 2005). Os genes pertencentes ao *operon spv* são descritos como específicos de *S. Enteritidis* (NASHWA *et al.*, 2009).

O gene *spvC* é detectado somente no citoplasma (ROTGER; CASADESÚS, 1999), sendo um dos responsáveis pelo aumento da taxa de crescimento de *Salmonella* spp. nas células do hospedeiro e por afetar a interação com o sistema imune deste. Apesar disto, este gene não parece exercer um papel fundamental no estabelecimento da infecção gastrointestinal típica provocada por *Salmonella* spp. (SWAMY *et al.*, 1996). Experimentos com diferentes espécies animais têm demonstrado que os plasmídeos de virulência de *Salmonella* têm aumentado a capacidade da bactéria de replicar em órgãos extra-intestinais, levando o hospedeiro à morte em um menor tempo e com maior frequência (BARTH; BAUERFEIND, 2005).

2.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Atualmente, as ferramentas moleculares de diagnóstico, baseadas na análise de DNA, possuem grande importância no estudo epidemiológico de *Salmonella* spp. Diferentes técnicas moleculares vêm sendo utilizadas, tais como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, perfil de plasmídeos, ribotipagem, perfil determinado por seqüências de inserção e eletroforese em campo pulsado (PFGE) (BETANCOR *et al.*, 2004).

A PCR é um método de amplificação exponencial do DNA, ou seja, criação de múltiplas cópias *in vitro*. Primeiramente é feita a extração do material genético da amostra, que pode ser feita por calor, fenol-clorofórmio, entre outros. O DNA extraído é adicionado

a uma mistura de reagentes (*mix*) que contém desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), bases nitrogenadas ligadas com um fosfato, *primers*, também chamados de oligonucleotídeos ou iniciadores, solução tampão, cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e a enzima DNA polimerase. Este *mix* é colocado em um termociclador, o qual regula ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos e específicos para cada fragmento a ser amplificado. Neste equipamento as amostras são submetidas a ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Na primeira etapa do ciclo a temperatura é elevada para que ocorra a desnaturação, que é a separação da dupla cadeia de DNA. Na segunda etapa a temperatura é reduzida para que ocorra o anelamento, pareamento dos *primers* com a fita molde de DNA. Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada para que ocorra a extensão, que é a síntese de uma nova fita de DNA realizada pela enzima DNA-Polimerase. Normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos para cada reação. Após este processo, é feita a eletroforese em gel de agarose para a visualização, através de luz ultravioleta, das bandas correspondentes à amplificação dos fragmentos do gene da amostra (SAIKI *et al.*, 1988; CHENG *et al.*, 1994).

3. MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os equipamentos utilizados pertencem ao laboratório e à Universidade.

3.1 Amostras de *Salmonella*

Analisaram-se 84 amostras de *Salmonella* Enteritidis. O ano de isolamento e a origem de cada amostra variaram conforme descrito no APÊNDICE A. As amostras 1 a 83 foram isoladas por outros pesquisadores e gentilmente cedidas para este experimento, enquanto que a amostra 84 foi isolada em um dos experimentos do CDPA. As amostras estavam armazenadas em ágar Estoque (composição: ágar nutriente, cloreto de sódio, fosfato dissódico, extrato de carne e extrato de levedura) a uma temperatura máxima de 6°C.

As 84 amostras de *S. Enteritidis* armazenadas foram reativadas, a fim de verificar se todas estavam puras. Primeiramente, utilizou-se um meio não seletivo de enriquecimento, caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI - Oxoid®). As amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, separou-se uma alíquota de 1,5mL deste BHI em tubos *eppendorfs*, que foram congelados para posterior extração de DNA. Inoculou-se 0,1mL de caldo BHI no caldo seletivo Rappaport-Vassiliadis (RV - Difco®), que foi incubado em banho-maria a 42°C por 24 horas. As amostras foram semeadas, a partir do caldo RV, em Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD - Oxoid®) e incubadas a 37°C. Depois de 24 horas observou-se o padrão de colônias para avaliar se eram compatíveis com *Salmonella* spp. As alíquotas congeladas foram utilizadas para a extração do DNA. A extração foi feita por tratamento térmico, conforme técnica descrita por Borsoi *et al.* (2009). O DNA extraído foi armazenado a -20°C até sua utilização.

3.2 Pesquisa dos genes

Foram pesquisados, através da técnica de PCR, nove genes relacionados à virulência: *invA*, *hilA*, *avrA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*, *sopE*, *spvC*, *sivH*. A pesquisa destes genes foi

feita em todas as amostras de *S. Enteritidis*. A sigla do gene, o significado desta e a função de cada gene estão descritos no APÊNDICE B.

Para a realização das reações de amplificação, foi preparado um *mix* de reagentes, composto de água ultra-pura, solução tampão, dNTPs, um par de *primers* específicos para cada gene alvo (Tabela 2) e *Taq DNA polimerase*. Ao *mix* foi adicionado o DNA extraído de cada amostra. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Esco – Swift MaxPro®). Os protocolos para preparo dos reagentes e para amplificação dos fragmentos foram adaptados a partir de estudos anteriores (Tabela 2) e estão descritos no APÊNDICE C.

Tabela 2 – Genes alvo, *primers* utilizados, números de pares de bases dos *amplicons* (pb) e trabalhos de referência utilizados para os protocolos de amplificação.

Gene alvo	<i>Primers</i>	pb	Referências
<i>lpfA</i>	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTTAACAGAAACCAGT	250	Heuzenroeder <i>et al.</i> (2000)
<i>agfA</i>	GGCGGAAGCTTGAATTCGTACTGTACTCCAGTCAAGTGGGG GGGAAAGGTTGAATTCAGGACGCTACTTGTG	350	Doran <i>et al.</i> (1993)
<i>sefA</i>	GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	488	Oliveira <i>et al.</i> (2002)
<i>invA</i>	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	Oliveira <i>et al.</i> (2002)
<i>hila</i>	CTGCCGAGTGTTAAGGATA CTGTCGCCTTAATCGCATGT	497	Guo <i>et al.</i> (2000)
<i>avrA</i>	GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCCGCCGCC	385	Prager <i>et al.</i> (2003)
<i>sopE</i>	ACACACTTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	398	Prager <i>et al.</i> (2003)
<i>sivH</i>	CAGAAATGCGAATCCTTCGCAC GTATGCGAACAAGCGTAACAC	763	Kingsley <i>et al.</i> (2003)
<i>spvC</i>	CGGAAATACCATCTACAAATA CCCAAACCCATACTTACTCTG	669	Castilla <i>et al.</i> (2006)

Utilizaram-se três tipos de controles das análises: controle da reação, controle positivo e controle negativo. O controle da reação de amplificação consistiu em uma amostra contendo os reagentes da reação, porém sem adição de DNA extraído. Este controle foi utilizado para detectar uma possível ocorrência de amplificação de material genético inespecífico. Os controles positivos e negativos usados para cada um dos genes estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Controles positivos e negativos das reações de PCR.

Gene	Controle positivo	Controle negativo
<i>lpfA</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>agfA</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>sefA</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>invA</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>hila</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>avrA</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>sopE</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>sivH</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>spvC</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922

Optou-se pela utilização de uma cepa de *Escherichia coli* como controle negativo, visto que esta pertence à família das enterobactérias, assim como *Salmonella* spp. Utilizou-se *Salmonella* Enteritidis como controle positivo das reações, exceto para a pesquisa do gene *agfA*, o qual foi utilizada uma cepa de *Salmonella* Typhimurium, pois o padrão de bandas para esta cepa ficou mais evidente, quando comparado aquele obtido com *Salmonella* Enteritidis.

Os produtos da amplificação foram analisados através da eletroforese em gel, utilizando-se gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo. Após, realizou-se a leitura do gel em transiluminador de luz ultravioleta.

4. RESULTADOS

As amostras analisadas apresentaram diferentes frequências para os genes pesquisados, conforme descrito na Tabela 4. Todas as amostras analisadas apresentaram, pelo menos, cinco genes associados à virulência.

Tabela 4 – Resultado da pesquisa de genes associados à virulência nas 84 amostras de *Salmonella* Enteritidis analisadas.

Gene	Amostras Positivas		Amostras Negativas	
	Total (n=84)	Total (%)	Total (n=84)	Total (%)
<i>lpfA</i>	83	99	1	1
<i>agfA</i>	81	96	3	4
<i>sefA</i>	84	100	0	0
<i>invA</i>	84	100	0	0
<i>hilA</i>	84	100	0	0
<i>avrA</i>	84	100	0	0
<i>sopE</i>	83	99	1	1
<i>sivH</i>	84	100	0	0
<i>spvC</i>	77	92	7	8

Com base na presença dos genes nas diferentes amostras de *Salmonella* Enteritidis, as amostras foram agrupadas em quatro perfis genéticos. Os diferentes perfis e o número de amostra por perfil estão descritos na Tabela 5:

Tabela 5 – Perfis genéticos das 84 amostras de *Salmonella* Enteritidis analisadas.

Perfil genético	Número de amostras	Genes								
		<i>lpfA</i>	<i>agfA</i>	<i>sefA</i>	<i>invA</i>	<i>hilA</i>	<i>avrA</i>	<i>sopE</i>	<i>sivH</i>	<i>spvC</i>
P1	74	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P2	06	+	+	+	+	+	+	+	+	-
P3	03	+	-	+	+	+	+	+	+	+
P4	01	-	+	+	+	+	+	-	+	-

As figuras 1 e 2 mostram eletroforese em gel de agarose, com produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados neste experimento. Para estas fotos, utilizaram-se os controles positivos anteriormente descritos.

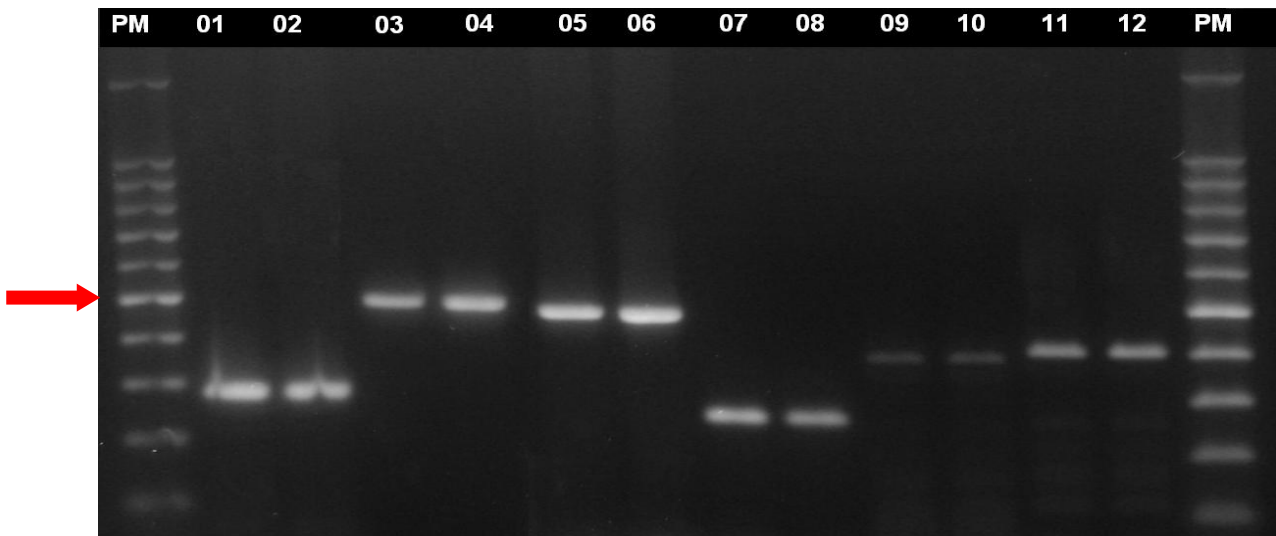


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (*invA*, *hilA*, *sefA*, *lpfA*, *avrA* e *sopE*). Legenda: PM= marcador de peso molecular (100pb); 01 e 02 = *invA* (284pb); 03 e 04 = *hilA* (497pb); 05 e 06 = *sefA* (488pb); 7 e 8 = *lpfA* (250pb); 09 e 10 = *avrA* (385pb); 11 e 12 = *sopE* (398pb). A seta indica fragmento de 500pb.

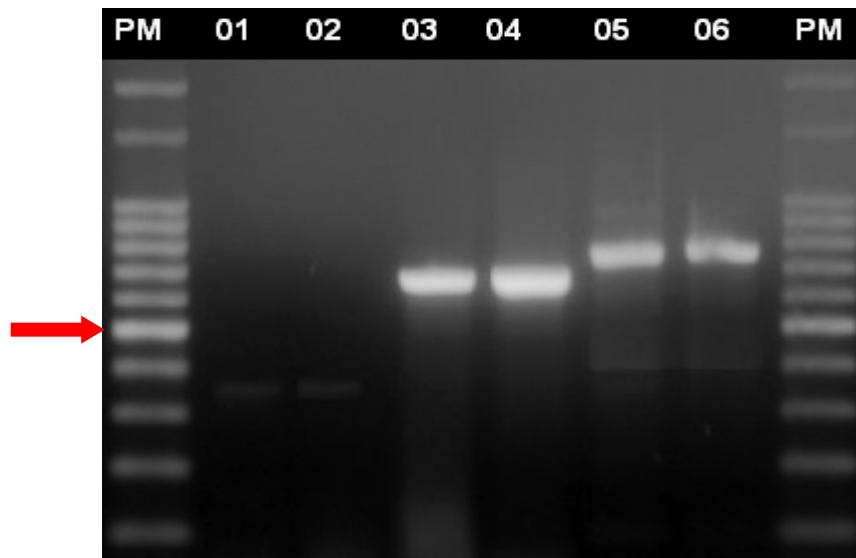


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (*agfA*, *spvC* e *sivH*). Legenda: PM= marcador de peso molecular (100pb); 01 e 02 = *agfA* (350pb); 03 e 04 = *spvC* (669pb); 05 e 06 = *sivH* (763pb). A seta indica fragmento de 500pb.

5. DISCUSSÃO

Para muitos patógenos, a virulência é conferida através de uma única região do cromossomo, mas na *Salmonella* spp. ela depende de um grande número de genes distribuídos ao longo do seu cromossomo e em elementos móveis (GROISMAN; OCHMAN, 1997). Com o desenvolvimento da biologia molecular, se tornou possível a identificação de alguns destes fatores responsáveis pela virulência (WASSENAAR; GAASTRA, 2001). O cromossomo bacteriano possui uma combinação de informações genéticas e está em constante modificação, uma vez que plasmídeos e outros elementos móveis que contenham DNA podem ser trocados, inseridos e/ou excluídos mesmo entre espécies diferentes (PORWOLLIK; McCLELLAND, 2003).

Em relação à pesquisa de genes de virulência em amostras de *Salmonella* Enteritidis, observou-se um padrão semelhante entre as amostras para os genes pesquisados, apesar das variações nas frequências encontradas entre os genes.

Todas as amostras de *Salmonella* Enteritidis analisadas (84/84) foram positivas para o gene *invA*, estando de acordo com outros estudos (SWAMY *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; SALEHI *et al.*, 2005; NASHWA *et al.*, 2009; AMINI *et al.*, 2010). Por outro lado, os estudos realizados por Bacci *et al.* (2006) e Okamoto *et al.* (2009) não demonstraram 100% de frequência deste gene nas amostras de *S. Enteritidis* analisadas. Devido ao grande número de estudos realizados com este gene, e à frequência de 100% encontrada na maioria deles, considera-se que o *invA* é conservado entre as espécies e os sorovares, sendo considerado gene alvo para detecção de *Salmonella* spp. (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Como o sorovar *S. Enteritidis* é o mais frequentemente isolado e a via fecal-oral a rota mais comum de infecção, esperava-se que todas as amostras analisadas apresentassem o gene *invA*, o qual é necessário para a invasão das células epiteliais (NASHWA *et al.*, 2009). Os resultados encontrados neste experimento estão, portanto, de acordo com o esperado. Em relação à origem da amostra, alguns estudos encontraram variações na invasibilidade das cepas, quando consideradas fontes avícolas e não avícolas, mas não encontraram variações quando consideradas apenas as fontes avícolas (SWAMY *et al.*, 1996). Alguns autores consideram que a ausência do gene *invA* em cepas de *Salmonella* de diferentes sorovares poderia causar uma redução considerável

na virulência da amostra, pois este gene é essencial para a virulência completa da bactéria, já que desencadeia a invasão dos tecidos (BACCI *et al.*, 2006; AMINI *et al.*, 2010).

Todas as amostras de *S. Enteritidis* analisadas (84/84) neste estudo foram positivas para a presença do gene *hilA*, resultado que está de acordo com outros trabalhos (PATHMANATHAN *et al.*, 2003; TRAFNY *et al.*, 2006; CRACIUNAS *et al.*, 2010). Este gene é normalmente encontrado em todos os sorovares de *Salmonella*, não sendo detectado em outras bactérias. Por isto, da mesma forma que o *invA*, é considerado gene alvo para a detecção de *Salmonella* spp. (CRACIUNAS *et al.*, 2010). No processo de infecção por *Salmonella*, diversos genes de invasão são necessários para a entrada da bactéria nas células do hospedeiro, e muitos deles encontram-se na SPI-I. A expressão destes genes é ativada e regulada pelo gene *hilA*, também localizado nesta ilha (MURRAY; LEE, 2000). Desta forma, considera-se que este gene esteja presente em todas as cepas de *Salmonella*, independentemente do sorovar (PATHMANATHAN *et al.*, 2003; TRAFNY *et al.*, 2006). Um trabalho publicado em 2000 utilizou a expressão do gene *hilA* para avaliar os efeitos da variação de pH, do lactato e das fontes de carboidrato e aminoácidos na expressão dos genes de virulência de *S. Enteritidis*. Observou-se que conforme as condições do meio havia uma maior ou menor expressão deste gene, indicando que em condições favoráveis de crescimento a bactéria diminui sua virulência pela menor expressão de seus genes (DURANT *et al.*, 2000).

Entre as 84 amostras de *S. Enteritidis* analisadas, 99% (83/84) delas apresentaram o gene *sopE*, sendo a amostra negativa isolada de órgão de ave. No estudo de Hardt *et al.* (1998), detectou-se *sopE* apenas em alguns dos sorovares analisados: *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Dublin* e *S. Pullorum*. Hopkins e Threlfall (2004) não identificaram o gene nos sorovares *S. Agona*, *S. Braenderup* e *S. Stanley*, mas identificaram uma frequência variável dele nos sorovares *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Infantis* e *S. Newport*. Segundo os mesmos autores, todas as amostras de *S. Enteritidis* apresentaram o gene *sopE*. Já Rahman *et al.* (2004) testaram 50 amostras de *Salmonella* isoladas de humanos, aves e suínos, pertencentes a 11 diferentes sorovares. Apenas 28% (14/50) das amostras foram positivas para o gene *sopE*, pertencendo aos sorovares *S. Gallinarum* (sete amostras de aves), *S. Virchow* (uma amostra de suíno) e *S. Enteritidis* (duas amostras de humanos, duas de aves e uma de suíno). No trabalho deste autor todas as amostras que

apresentaram o gene também o expressaram. A prevalência deste gene nos diferentes sorovares de *Salmonella* é variável, mas por ser frequente no sorovar *S. Enteritidis* (HOPKINS; THRELFALL, 2004), esperava-se 100% de frequência. Segundo Hopkins e Threlfall (2004), uma das razões para a variação na frequência deste gene, é que o mesmo se encontra em uma região onde a recombinação ocorre frequentemente.

Todas as amostras de *S. Enteritidis* analisadas (84/84) neste estudo foram positivas para a presença do gene *avrA*. Streckel *et al.* (2004) identificaram 80% de frequência do gene *avrA*, sendo encontrado principalmente em sorovares considerados mais virulentos, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, mas não em outros. Apesar de alguns trabalhos também descreverem que este gene está presente em um grande número de cepas de diferentes sorovares de *Salmonella*, apenas algumas destas expressam a proteína efetora AvrA associada à patogenicidade (PRAGER *et al.*, 2000; STRECKEL *et al.*, 2004). Em algumas cepas, a expressão de AvrA parece estar relacionada com a condição de baixo pH do meio (BEM-BARAK *et al.*, 2006). Esta característica é bastante importante, pois, devido a sua capacidade de adaptação a este tipo de meio, os alimentos ácidos podem ser contaminados por *Salmonella* spp. (LEYER; JOHNSON, 1992).

A pesquisa de genes de proteínas associadas à virulência (proteínas efetoras) é muito importante, visto que alterações no repertório destas proteínas podem significar mudanças na capacidade dos diferentes sorovares de *Salmonella* em se adaptar a novos hospedeiros, permitindo que se tornem sorovares emergentes (PRAGER *et al.*, 2000). Essas combinações de proteínas efetoras podem variar dentro de um mesmo sorovar, no qual as cepas são supostamente mais semelhantes (MIROLD *et al.*, 2001). No trabalho de Prager *et al.* (2000), poucos sorovares apresentaram os genes *sopE* e *avrA*. Outro trabalho analisando cepas de *S. Hadar*, observou que apenas 17,1% das amostras apresentavam o gene *avrA* e 9,7% o gene *sopE* (CESCO, 2010).

Todas as amostras de *S. Enteritidis* analisadas (84/84) neste estudo foram positivas para a presença do gene *sivH*. Existem poucos estudos sobre a frequência deste gene na população de *Salmonella*, mas um trabalho de Kingsley *et al.* (2003) detectou o gene em todos os sorovares de *S. enterica* subespécie *enterica*, em alguns sorovares de *S. enterica* subespécie *salamae* e em algumas cepas de *S. bongori*.

O sorovar *S. Enteritidis* é considerado modelo para estudo das fimbrias como um fator de virulência em *Salmonella* spp. O estudo das fimbrias é muito importante, visto que elas são responsáveis pela ligação entre a bactéria e as células do hospedeiro, mediando a colonização bacteriana e a distribuição de toxinas (CRACIUNAS *et al.*, 2010). O genoma de *S. Enteritidis* contém diversos *operons* fimbriais, como *agf, bcf, fim, lpf, pef, saf, sef, stb, std, ste, stf, stg, sth* e *sti* (PORWOLLIK; McCLELLAND, 2003), mas a expressão das proteínas fimbriais tem sido demonstrada por poucos destes *operons* (CRACIUNAS *et al.*, 2010).

Todas as amostras de *S. Enteritidis* analisadas (84/84) neste estudo foram positivas para a presença do gene *sefA*. Esperava-se uma frequência de 100%, visto que este gene é considerado alvo para determinação do sorovar *S. Enteritidis* (EDWARDS *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002; PAN; LIU, 2002; PORWOLLIK; McCLELLAND, 2003; AMINI *et al.*, 2010), o resultado encontrado está, portanto, de acordo com o esperado. Segundo Edwards *et al.* (2000), a expressão de SEF14 em todas as cepas de *S. Enteritidis* confirma a frequência esperada de 100% para o gene *sefA*. O trabalho de Pan e Liu (2002) e o de Craciunas *et al.* (2010) relatam que este gene não foi identificado em outros sorovares de *Salmonella*, mas outro trabalho de 1993 já havia observado a presença de *sefA* em outros sorovares do grupo D₁: *S. Blegdam*, *S. Dublin*, *S. Moscow*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Rostock*, *S. Seremban* e *S. Typhi*. Entretanto, os autores descreveram que este gene só foi expresso pelos quatro primeiros (TURCOTTE; WOODWARD, 1993). Em 1996, a fimbria SEF14 foi identificada em apenas cinco dos 42 sorovares analisados: *S. Enteritidis*, *S. Berta*, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* e em outro sorovar do grupo D₁, sendo a sequência do gene altamente conservada entre estes sorovares (DORAN *et al.*, 1996). Este gene foi identificado em todas as cepas de *S. Enteritidis* isoladas de aves, suínos, humanos e bovinos, mas em nenhum outro sorovar no trabalho de Murugkar *et al.* (2003).

Das 84 amostras de *S. Enteritidis* analisadas, 99% (83/84) delas apresentaram o gene *lpfA*, sendo a amostra negativa isolada de órgão de aves. Este gene foi detectado em *S. Typhimurium* e em alguns sorovares do grupo D₁, incluindo *S. Enteritidis* e *S. Dublin* (BÄUMLER; HEFFRON, 1995).

Das 84 amostras de *S. Enteritidis* analisadas, 96% (81/84) delas apresentaram o gene *agfA*. Das amostras negativas, duas foram isoladas a partir de carcaça e uma a partir

de suabe de arrasto. O trabalho de Craciunas *et al.* (2010) relata que o gene *agfA* não foi identificado em outros sorovares de *Salmonella*, além do *S. Enteritidis*. Doran *et al.* (1993) analisou 604 cepas de *Salmonella*, pertencentes a 95 sorovares, e 603 delas apresentaram o gene *agfA*, indicando que ele é altamente conservado entre os sorovares. Segundo este autor, a amostra negativa pode ter perdido o gene ao longo do tempo (DORAN *et al.*, 1993).

Alguns estudos relacionam a presença dos diferentes genes fimbriais com a virulência das cepas de *S. Enteritidis*. Das 84 amostras analisadas, 95% (80/84) delas apresentaram os genes *sefA*, *lpfA* e *agfA*, e 100% (84/84) apresentaram no mínimo dois dos genes fimbriais. Um estudo filogenético desenvolvido por Bäumlér *et al.* (1997) demonstra a relação entre os genes fimbriais de *Salmonella*. O operon *sef* possui uma distribuição filogenética limitada, indicando que foi adquirido recentemente através de duas linhagens distantes na linha de evolução de *S. enterica* subespécie *enterica*. O operon *lpf* teria sido adquirido durante a formação do gênero *Salmonella*. Já o operon *agf* parece ser o mais antigo deles, estando presente no ancestral comum de *Salmonella* e *Escherichia coli*. Apesar de os três operons estarem presente neste gênero, há uma diferente distribuição entre os sorovares. Uma das razões para esta variação seria a transferência horizontal e a deleção de genes, que teriam criado combinações únicas de operons fimbriais nos diferentes sorovares. Não se sabe, porém, qual a forma de seleção dos sorovares que sofreriam esta perda (BÄUMLER *et al.*, 1997). Para alguns autores, SEF14 parece não estar diretamente relacionada com a interação bactéria-hospedeiro e com a invasão celular, ao contrário de SEF17 e SEF21, que demonstraram ter papel fundamental nestes processos (DIBB-FULLER *et al.*, 1999). Um trabalho de 1996 demonstra esta relação, na qual as cepas contendo SEF14 e SEF21 apresentaram uma maior colonização do ceco do que aquelas cepas que não apresentavam nenhuma destas fímbricas. Por outro lado, não houve diferença no reisolamento da bactéria a partir do fígado, órgãos reprodutivos, baço e ovos (THIAGARAJAN *et al.*, 1996). O resultado de um estudo de 2000 refere SEF14 como essencial para a adequada interação entre a bactéria e os macrófagos da célula hospedeira, após a penetração e colonização intestinal. SEF14 foi a primeira fimbria descrita que possui importância na interação com os macrófagos, enquanto que as outras fímbricas descritas estão envolvidas na ligação com superfícies epiteliais (EDWARDS *et al.*, 2000). Estudos

sugerem que esta fimbria seja essencial para a aderência da *S. Enteritidis* no tecido reprodutivo de galinhas (THIAGARAJAN *et al.*, 1996), mas aparentemente não tem relação direta com a infecção sistêmica (OGUNNIYI *et al.*, 1997). Contrariando os trabalhos que observam diferenças entre as fimbrias, Rajashekara *et al.* (2000) não observaram diferença entre SEF14, SEF17 e SEF21 na invasão de enterócitos, na fagocitose da bactéria pelos macrófagos, na habilidade de colonização do ceco e na eliminação bacteriana nas fezes. Os mesmos autores encontraram diferenças no isolamento bacteriano a partir do fígado e baço. Independente da importância de cada fimbria, acredita-se que a aquisição e perda de *operons* fimbriais específicos deve ser um dos mecanismos pelos quais os diferentes sorovares de *Salmonella* conseguiram se adaptar a um número cada vez maior de hospedeiros (BÄUMLER *et al.*, 1997).

Entre as 84 amostras de *Salmonella* Enteritidis analisadas, 77 delas (92%) foram positivas para o gene *spvC*, sendo que, das amostras negativas deste experimento, duas foram isoladas de carcaças, duas de suabes de arrasto e três de órgãos de aves. Os resultados obtidos foram similares aos 90,2% encontrados por Oliveira *et al.* (2003), aos 92,8% encontrados por Castilla *et al.* (2006) e aos 88,6% descritos por Amini *et al.* (2010). Okamoto *et al.* (2009) encontraram uma frequência de 74% para este gene. Já Swamy *et al.* (1996) encontraram 15,1% de positividade, quando consideradas cepas isoladas de fontes avícolas e não avícolas, e 21,78% quando consideradas apenas as fontes avícolas. Bacci *et al.* (2006) encontraram apenas uma amostra de *S. Enteritidis* positiva das 15 analisadas. Em outro estudo observou-se diferença na frequência do gene *spvC*, quando comparado a outras fontes. Amostras de *S. Enteritidis* isoladas de humanos apresentaram 100% de positividade para este gene, e aquelas cepas isoladas de bovinos, apresentaram uma frequência de 90% (AMINI *et al.*, 2010). Ling (2009) pesquisou este gene em cepas pertencentes a 58 sorovares de *Salmonella*, sendo que apenas 15% das cepas apresentavam *spvC*. Porém, ao se analisar a frequência deste gene em cada sorovar, observou-se que 92% das cepas de *S. Enteritidis* apresentaram o gene, enquanto que apenas 22% das cepas de *S. Typhimurium* foram positivas. O gene *spvC* não foi encontrado em nenhum outro sorovar (LING, 2009). Craciunas *et al.* (2010) detectaram o gene *spvC* apenas no sorovar *S. Enteritidis*, não estando este presente nos sorovares *S. Typhimurium*, *S. Cholerasuis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum* e *S. Infantis*. Outro trabalho publicado em 1998 relatou que dos 37

sorovares estudados, apenas sete apresentaram plasmídeos de virulência. Desta forma, a similaridade antigênica entre as cepas de um mesmo sorovar não significa que possuam, também, semelhanças filogenéticas. Os autores também observaram que a distribuição filogenética e as poucas variações observadas nos genes *spvC* e *spvA* sugerem que esta região é relativamente nova em termos de evolução e teria sido adquirida via transmissão horizontal mais recentemente do que a maioria dos genes de virulência conhecidos (BOYED; HARTL, 1998). Oliveira *et al.* (2003) descrevem o gene *spvR* como essencial para conferir virulência e *spvC* como um gene acessório, mas necessário para a virulência completa da cepa. Este fato também pode ser embasado por um trabalho realizado por Bacci *et al.* (2006), na qual 60% das amostras de *S. Enteritidis* estudadas apresentaram o gene *spvR*, enquanto que apenas 6,66% apresentaram o gene *spvC*. O estudo deste gene, e dos demais genes do *operon spvRABCD*, é cada vez mais importante, visto que este *operon* é responsável pela infecção sistêmica e multirresistência a antimicrobianos em animais e humanos (BOYED; HARTL, 1998; ROTGER; CASADESUS, 1999; GEBREYES *et al.*, 2009). Além disto, o *operon* tem sido relacionado com a indução da proliferação bacteriana intracelular e com a indução da apoptose de macrófagos infectados (KURITA *et al.*, 2003).

Estudos com *S. Enteritidis* relacionam a presença do gene *invA* com o gene *spvC*. Enquanto o primeiro gene, de origem cromossomal, é responsável pela invasão bacteriana nas células do hospedeiro, o segundo, de origem plasmidial, é necessário para a ocorrência da infecção sistêmica e para a sobrevivência da bactéria em ambientes com características desfavoráveis (GUILLOTEAU *et al.*, 1996). Conforme uma pesquisa realizada em 2009, observou-se que apenas as amostras que continham os genes *invA* e *spvC*, simultaneamente, conseguiram crescer em condições adversas de pH, temperatura e baixas concentrações de nutrientes (OKAMOTO *et al.*, 2009). Desta forma, espera-se que os sorovares que tendem a ser mais virulentos, como *S. Enteritidis*, apresentem uma maior correlação entre estes dois genes, visto que possuem um alto grau de invasibilidade, uma maior capacidade de causar infecções sistêmicas e, possivelmente, uma maior resistência em ambientes adversos. No presente estudo, observou-se que 92% das amostras (77/84) foram positivas para os genes *invA* e *spvC* simultaneamente. Estes resultados se assemelham a outro trabalho realizado em 2010, na qual 88,6% das amostras isoladas de produtos de origens avícolas apresentaram os dois genes. Neste mesmo trabalho, os autores observaram que 90% e

100% das amostras originadas de bovinos e humanos, respectivamente, foram positivas para *invA* e também para *spvC* (AMINI *et al.*, 2010). Um estudo realizado em 1996 analisou 38 cepas de *Salmonella* isoladas de pacientes humanos, pertencentes a 23 sorovares diferentes, e observou que apenas 55,3% das cepas apresentaram ambos os genes. Todos os 38 pacientes apresentaram enterite, sendo que três destes também apresentaram bacteremia. Destas três cepas isoladas, duas apresentaram os genes *invA* e *spvC* concomitantemente (CHIU; OU, 1996). Em contraste, o trabalho de Heintzoff *et al.* (2008) não encontrou plasmídeos de virulência em cepas de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e animais com bacteremia causada por *Salmonella* spp.

Aproximadamente 88% das amostras (74/84) apresentaram todos os genes pesquisados. Este dado demonstra que existem muitas similaridades entre as cepas de *S. Enteritidis*, mas que também existem diferenças importantes. Outros estudos envolvendo a pesquisa de genes relacionados à virulência em cepas de *S. Enteritidis* revelaram dados semelhantes. Castilla *et al.* (2006) encontraram 91,8% de positividade para os genes pesquisados (*invA*, *pefA*, *sefC* e *spvC*). Apesar dos genes estudados serem diferentes, já se observava uma tendência de que as diferentes cepas de *S. Enteritidis* possuísem a maioria dos genes de virulência. Devido às características genotípicas e fenotípicas que vem sendo analisadas recentemente, os sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são considerados os mais virulentos de *Salmonella* (BACCI *et al.*, 2006). Apenas a alta frequência dos genes encontrada não poderia indicar que se trate de cepas muito virulentas, pois mesmo com os genes presentes, a bactéria pode não expressá-los (OKAMOTO *et al.*, 2009). Este fato pode ser comprovado pelo trabalho de Turcotte e Woodward (1993), na qual nove sorovares apresentaram um gene, mas somente quatro o expressaram. Considera-se que a origem da amostra também é importante para o estabelecimento da virulência da cepa. Um trabalho realizado em 2008 comparou amostras clínicas de *S. Typhimurium* isoladas de humanos e animais, e observou diferenças na virulência das cepas. Enquanto todas aquelas isoladas de animais foram virulentas em ratos, apenas 61% das isoladas de humanos foram virulentas nos roedores (HEITHOFF *et al.*, 2008). A expressão dos fatores de virulência pode ser regulada por sinais ambientais, como temperatura, pH, osmolaridade e anaerobiose (MILLER *et al.*, 1989).

Neste experimento, foram obtidos quatro diferentes perfis genéticos, sendo P1 (todos os genes positivos) o mais comum, seguido de P2 (negativo apenas para *spvC*), P3 (negativo apenas para *agfA*) e P4 (negativo para *lpfA*, *sopE* e *spvC*). Como o sorovar *S. Enteritidis* é o mais frequentemente isolado em casos clínicos (FIGUEIREDO, 2008), em aves vivas e em carcaças (BRASIL, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 1996), e é relatado como o mais virulento (BACCI *et al.*, 2006), esperava-se que a maioria das amostras apresentasse uma alta frequência dos genes. É importante observar que a distribuição das amostras em perfis genéticos, com base apenas na presença ou ausência dos genes, realiza apenas uma análise qualitativa. Ou seja, estes perfis procuram estabelecer uma relação linear entre as amostras, mas esta relação pode não ser verdadeira, uma vez que não está sendo observada a expressão dos genes e a interação entre eles. A análise quantitativa da expressão destes genes é importante, já que é ela que define o fenótipo de maior ou menor virulência da amostra.

O estudo da virulência de *Salmonella* spp. é bastante amplo e envolve várias etapas. Desta forma ainda há um longo caminho a ser seguido no futuro. Atualmente, o desafio é descobrir como e quais são as aquisições genéticas que conferem os mais importantes traços de virulência, interferindo na patologia e na especificidade do hospedeiro. Além dos genes pesquisados neste trabalho, ainda é preciso pesquisar outros genes de virulência, como aqueles relacionados à resistência antimicrobiana e à biossíntese de nutrientes e do LPS. Além destes, também podem ser pesquisados outros genes associados à sobrevivência no interior de macrófagos, ao reconhecimento e invasão da célula hospedeira e aos plasmídeos de virulência. O estudo dos genes e de sua importância para a bactéria e a pesquisa de sua frequência em determinadas cepas forma a base para futuros trabalhos relacionando o perfil genético com o perfil fenotípico (resistência a antimicrobianos, perfil bioquímico, entre outros) para a realização de experimentos *in vivo*.

Desta forma, este e outros trabalhos baseados na pesquisa de genes associados à virulência nos diferentes sorovares de *Salmonella*, podem ser utilizados como base para novas pesquisas. Como estudos futuros, sugerem-se:

- Esclarecer funções dos genes associados à virulência e sua importância na virulência de cepas de *Salmonella* Enteritidis.

- Reavaliação da atual classificação das cepas deste gênero em sorovares, uma vez que esta é feita com base em antígenos da superfície e de flagelos bacterianos. Estudos recentes já demonstram haver diferenciação genética das cepas de um mesmo sorovar, o que poderia significar o estabelecimento de uma nova classificação do gênero *Salmonella*, assim como já é feito com *E. coli*, cuja importância é definida pela classificação de patogenicidade, que se baseia no perfil bioquímico, genético e de resistência a antimicrobianos.
- Estudos relacionando genes associados à virulência em *Salmonella* spp. e em *Escherichia coli*. O CDPA já tem desenvolvido trabalhos semelhantes em *Escherichia coli*, relacionando a presença de genes de virulência com a patogenicidade da cepa. Uma vez que estas bactérias derivam de linhas ancestrais próximas (RYCHLIK *et al.*, 2009), é interessante estabelecer uma relação entre os estudos com *Salmonella* e *E. coli*. Alguns estudos apontam que tenha ocorrido transferência de genes entre esses gêneros (RYCHLIK *et al.*, 2009), enquanto outros indicam que estas bactérias partilham de alguns genes de virulência em comum (GROISMAN; OCHMAN, 1997).
- Estabelecer critérios para definição da virulência das cepas. Desta forma, é possível ter-se uma maior segurança para estabelecer planos de controle de risco de contaminação e para monitorar lotes avícolas.

6. CONCLUSÕES

1. Apesar de todas as amostras pertencerem a um mesmo sorovar (*S. Enteritidis*), observou-se variação na frequência dos genes pesquisados.
2. A variação na frequência de alguns genes não era esperada. A análise filogenética destas amostras, através de técnicas como PFGE, pode demonstrar a ocorrência de mutações genéticas.
3. Foram observados quatro perfis genéticos diferentes: P1 (todos os genes presentes), P2 (ausência apenas de *spvC*), P3 (ausência apenas de *agfA*) e P4 (ausência de *lpfA*, *spvC* e *sopE*). O perfil genético mais frequente foi P1, indicando que, provavelmente, a presença de todos estes genes é uma das causas para a maior virulência de *Salmonella* Enteritidis.
4. Os perfis gerados fornecem a base para uma futura escolha das cepas que serão analisadas através da técnica de PFGE e em estudos *in vivo*. Os diferentes perfis genéticos podem sugerir deleções ou aquisições de genes, determinando diferentes clones, que podem contribuir para a seleção das cepas para uma futura inoculação *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMINI, K.; SALEHI, T.Z.; NIKBAHKHT, G.; RANJBAR, R.; AMINI, J.; ASHRAFGANJOOEI, S.B. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, n.21, 2010. p.2202-2210
- ARVANITIDOU, M.; TSAKRIS, A.; SOFIANOU, D.; KATSOUYANNOPOULOS, V. Antimicrobial resistance and R-factor transfer of salmonellae isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, n.3, 1998. p.197-201
- AUSTIN, J.W.; SANDERS, G.; KAY, W.W.; COLLINSON, K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v.162, 1998. p.295-301
- BACCI, C.; PARIS, A.; SALSÌ, A.; BRINDANI, F. Genotypic and phenotypic virulence features in *Salmonella enterica* strains isolated from meat. **Annali Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma**, v.26, 2006. p.165-174
- BARROW, P.A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**, 4.ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p.231-266
- BARTH, S.; BAUERFEIND, R. Virulence plasmids of *Salmonella enterica*: incidence and properties. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.118, 2005. p.8-23
- BAÚ, A.C.; CARVALHAU, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frango e ovos de galinha comercializado em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.2, 2001. p.303-307

BÄUMLER, A.J.; GILDE, A.J.; TSOLIS, R.M.; VAN DER VELDEN, W.M. AHMER, B.M.M.; HEFFRON, F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operon during evolution of *Salmonella* serotypes. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.2, 1997. p.317-322

BÄUMLER, A.J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of *lpf*ABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.8, 1995. p.2087-2097

BÄUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity**, v.64, n.5, 1996a. p.1862-1865

BÄUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The USA**, v.93, 1996b. p.279-283

BEN-BARAK, Z.; STRECKEL, W.; YARONA, S.; COHENC.; PRAGER, R.; TSCHAP, H. The expression of the virulence-associated effector protein gene *avrA* is dependent on a *Salmonella enterica*-specific regulatory function. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, 2006. p.25-38

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Ed.). **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009. p.435-454

BERNARDO, F.M.A.; MACHADO, J.C.C. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.84, n.489, 1989. p.31-45

BETANCOR, L.; SCHELOTTO, F.; MARTINEZ, A.; PEREIRA, M.; ALGORTA, G.; RODRÍGUEZ, A.; VIGNOLI, R.; CHABALGOITY, J.A. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, 2004. p.1155-1162

BISHOP, A.L.; DOUGAN, G.; BAKER, S. The *Salmonella* genome: a global review. In: MASTROENI, P.; MASKELL, D. (Ed.) **Salmonella infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects**, 1.ed. New York: University Press, 2006. p.117-145

BORGES, K.A.; PINTO, A.T.; SILVA, E.N. Efeito da oscilação de temperatura e umidade do ar no comportamento de *Salmonella* Enteritidis em ovos de galinha contaminados. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, 2009. p.25-30

BORSOI, A.; SANTIN, E.; SANTOS, L.R.; SALLE, C.T.P; MORAES, H.L.S; NASCIMENTO, V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v.88, 2009. p.750-758

BOYD, E.F.; HARTL, D.L. *Salmonella* virulence plasmid: modular acquisition of the *spv* virulence region by an F-Plasmid in *Salmonella enterica* subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates. **Genetics Society of America**, v.149, 1998. p.1183-1190

BRASIL. Instrução Normativa, SDA nº 70, de 06 de outubro de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, 10 out. 2003. Nº 197, seção 1, p. 9.

BRASIL. Portaria Ministerial, SDA nº 193, de 19 de setembro de 1994. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, 22 set. 1994. Nº 182, seção 1, p.14309.

BRASIL. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, Brasília, DF, 2008. 186p.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Georgia, v.38, n.7, 2000. p.2465-2467

CAFFER, M. I.; EIGUER, T. *Salmonella* Enteritidis in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, 1994. p.15-19

CARDINALE, E.; GROS-CLAUDE, J.D.P.; TALL, F.; CISSE, M.; GUËYE, E.F.; SALVAT, G. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. **Revue d'Élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v.56, n.1/2, 2003. p.13-16

CASTILLA, K.S.; FERREIRA, C.S.A.; MORENO, A.M.; NUNES, I.A.; FERREIRA, A.J.F. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* e *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, 2006. p.135-139

CESCO, M.A.O. **Dissertação de Mestrado**: Pesquisa de Fatores Associados à Virulência de *Salmonella* Hadar Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2010.

CHARLTON, B.R.; BERMUDEZ, A.J.; BOULIANNE, M.; HALVORSON, D.A.; SCHRADER, J.S.; NEWMAN, L.J.; SANDER, J.E.; WAKENELL, P.S. Salmonellosis. **Avian Disease Manual**. 6.ed. Georgia: American Association of Avian Pathologists, 2006. p.106-114

CHENG, S.; FOCKLER, C.; BARNES, W.M.; HIGUCHI, R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, 1994. p.5695-5699

CHIU, C.H.; OU, J.T. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.10, 1996. p.2619-2622

CLOUTHIER, S.C.; COLLINSON, S.K.; LIPPERT, D.; AUSIO, J.; WHITE, A.P.; KAY, W.W. Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.9, 1993. p.2523-2533

COLLIER-HYAMES, L.S.; ZENG, H.; SUN, J.; TOMLINSON, A.D.; BAO, Z.Q.; CHEN, H.; MADARA, J.L.; ORTH, K.; CHEN, H.; NEISH, A.S. Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF- κ B pathway. **The Journal of Immunology**, v.169, 2002. p.2846-2850

COLLINSON, K.; DOIG, P.C.; DORAN, J.L.; CLOUTHIER, S.; TRUST, T.J.; KAY, W.W. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.1, 1993. p.12-18

COLLINSON, K.; EMÖDY, L.; MÜLLER, K.H.; TRUST, T.J.; KAY, W.W. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.15, 1991. p.4773-4781

COLLINSON, K.; LIU, S.L.; CLOUTHIER, S.C.; BANSER, P.A.; DORAN, J.L.; SANDERSON, K.E.; KAY, W.W. The location of four fimbrin-encoding genes, *agfA*, *fimA*, *sefA* and *sefD*, on the *Salmonella* Enteritidis and/or *S. Typhimurium* *Xball-BlnI* genomic restriction maps. **Gene**, v.169, 1996. p.75-80

COLLINSON, K.; PARKER, J.M.R.; HODGES, R.S.; KAY, W.W. Structural predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* Thin Aggregative Fimbriae. **Journal of Molecular Biology**, v.290, 1999. p.741-756

COSTA, F.N.; ROSSI JUNIOR, O.D.; NADER FILHO, A.; TAVECHIO, A.T. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças e frangos obtidos na indústria e no comércio em Jaboticabal, Estado de São Paulo, em 1996. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.4, n.3, 1997. p.97-100

CRACIUNAS, C.; KEUL, A.L.; FLONTA, M.; CRISTEA, M. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hila*, *agfA*, *spvC* and *sefC* genes. **Journal of Environmental Management**, v.3, 2010. p.1-4

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.3, 1999. p.405-428

DIBB-FULLER, M.P.; ALLEN-VERCOCE, E.; THORNS, C.J.; WOODWARD, M.J. Fimbriae- and flagella-mediated association with invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v.145, 1999. p.1023-1031

DOMÍNGUEZ, C.; GÓMEZ, I.; ZUMALACÁRREGUI, J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, 2002. p.165-168

DORAN, J.L.; COLLINSON, K.; BURIAN, J.; SARLOS, G. TODD, E.C.D; MUNRO, C.K.; KAY, C.M.; BANSER, P.A.; PETERKIN, P.I.; KAY, W.W.. DNA-based diagnostic test for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.9, 1993. p.2263-2273

DORAN, J.L.; COLLINSON, K.; CLOUTHIER, S.C.; CEBULA, T.A.; KOCH, W.H.; BURIAN, J.; BANSER, P.A.; TODD, E.C.D.; KAY, W.W. Diagnostic potential of *sefA* DNA probes to *Salmonella* Enteritidis and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. **Molecular and Cellular Probes**, v.10, 1996. p.233-246

DURANT, J.A.; CORRIER, D.E.; STANKER, L.H.; RICKE, S.C. Expression of the *hila* *Salmonella typhimurium* gene in a poultry *Salm. enteritidis* isolate in response to lactate and nutrients. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, 2000. p.63-69

EBEL, E.; SCHLOESSER, W. Estimating the annual fraction of eggs contaminated with *Salmonella* Enteritidis in the United States. **International Journal Food Microbiology**, v.61, 2000. p.51-62

ECHEITA, M. A.; HERRERA, S.; GARAIZAR, J.; USERA, M.A. Multiplex- PCR based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. **Research in Microbiology**, v.153, 2002. p.107-113

EDWARDS, R.A.; SCHIFFERLI, D.M.; MALOY, S.R. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The USA**, v.97, n.3, 2000. p.1258-1262

FANTASIA, M.; FILETICI, E. *Salmonella* Enteritidis in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, 1994. p. 7-13

FANTASIA, M.; FILETICI, E.; ANASTACIO, M.P.; MARCOZZI, M.D.; GRAMENZI, M.P.; AURELI, P. Italian experience in *Salmonella* Enteritidis 1978-1988: characterization of isolates from food and man. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, 1991. p.353-362

FIGUEIREDO, D. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos/RS. **Centro Estadual de Vigilância em Saúde/RS**. 2008. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 26 de abril de 2009.

FREUDENBERG, M.A.; MERLIN, T.; SING, A.; GALANOS, C.; SALOMÃO, R. Bacteria-induced hypersensitivity to endotoxin. **Innate Immunity**, v.5, 1999. p.231-238

GAL-MOR, O. *Salmonella enterica*. The Infectious Disease Research Laboratory – Sheba Medical Center, Israel. Disponível em: <<http://eng.sheba.co.il>>. Acesso em 05 de dezembro de 2010.

GALÁN, J.E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, v.284, n.1322, 1999. p.1322-1328

GAST, R.K. Detecting infections of chicken with recent *Salmonella Pullorum* isolates using standard serological methods. **Poultry Science**, v.76, 1997. p.17-23

GAST, R. K. *Salmonella* infections – Paratyphoid Infections. In: SAIF, Y.M. (Ed.). **Disease of Poultry**. 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p.636-665.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S.; DORR, P.; TADESSE, D.A.; POST, K.; WOLF, L. Occurrence of *spvA* virulence gene and clinical significance for multidrug-resistant *Salmonella* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.3, 2009. p.777-780

GIBSON, D.L.; WHITE, A.P.; RAJOTTE1, C.M.; KAY, W.W. *agfC* and *agfE* facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v.153, 2007. p.1131-1140

GLÓSNIKA, R.; KUNIKOWSKA, D. The epidemiological situation of *Salmonella* Enteritidis in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, 2002. p.143-150

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella***. France: Institute Pasteur, 2007.

GROISMAN, E.A.; OCHMAN, H. How *Salmonella* became a pathogen. **Trend in Microbiology**, v.5, n.9, 1997. p.343-349

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

GUILLOTEAU, L.A.; WALLIS, T.S.; GAUTIER, A.V.; MACINTYRE, S.; PLATT, D.J.; LAX, A.J. The *Salmonella* Virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses. **Infection and Immunity**, v.64, n.8, 1996. p.3385-3393

GUO, X.; CHEN, J.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hilA*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, 2000. p.5248-5252

HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity – A Darwinian view of the evolution of microbes. **European Molecular Biology Organization**, v.2, n.5, 2001. p.376-381

HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, v.3, 2001. p.549–559

HARDT, W.D.; GÁLAN, J.E. A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. **Proceeding of the National Academy of Science**, v.94, 1997. p.9887-9892

HARDT, W.D.; URLAUB, H.; GÁLAN, J.E. A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella* Typhimurium is encoded by a cryptic bacteriophage. **Proceeding of the National Academy of Science**, v.95, 1998. p.2574-2579

HEITHOFF, D.M.; SHIMP, W.R.; LAU, P.W.; BADIE, G.; ENIOUTINA, E.Y.; DAYNES, R.A.; BYRNE, B.A.; HOUSE, J.K.; MAHAN, M.J. Human *Salmonella* clinical isolates distinct from those of animal origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.6, 2008. p.1757-1766

HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity island 2. **Molecular Microbiology**, v.36, n.5, 2000. p.1015-1023

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.294, 2004. p.95–102

HEUZENROEDER, M. W.; MURRAY, C. J.; DALCIN, R. M. Molecular basis of benign colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. **Rural Industries Research and Development Corporation**, n.1/106, 2000.

HOPKINS, K.L.; THRELFALL, E.J. Frequency and polymorphism of *sopE* in isolates of *Salmonella enterica* belonging to the ten most prevalent serotypes in England and Wales. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, 2004. p.539–543

HUECK, C.J. Type III Secretion System in bacterial pathogens of animal and plants.

Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.62, n.2, 1998. p.379-433

KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; VOLF, J.; FALDYNA, M.; ONDRACKOVA, P.; KUMMER, V., RYCHLIK, I. Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **BMC Microbiology**, v.10, n.75, 2010. p.1-11

KINGLSEY, R.A.; HUMPHRIES, A.D.; WEENING, E.H.; ZOETE, M.R.; WINTER, S.; PAPACONSTANTINOPOULOU, A.; DOUGAN, G.; BÄUMLER, A.J. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. **Infections and Immunity**, v.71, n.2, 2003. p.629-640

KINGSLEY, R.; WEENING, E.H.; KEESTRA, A.M.; BÄUMLER, A.J. Population heterogeneity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium resulting from phase variation of the *lpf* operon *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.9, 2002. p.2352-2359

KURITA, A., GOTOH, H.; EGUCHU, M.; OKADA, N.; MATSUURA, S.; MATSUI, H.; DANBARA, H.; KIKUCHI, Y. Intracellular expression of the *Salmonella* plasmid virulence protein, SpvB, causes apoptotic cell death in eukaryotic cells. **Microbial Pathogenesis**, v.35, 2003. p.43-48

LEYER, G.J.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.6, 1992. p.2075-2080

LIBBY, S.J.; HALSEY, T.A.; ALTIER, C., POTTER, J.; GYLES, C.L. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F. SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (Ed.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 3.ed. Blackwell Publishing, 2008. p.143-167.

LIMAWONGPRANEE, S.; HAYASHIDANI, H.; OKATANI, A.T.; ONO, K.; HIROTA, C.; KANEKO, K.; OGAWA, M. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.61, n.3, 1999. p.255-259

LING, J.M.L. Rapid detection of food-borne pathogens in clinical specimens, food and environmental samples. **Hong Kong Medical Journal**, v.15, n.1., 2009. p.26-29

LOPES, V.C.; VELAYUDHAN, B.T.; HALVORSON, D.A., NAGARAJA, K.V. Preliminary evaluation of the use of the *sefA* fimbrial gene to elicit immune response against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in chickens. **Avian Disease**, v.50, 2006. p.185-190

MACHADO, J.; BERNARDO, F. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, n.4, 1990. p.477-480

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.L.; CLARK, D.P. Princípios de Genética Bacteriana. In: _____ (Ed.). **Microbiologia de Brock**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.278-283

MILLER, J.F.; MEKALANOS, J.J.; FALKOW, S. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. **Science**, v.243, 1989. p.916-922

MIRMOMENI, M.H.; KIANI, S.; SISAKHTNEZHAD, S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, n.11, 2008. p.1497-1501

MIROLD, S.; RABSCH, W.; ROHDE, M.; STENDER, S.; TSCHÄPE, H.; RÜSSMANN, IGWE, E.; HARDT, W.D. Isolation of a temperate bacteriophage encoding type III effector protein *sopE* from an epidemic *Salmonella* Typhimurium strain. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The USA**, v.96, 1999. p.9845-9850

- MIROLD, S.; RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; HARDT, W.D. Transfer of the *Salmonella* type III effector *sopE* between unrelated phage families. **Journal of Molecular Biology**, v.312, 2001. p.7-16
- MORITA, Y.; KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; NAGAI, A.; OKUNO, H.; NAKABAYASHI, Y.; NAKAJIMA, T.; NIKAMI, T.. Prevalence of *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Salmonella* spp. in retail ground chicken meat. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v.56, n.6, 2003. p.401-405
- MUERMANN, L.; SANTOS, M.C.; LONGARAY, S.M.; BOTH, J.M.C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.3, 2008. p.529-534
- MURRAY, R.A.; LEE, C.A. Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. **American Society for Microbiology**, v.68, n.9, 2000. p.5050-5055
- MURUGKAR, H.V.; RAHMAN, H.; DUTTA, P.K. Distribution of virulence genes in *Salmonella* serovars isolated from man and animals. **Indian Journal of Medical Research**, v.117, 2003. p.66-70
- NASCIMENTO, V. P; SANTOS, L.R.; CARDOSO, M.O.; RIBEIRO, A.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B. Qualidade microbiológica dos produtos avícolas. In: II SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA DA ASSOCIAÇÃO GOIANA DE AVICULTURA E ESCOLA DE VETERINÁRIA DE UFG. **Anais**. 1996. p.13-17
- NASHWA, M.H.; MAHMOUD, A.H.; SAMI, S.A. Application of multiplex Polymerase Chain Reaction (MPCR) for identification and characterization of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Applied Sciences Research**, v.5, n.12, 2009. p.2343-2348

NORRIS, T.L.; BÄUMLER, A.J. Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The USA**, v.96, n.23, 1999. p.13393-13398

OCHMAN, H.; GROISMAN, E.A. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. **Infection and Immunity**, v.64, n.12, 1996. p.5410–5412

OGUNNIYI, A.D.; KOTLARSKI, I.; MORONA, R.; MANNING, P.A. Role of SefA subunit protein of SEF14 Fimbriae in the Pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Infection and Immunity**, v.65, n.2, 1997. p.708–717

OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L.; ROCHA, T.S.; MENCONI, A.; MARIETTO-GONÇALVES, G.A. Relation between the *spvC* and *invA* genes and resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from avian material. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n.6, 2009. p.279-582

OLIVEIRA, S.D.; BESSA, M.C.; SANTOS, L.R.; CARDOSO, M.R.I.; BRANDELLI, A.; CANAL, C.W. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, 2007. p.720-728

OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.I.R; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.1, 2003. p.123-124

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCHA, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.87, 2002. p.25–35

OLSEN, S. J.; BISHOP, R.; BRENNER, F.W.; ROELS, T.H.; BEAN, N.; TAUXE, R.; SLUTSKER, L. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. **Journal of Infectious Diseases**, v.183, 2001. p.753-761

PAN, T.M.; LIU, Y.J. Identification of *Salmonella* Enteritidis isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.35, 2002. p.147-151

PATHMANATHAN, S.G.; CARDONA-CASTRO, N. SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M.M.; CORREA-OCHOA, M.M.; PUTHUCHEARY, S.D.; THONG, K.L. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hila* gene. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, 2003. p.773-776

PERRY, M.B. Some structural aspects of the antigenic o-polysaccharide components of *Salmonella* somatic lipopolysaccharides. In: CABELLO, F. *et al.* (Ed.) **Biology of Salmonella**, 1.ed. New York: Plenum Press, 1993. p.63-68.

POPPE, C. *Salmonella* Enteritidis in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, 1994. p.1-5

PRAGER, R.; MIROLD, S.; TIETZE, E.; STRUTZ, U.; KNÜPPEL, B.; RABSCH, W.; HARDT, W.D.; TSCHÄPE, H. Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.290, n.7, 2000. p.605-17

PRAGER, R.; RABSCH, W.; STRECKEL, W.; VOIGT, W.; TIETZE, E.; TSCHÄPE, H. Molecular properties of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B distinguish between its systemic and its enteric pathovars. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.9, 2003. p.4270-7278

- PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A.; FERNÁNDEZ, J.; ALEXANDRE, M.; HEITMANN, I. Tipificación fágica de aislados de *Salmonella* Enteritidis de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.9, n.1, 2001. p.7-12
- POPOFF, M.Y. Formules antigeniques des serovars de *Salmonella*. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella**. France: Institute Pasteur, 8.ed.. 2001.
- POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Antigenic Formulas of *Salmonella* Serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella**. France: Institute Pasteur, 7.ed. 1997.
- PORWOLLIK, S.; McCLELLAND, M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.5, 2003. p.977-989
- PROST, E.; RIERMANN, H. Food-borne Salmonellosis. **Annual Review of Microbiology**, n.21, 1967. p.495-528
- RAHMAN, H.; STRECKEL, W.; PRAGER, R.; TSCHAPE, H. Presence of *sopE* gene and its phenotypic expression among different serovars of *Salmonella* isolated from man and animals. **Indian Journal of Medical Resarches**, v.120, 2004. p.35-38
- RAJASHEKARA, G.; MUNIR, S.; ALEXEYEV, M.F., HALVORSON, D.A.; WELLS, C.L.; NAGARAJA, K.V. Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis infection of chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, 2000. p.1759-1763
- RANK, D.L.; SAEED, M.A.; MURIANA, P.M. Cloning of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis fimbrial protein SefA as a surface protein in *Escherichia coli* confers the ability to attach to eukaryotic cell lines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.20, 2009. p.6622–6625

REITER, M.G.R.; FIORESE, M.L.; MORETTO, G.; LÓPEZ, M.C.; JORDANO, R.

Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v.70, n.7, 2007. p.1723-1725

RODRIGUES, D. P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005. Santos, SP. **Anais**. Campinas: FACTA, v. 2, 2005. p. 223-228

ROTGER, R.; CASADESÚS, J. The virulence plasmids of *Salmonella*. **International Microbiology**. v.2, 1999. p.177-184

RYCHLIK, I.; KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; VOLF, J.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; KUMMER, V.; IMRE, A.; SZMOLKA, A.; NAGY, B. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology**, v.9, n.268, 2009. p.1-9

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v.239, n.4839, 1988. p.487-91

SALEHI, T.Z.; MAHZOUNIEH, M.; SAEEDZADEH, A. Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR Method. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.8, 2005. p.557-559

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A.T., AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, 2000. p.39-42

SHIVAPRASAD, H.L.; BARROW, P.A. *Salmonella* infections – Pullorum Disease and Fowl Typhoid. In: SAIF, Y.M. (Ed.). **Disease of Poultry**. 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p.620-636.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n.2, 2002. p.85-100

STRECKEL, W.; WOLFF, A.C., PRAGER, R.; TIETZE, E.; TSCHÄPE, H. Expression profiles of effector proteins SopB, SopD1, SopE1 and AvrA differ with systemic, enteric and epidemic strains of *Salmonella enterica*. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.48, 2004. p.496-503

SUKUPOLVI, S.; LORENZA, R.G.; GORDON, J.I.; BIAN, Z.; PFEIFER, J.D.; NORMARK, S.J.; RHEN, M. Expression of Thin Aggregative Fimbriae promotes interaction of *Salmonella* Typhimurium SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.65, n.12, 1997. p.5320-5325

SWAMY, S.C. BARNHART, H.M.; LEE, M.D.; DREESEN, D.W. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* isolated from poultry products, wastewater and human sources. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.10, 1996. p.3768-3771

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C., DIAS, A.M.G., IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.38, n.5, 1996. p.315-322

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; PERESI, J.T.; FUZIHARA, T.O.; YONAMINE, E.K; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from non-human sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v.65, n.6, 2002. p.1041-1044

THIAGARAJAN, D.; SAEED, M.; TUREK, J.; ASEM, E. *In vitro* attachment and invasion of chicken ovarian granulose cells by *Salmonella enterica* phage type 8. **Infection and Immunity**, v.64, n.12, 1996. p.5015-5021

TRAFNY, E.A.; KOZLOWSKA, K.; SZPAKOWSKA, M. A novel multiplex PCR assay for the detection of *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis in human faeces. **Letter in Applied Microbiology**, v.43, 2006. p.673-679

TURCOTTE, C.; WOODWARD, M.J. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of General Microbiology**, v.139, 1993. p.1477-1485

UBABEF – UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual – 2009**. São Paulo: UBABEF, 2009.

VAN ASTEN, A.J.A.M.; VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n.3, 2005. p.251-259

VERMA, J.C.; GUPTA, B.R. Prevalence of *Salmonella* serotypes of avian origin [in India]. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases**, v.18, n.1, 1997. p.52-55

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, 2009. p.406-414

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

WASSENAAR, T.M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line? **FEMS Microbiology Letters**, v.201, 2001. p.1-7

WHITE, A.P.; GIBSON, D.L.; COLLINSON, S.K.; BANSER, P.A.; KAY, W.W.
Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Journa of Bacteriology**, v.185, n.18, 2003. p.5398-5407

WRAY, C.; WRAY, A. Preface. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). ***Salmonella in domestic animals***. 1.ed. New York: CAB International, 2000. 2p.

APÊNDICE A - Amostras de *Salmonella* Enteritidis: ano de isolamento e origem.

Identificação	Ano de Isolamento	Origem
1	1996	carcaça ^a
2	1996	carcaça ^a
3	1996	carcaça ^b
4	1996	carcaça ^c
5	1996	carcaça ^a
6	1996	carcaça ^b
7	1996	carcaça ^d
8	1996	carcaça ^d
9	1996	carcaça ^d
10	1996	carcaça ^a
11	1996	carcaça ^d
12	1996	carcaça ^d
13	1996	carcaça ^d
14	1996	carcaça ^a
15	1996	carcaça ^d
16	1996	carcaça ^c
17	1999	carcaça ^c
18	1999	suabe de arrasto
19	1999	suabe de arrasto
20	1999	suabe de arrasto
21	1999	suabe de arrasto
22	1999	suabe de arrasto
23	1999	suabe de arrasto
24	1999	suabe de arrasto
25	1999	órgão de ave
26	1999	órgão de ave
27	1999	órgão de ave
28	1999	órgão de ave
29	1999	órgão de ave
30	1999	órgão de ave
31	1999	órgão de ave
32	1999	órgão de ave
33	1999	órgão de ave
34	1999	órgão de ave
35	1999	órgão de ave
36	1999	órgão de ave
37	1999	órgão de ave
38	1999	órgão de ave
39	1999	suabe de arrasto
40	1999	órgão de ave
41	1999	órgão de ave

(continuação)

Identificação	Ano de Isolamento	Origem
42	1999	órgãos de aves
43	2000	suabe de arrasto
44	2000	suabe de arrasto
45	2000	suabe de arrasto
46	2000	suabe de arrasto
47	2000	suabe de arrasto
48	2000	suabe de arrasto
49	2000	suabe de arrasto
50	2000	suabe de arrasto
51	2000	ração
52	2000	suabe de arrasto
53	2000	suabe de arrasto
54	2000	suabe de arrasto
55	2000	órgãos de aves
56	2000	órgãos de aves
57	2000	órgãos de aves
58	2000	órgãos de aves
59	2000	órgãos de aves
60	2000	órgãos de aves
61	2000	órgãos de aves
62	2000	órgãos de aves
63	2000	órgãos de aves
64	2000	órgãos de aves
65	2000	órgãos de aves
66	2000	órgãos de aves
67	2000	suabe de arrasto
68	2001	suabe de arrasto
69	2001	suabe de arrasto
70	2001	suabe de arrasto
71	2001	órgãos de aves
72	2001	órgãos de aves
73	2001	suabe de arrasto
74	2001	suabe de arrasto
75	2001	suabe de arrasto
76	2001	suabe de arrasto
77	2001	órgãos de aves
78	2001	suabe de arrasto
79	2001	órgãos de aves
80	2001	órgãos de aves
81	2001	órgãos de aves
82	2001	suabe de arrasto
83	2001	ovos bicados
84	2010	conteúdo cecal

- ^a asa;
- ^b peito;
- ^c coxa e sobrecoxa;
- ^d dorso;
- ^e frangos de corte na linha de inspeção

APÊNDICE B – Genes de virulência pesquisados: sigla, significado e função.

Sigla	Significado	Principais funções
<i>lpfA</i>	<i>Long Polar Fimbriae</i>	- adesão às células M do intestino - favorece o tropismo pelas Placas de Peyer - confere imunidade cruzada entre sorovares
<i>agfA</i>	<i>Agreggative Fimbriae</i>	- autoagregação (maior sobrevivência) - interação entre a <i>Salmonella</i> e o intestino - formação de biofilmes
<i>sefA</i>	<i>Salmonella Enteritidis Fimbriae</i>	- melhor interação entre bactéria e macrófagos - atuação em conjunto com outras fimbrias
<i>invA</i>	<i>Invasive</i>	- internalização da bactéria para invasão das células epiteliais
<i>hilA</i>	<i>Hiperinvasive</i>	- regulação dos componentes do TTSS
<i>avrA</i>	<i>Avirulence</i>	- proteína efetora do TTSS - indução de apoptose celular - inibe produção de IL-8 e TNF- α (prejudica resposta inflamatória)
<i>sopE</i>	<i>Salmonella Outer Protein</i>	- estimula deformação da membrana plasmática e citoesqueleto das células do hospedeiro (invasão bacteriana)
<i>sivH</i>	<i>Salmonella Invasin Homologue</i>	- colonização das Placas de Peyer
<i>spvC</i>	<i>Salmonella Plasmid Virulence</i>	- afeta interação do sistema imune do hospedeiro - aumenta taxa de crescimento da bactéria

APÊNDICE C – Protocolos utilizados para pesquisa dos genes: concentrações de reagentes do *mix*, condições do termociclador e número de ciclos no termociclador.

Gene	Concentração de reagentes	Condições do termociclador	Ciclos
<i>lpfA</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 2µL MgCl ₂ (4mM), 2µL DNA	94°C, 1seg – 55°C, 1seg – 74°C, 21seg	35
<i>agfA</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	94°C, 1seg – 55°C, 1seg – 74°C, 21seg	35
<i>sefA</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	94°C, 1seg – 55°C, 1seg – 74°C, 1seg	35
<i>invA</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	94°C, 1seg – 55°C, 1seg – 74°C, 1seg	35
<i>hilA</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 0,75µL MgCl ₂ (1,5mM), 2µL DNA	94°C, 120seg – 62°C, 60seg – 72°C, 60seg	30
<i>avrA</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 1µL MgCl ₂ (2,0mM), 2µL DNA	94°C, 60seg – 55°C, 60seg – 72°C, 60seg	35
<i>sopE</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 1µL MgCl ₂ (2,0mM), 2µL DNA	94°C, 60seg – 55°C, 60seg – 72°C, 60seg	35
<i>sivH</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 1µL MgCl ₂ (2,0mM), 2µL DNA	94°C, 30seg – 56°C, 45seg – 72°C, 45seg	35
<i>spvC</i>	2,5µL Tampão 10x, 3µL dNTPs (2,5mM), 3,5µL cada primer (20pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 1µL MgCl ₂ (2,0mM), 2µL DNA	93°C, 60seg – 42°C, 60seg – 72°C, 120seg	30

APÊNDICE D – Amostras de *Salmonella* Enteritidis: ano de isolamento, origem e perfil genético.

Identificação	Ano de Isolamento	Origem	Perfil
1	1996	carcaça ^a	P1
2	1996	carcaça ^a	P1
3	1996	carcaça ^b	P1
4	1996	carcaça ^c	P1
5	1996	carcaça ^a	P1
6	1996	carcaça ^b	P1
7	1996	carcaça ^d	P1
8	1996	carcaça ^d	P1
9	1996	carcaça ^d	P3
10	1996	carcaça ^a	P3
11	1996	carcaça ^d	P2
12	1996	carcaça ^d	P1
13	1996	carcaça ^d	P2
14	1996	carcaça ^a	P1
15	1996	carcaça ^d	P1
16	1996	carcaça ^c	P1
17	1999	carcaça ^c	P1
18	1999	suabe de arrasto	P1
19	1999	suabe de arrasto	P1
20	1999	suabe de arrasto	P1
21	1999	suabe de arrasto	P1
22	1999	suabe de arrasto	P2
23	1999	suabe de arrasto	P1
24	1999	suabe de arrasto	P1
25	1999	órgão de ave	P1
26	1999	órgão de ave	P1
27	1999	órgão de ave	P1
28	1999	órgão de ave	P1
29	1999	órgão de ave	P1
30	1999	órgão de ave	P1
31	1999	órgão de ave	P1
32	1999	órgão de ave	P1
33	1999	órgão de ave	P1
34	1999	órgão de ave	P1
35	1999	órgão de ave	P1
36	1999	órgão de ave	P1
37	1999	órgão de ave	P1
38	1999	órgão de ave	P4
39	1999	suabe de arrasto	P1
40	1999	órgão de ave	P1
41	1999	órgão de ave	P1

(continuação)

Identificação	Ano de Isolamento	Origem	
42	1999	órgãos de aves	P2
43	2000	suabe de arrasto	P1
44	2000	suabe de arrasto	P1
45	2000	suabe de arrasto	P3
46	2000	suabe de arrasto	P1
47	2000	suabe de arrasto	P1
48	2000	suabe de arrasto	P1
49	2000	suabe de arrasto	P1
50	2000	suabe de arrasto	P1
51	2000	ração	P1
52	2000	suabe de arrasto	P2
53	2000	suabe de arrasto	P1
54	2000	suabe de arrasto	P1
55	2000	órgãos de aves	P1
56	2000	órgãos de aves	P1
57	2000	órgãos de aves	P1
58	2000	órgãos de aves	P1
59	2000	órgãos de aves	P1
60	2000	órgãos de aves	P1
61	2000	órgãos de aves	P1
62	2000	órgãos de aves	P1
63	2000	órgãos de aves	P1
64	2000	órgãos de aves	P1
65	2000	órgãos de aves	P2
66	2000	órgãos de aves	P1
67	2000	suabe de arrasto	P1
68	2001	suabe de arrasto	P1
69	2001	suabe de arrasto	P1
70	2001	suabe de arrasto	P1
71	2001	órgãos de aves	P1
72	2001	órgãos de aves	P1
73	2001	suabe de arrasto	P1
74	2001	suabe de arrasto	P1
75	2001	suabe de arrasto	P1
76	2001	suabe de arrasto	P1
77	2001	órgãos de aves	P1
78	2001	suabe de arrasto	P1
79	2001	órgãos de aves	P1
80	2001	órgãos de aves	P1
81	2001	órgãos de aves	P1
82	2001	suabe de arrasto	P1
83	2001	ovos bicados	P1
84	2010	conteúdo cecal	P1