



ABORDAGEM SOBRE *Salmonella* sp. COM ENFOQUE NA CARACTERIZAÇÃO, PATOGÊNESE E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EM AVES

Eliete Souza Santana¹, Fábio Henrique de Oliveira¹, Tatiane Martins Rocha¹, Robson Rodrigues Santana², Maria Auxiliadora Andrade³

¹Pós-graduandos em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás, elietessouza@yahoo.com.br; ²Aluno do Curso de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Goiás. ³Orientadora e Professora da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

Data de recebimento: 02/05/2011 - Data de aprovação: 31/05/2011

RESUMO

Atualmente, tem-se registrado um aumento mundial de casos de infecções por *Salmonella*, tanto em humanos, como em aves comerciais, provocando grandes perdas econômicas, principalmente para a indústria avícola e preocupações à saúde pública. Considerando a fisiologia de cada indivíduo, a carga genética e os fatores que interferem nos mecanismos de defesa, principalmente na defesa inata, frente às agressões por micro-organismos, propôs-se o presente trabalho. Buscou-se fazer uma revisão, com o objetivo de elucidar aspectos, que envolvem a caracterização, a patogênese e os principais métodos de diagnóstico da *Salmonella* sp., e assim aprimorar medidas de controle nos plantéis de criação e minimizar os riscos de toxinfecções nos seres humanos.

PALAVRAS-CHAVE: diagnóstico, infecções, patogênese, salmoneloses.

APPROACH ON *Salmonella* sp. FOCUSING ON CHARACTERIZATION, PATHOGENESIS AND DIAGNOSTIC METHODS IN POULTRY

ABSTRACT

Currently, we have registered an increase of worldwide cases of *Salmonella* infections in both humans, as in commercial poultry, causing great economic losses, especially for the poultry industry and public health concerns. Considering the physiology of each individual, and the genetic factors that interfere in defense mechanisms, especially in the innate defense in face of assaults by microorganisms, it was proposed in this work. We tried to do a review with the aim of elucidating aspects, involving the characterization, pathogenesis and the main methods for diagnosis of *Salmonella* sp., and thus improve control measures in herds for breeding and minimize the risk of poisoning in humans.

KEYWORDS: diagnosis, infections, pathogenesis, salmonellosis.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella é uma das bactérias mais extensivamente estudada em termos de fisiologia, genética, estrutura celular e fatores de virulência, mesmo assim continua causando preocupações a autoridades nacionais e internacionais dado à sua complexidade e patogenicidade (DICKEL, 2004).

O estudo de salmonelose, sua patogênese e a utilização de diferentes métodos de diagnóstico, serve como instrumento de avaliação do grau de contaminação dos plantéis avícolas por estas bactérias nos plantéis avícolas, sendo que sua presença é uma barreira sanitária que restringe o comércio de aves e seus produtos (GAMBIRAGI et al., 2003).

A segurança e o controle de qualidade dos alimentos estão alicerçados nas exigências do mercado internacional e nos sistemas de gestão da qualidade da cadeia avícola que apontam para cuidados com matérias-primas, produtos e subprodutos (SILVA, 2006).

A qualidade sanitária do frango é fator relevante para saúde pública. A veiculação de doenças entre animais e homens é tema atual e de preocupação global do ponto de vista técnico-científico e comercial. Enquadra-se neste contexto todo um complexo agroindustrial de criação de aves e de comercialização nacional e internacional de carnes (REZENDE, 2006).

Dentro deste enfoque, o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) através da portaria de número 193 de 19 de setembro de 1994, reforçou a legislação de controle de *Salmonella* nas granjas avícolas, instituindo o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA).

E a partir do ano de 2003, o MAPA passou também a realizar um monitoramento contínuo do nível de contaminação por *Salmonella* em abatedouros de aves. A implementação deste programa nos estabelecimentos sob Inspeção Federal se deu em razão das exigências em relação à segurança alimentar, aliada à necessidade de que o sistema de inspeção seja realizado com base nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e na Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). A construção deste sistema poderá também, ajudar no rastreamento de surtos epidemiológicos causados por *Salmonella* e na construção de um sistema de informações para avaliação da contaminação dos produtos (BRASIL, 2003).

A situação tem se agravado com a identificação de alguns sorovares que são patogênicos para as aves e muito patogênicos para o homem, podendo se envolver na cadeia alimentar do homem, determinando quadros de toxinfecções.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Salmoneloses aviárias

As salmoneloses aviárias são doenças agudas ou crônicas, provocadas por bactérias do gênero *Salmonella*. Essas bactérias infectam as aves e podem causar três doenças distintas: (1) pulorose, cujo agente é a *Salmonella* Pullorum, (2) tifo aviário, causado por *S. Gallinarum* e (3) paratifo aviário, causado por qualquer outra salmonela que não seja *S. Pullorum* ou *S. Gallinarum* (BERCHIERI JR. & OLIVEIRA, 2007).

A pulorose é uma doença septicêmica, que acomete mais aves jovens, altamente específica de galinhas e perus, que determina quadros de diarreia branca, com alta mortalidade. Pode ser transmitida de diferentes formas, porém as aves portadoras inaparentes são a fonte mais importante de transmissão, tanto horizontal como vertical (REVOLLEDO, 2009).

O tifo aviário é uma enfermidade que acomete mais as aves adultas, mas pode afetar aves jovens com um quadro semelhante à pulorose, cuja transmissão também pode ocorrer por diversas vias. Os animais apresentam diarreia esverdeada e taxa de letalidade alta, com morbidade baixa, entretanto, por longos períodos (BERCHIERI JR., 2000; DICKEL, 2004).

BERCHIERI JR. (2000) e DICKEL (2004) relataram que o paratifo aviário, acomete aves e mamíferos, jovens ou adultos. A forma clínica é mais freqüente em aves jovens e a doença se manifesta por quadro entérico e sistêmico nos casos graves que poderão tornar adultas assintomáticas. Os mesmos autores ressaltam ainda, que as salmonelas são responsáveis por doenças veiculadas por alimentos nos seres humanos devido à ingestão de produtos de origem avícola contaminado.

De acordo com FRIEDMAN et al. (2003), aves jovens são mais susceptíveis a infecções paratíficas e pulorose do que aves mais velhas pois, embora o trato gastrointestinal (TGI) esteja completo anatomicamente à eclosão, possui ainda desenvolvimento pós eclosão, pois a superfície e a proliferação de enterócitos aumentam nas duas primeiras semanas.

Outro fato sobre as salmoneloses que merece ser destacado é a contaminação de ovos, que ocorre como resultado da infecção do tecido reprodutivo da galinha durante a formação do folículo da gema e/ou formação do albume no oviduto e antes da formação da casca, resultando em transmissão vertical. Os ovos contaminam-se também após a formação da casca, durante a passagem pela cloaca ou pelo contato com as fezes na cama, no material de ninho, mãos do tratador, água, bandejas, cama e piso, até mesmo pelo carrapato das aves *Argas persicus* ou em qualquer local contaminado, inclusive incubatórios, caracterizando-se a transmissão horizontal (MIYAMOTO et al., 1997; COX et al., 2000).

As manifestações clínicas e alterações anatomopatológicas em aves são bastante variáveis e parece ser afetada por fatores relacionados ao: a) patógeno: dose infectante, virulência da cepa, sorovar, habilidade de multiplicar e sobreviver no organismo do hospedeiro; b) hospedeiro: idade, espécie, status do sistema imune; c) ambiente: conteúdo gastrintestinal, pH, composição do alimento e micro-organismos competitivos (SAVAGE, 1980).

Além da doença clínica, ocorrem as infecções subclínicas, que são mais preocupantes do ponto de vista da saúde pública, pois as aves aparentemente sadias agem como reservatórios ao micro-organismo e podem introduzi-lo na cadeia alimentar do homem (BACK, 2002).

Foi demonstrado em inoculações experimentais de frangos de corte, que a *Salmonella* causa infecções assintomáticas, com considerável colonização intestinal (ANDRADE, 2005). Segundo RODRIGUES (2005), o estado de animal portador é um fator epidemiológico determinante, aliada às dificuldades técnicas para sua detecção, convertem as aves em fonte contínua de contaminação do meio ambiente e, portanto, dos produtos de origem animal.

2.2 Características da *Salmonella*

2.2.1 Gênero

O gênero *Salmonella* foi caracterizado em 1885, sendo a sua denominação, uma homenagem ao patologista Daniel Salmon (RODRIGUES, 2005). Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram - negativos que compõem o grupo mais complexo das *Enterobacteriaceae*, com 2.541 sorovares descritos (CDC 2005). Estão amplamente distribuído na natureza, podendo infectar além das aves, o homem, insetos, peixes, répteis e mamíferos em geral. De acordo com BACK et al. (2006) a *Salmonella* é um micro-organismo de fácil adaptação no ambiente, tornando-se muito difícil a erradicação dos ambientes criatórios

De acordo com o Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa sobre *Salmonella*, da Organização Mundial da Saúde (Instituto Pasteur, Paris), o gênero apresenta duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, que incluem atualmente 2.519 e 22 sorovares (SPOLAORE, 2007), respectivamente. A espécie *enterica* possui seis subespécies (*Enterica*, *Salamae*, *Arizonae*, *Diarizonae*, *Houtenae* e *Indica*) (TOZETTO, 2006), conforme está indicado no Quadro 1.

SHELOBOLINA et al. (2004) identificaram uma cepa de *Salmonella* que nominou *Salmonella subterrânea*. Essa cepa foi descrita como uma terceira espécie, isolada de sedimento coletado de região aquífera em Oak Ridge, EUA. Entretanto, pelo diagnóstico molecular demonstrou-se que, pela sequência de DNA ribossomal, essa bactéria apresentava similaridade genética de 96,4% com *Salmonella bongori*.

QUADRO 1. Espécies, subespécies e sorovares de *Salmonella*, conforme esquema de classificação de Le Minnor.

Espécies	Nº de sorovares	Habitat comum
<i>Salmonella enterica</i>		
subsp. <i>enterica</i>	1504	Animais de sangue quente
subsp. <i>salamae</i>	502	Animais de sangue frio e meio ambiente
subsp. <i>arizonae</i>	95	Animais de sangue frio e meio ambiente
subsp. <i>diarizonae</i>	333	Animais de sangue frio e meio ambiente
subsp. <i>houtenae</i>	72	Animais de sangue frio e meio ambiente
subsp. <i>indica</i>	13	Animais de sangue frio e meio ambiente
<i>Salmonella bongori</i>	22	Animais de sangue frio e meio ambiente

Fonte: adaptado de SPOLAORE (2007).

Como mencionado anteriormente, a *Salmonella* Entérica subespécie *Enterica* possui um grande número de sorovares, merecendo destaque em saúde pública, a *S. ParaTyphi* A, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. ParaTyphi* B, *S. Cholerasis*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Typhi* e *S. Anatum* (TOZETTO, 2006).

2.2.2 Estrutura antigênica

As células são Gram - negativas, não capsuladas, bastonetes curtos (2-4 X 0,5-1 µm), aeróbias ou facultativamente anaeróbicas. Possuem flagelos peritríquios e freqüentemente possuem fímbrias (GOMES, 2008).

A taxonomia do gênero *Salmonella* é baseada na composição de seus antígenos de superfície, que são os antígenos somáticos (O), flagelares (H) e de virulência (Vi). Existem várias formas de classificação da *Salmonella*, o que torna bastante confusa a sua compreensão. O esquema de Kauffmann-White divide o gênero em tipos sorológicos em função dos antígenos O, H e Vi que apresentam (BREN-NER et al., 2000).

O antígeno somático O é um carboidrato, componente mais externo do lipopolissacarídeo da (LPS) da parede celular. É um polímero de subunidades O; cada subunidade é composta tipicamente de quatro a seis açúcares dependendo do antígeno. Variações no antígeno O resultam da variação nos componentes açúcares da subunidade O, nos tipos de ligação covalente entre os açúcares da subunidade e nos tipos da ligação entre as subunidades O que formam o polímero antígeno O (CDC, 2004).

O antígeno H é a porção filamentosa do flagelo bacteriano. Constitui-se por subunidades de flagelina, cuja porção antigenicamente variável é a região central da proteína. *Salmonella* pode expressar dois antígenos H diferentes, codificados por 2 genes distintos. A expressão desses genes é coordenada de modo que somente um antígeno flagelar é expresso num dado momento na célula bacteriana. O antígeno H, ao contrário do antígeno O é lábil ao calor e pode existir tanto na forma simples (monomérica) ou em duas formas separadas (difásica), um dos quais somente é expresso a um dado momento. Estes antígenos flagelares distintos são referidos como Fase 1 e Fase 2 e este fenômeno é conhecido como variação de fase de Andrewes. Isolados monofásicos expressam somente um tipo de flagelina, o que ocorre naturalmente em alguns sorovares (CDC, 2004; GOMES, 2008).

Antígenos da fase 1 são assinalados com letras minúsculas (exemplo a, b) e aqueles de fase dois são dados em números arábicos ou letras minúsculas. Os antígenos flagelares da fase 1 e fase 2 são determinados por dois genes, H1 e H2 que codificam para a proteína denominada flagelina. Portanto, a fórmula antigênica designa um sorotipo que compreende a subespécie, antígenos O, antígeno H fase 1, antígeno H fase 2. Por exemplo: I 4,12:i:1,2 (*Salmonella* Typhimurium); I 9,12:g,m:- (*Salmonella* Enteritidis); II 47:b:1,5; IV 48:g,z51:- (CDC, 2004).

A síntese da flagelina H2 é controlada pelo evento recombinante que inverte a seção do cromossomo contendo o gene H2. Quando o gene H2 é ativado, um outro gene próximo sintetiza uma substância repressora que inibe a expressão do gene H1 (GOMES, 2008).

O antígeno Vi, um antígeno capsular termolábil, é comumente encontrado em *Salmonella* Typhi, a qual causa a febre tifóide no homem, sendo muito útil para a identificação desse sorotipo. Também pode ser ocasionalmente detectado em *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Paratyphi C (BOPP, 1999).

2.2.3 Caracterização molecular

Devido à dificuldade de classificar *Salmonella* somente pelos antígenos de superfície que apresentam, outras formas de classificação têm sido propostas e empregadas, sendo estas divididas em fenotípicas e genotípicas. Entre as técnicas de caracterização moleculares fenotípicas mais importantes destaca-se a biotipagem, que se baseia em reações bioquímicas; a fagotipagem, baseada na

sensibilidade a bacteriófagos específicos e ainda, a sorotipagem, que consiste nas reações antígeno-anticorpos. Já a técnica de caracterização molecular genotípica que se destaca é a do perfil plasmidial, no qual o micro-organismo é classificado de acordo com os plasmídios, que são os segmentos de ácido desoxirribonucléico extracromossômico (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As técnicas clássicas de tipagem como a biotipagem, determinação do padrão de suscetibilidade a antimicrobianos, sorotipagem e fagotipagem, baseiam-se na presença ou ausência de atividades metabólicas ou biológicas expressas pelos micro-organismos (ARBEIT, 1999).

A biotipagem é determinada através dos biótipos, que são diferentes padrões de fermentação de açúcares apresentados por um único sorotipo. As características utilizadas são geneticamente estáveis e incluem, por exemplo, no caso da *S. Typhimurium*, a fermentação da ramnose de Bitter, meso inositol, L-ramnose, d-tartarato, e meso-tartarato, considerado o mais antigo e difuso sorovar com o maior número de biótipos. A perda de biótipos variantes tem mostrado que a *S. Agona* quando comparado com a *S. Typhimurium* evidenciou que *S. Typhimurium* é de origem mais antiga (GOMES, 2008).

A fagotipagem está baseada na sensibilidade da cepa a diferentes bacteriófagos em apropriadas diluições. A técnica foi utilizada, pela primeira vez, com a *S. Typhi* e tem sido aplicada a *S. Typhimurium* e a outras salmonelas. Essa técnica possui grande valor em estudos epidemiológicos e existem diferentes esquemas de fagotipagem (GUINEE & VAN LEEUWEN, 1978).

Tem-se ainda, a técnica da sorotipagem, que como já descrito anteriormente, baseia-se em reações antígeno-anticorpo, na qual os carboidratos da superfície celular, conhecidos como antígenos somáticos O, e proteínas flagelares, denominadas antígenos flagelares ou H (TOZETTO, 2006).

Embora os métodos fenotípicos sejam valiosos para a caracterização de estirpes e ainda sejam utilizados, eles apresentam várias dificuldades. Para executá-los, cada amostra requer o uso de um conjunto adequado de reagentes e procedimentos. Por exemplo, para realizar a sorotipagem, necessita-se de grande volume de anti-soros. Para a execução da fagotipagem requer-se o uso de reagentes especializados como fagos e estirpes bacterianas para propagar os fagos, disponíveis somente em laboratórios de referência (SWAMINATHAN & MATAR, 1993). Ressalta-se ainda que os sistemas de fagotipagem em bacteriocinotipagem não são disponíveis para todas as espécies bacterianas. Além disso, os marcadores fenotípicos podem não ser expressos de forma estável em certas condições ambientais ou de cultivo (FARBER, 1996).

Com a disseminação dos métodos para análise de DNA, técnicas genotípicas têm sido aplicadas à tipagem de estirpes bacterianas (ARBEIT, 1999). Esses métodos de tipagem moleculares apresentam muitas vantagens sobre as técnicas convencionais. De acordo com FARBER (1996), uma das mais importantes é que o DNA sempre pode ser extraído das bactérias, pois todas as bactérias são tipáveis; outra é que o poder discriminatório dos métodos baseados em análise de DNA é maior que o dos procedimentos fenotípicos.

Entre os métodos de tipagem baseados na reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) destacam-se a (Repetitive Extragenic Palindromic) REP-PCR e a Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). A REP-PCR utiliza iniciadores baseados em seqüências cromossômicas curtas repetitivas já

identificadas para muitas bactérias; é reprodutível e tem poder discriminatório moderado (ARBEIT, 1999).

Outro método considerado simples e rápido e tem várias vantagens é o Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR), também referida como Arbitrarily Primed-PCR (AP-PCR). De acordo com ARBEIT (1999), difere da PCR convencional em dois pontos essenciais, pois os iniciadores utilizados são curtos, geralmente 10 pb, e as seqüências são escolhidas aleatoriamente.

Outra técnica que pode ser utilizada é a eletroforese em campo pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) é uma técnica altamente efetiva para muitas espécies bacterianas. O genoma é digerido com uma enzima de restrição para a qual contém poucos sítios de reconhecimento, gerando cerca de 10 a 30 fragmentos de 10 a 800 pb. Esses fragmentos podem ser resolvidos como um padrão de bandas distinto, usando uma cuba especialmente projetada que posiciona o gel de agarose entre três conjuntos de eletrodos que formam um hexágono ao redor do gel. O campo elétrico é fornecido em pulsos que se alternam a partir de cada conjunto de eletrodos, permitindo um alto nível de resolução. Todas as espécies são tipáveis por PFGE e atualmente é o método de escolha para a tipagem de muitas espécies (ARBEIT, 1999).

Para sorovares comuns como *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhi, vários métodos de subtipagem além da sorotipagem são freqüentemente utilizados.

Métodos fenotípicos como a fagotipagem, determinação do padrão de susceptibilidades a antimicrobianos e biotipagem têm sido usados para subtipar estirpes de *Salmonella*. Mais recentemente métodos de genotipagem como perfil plasmidial, PFGE e RAPD-PCR foram aplicados à subtipagem dos sorovares de *Salmonella* (BOPP, 1999).

Entre os métodos genotípicos destaca-se o do perfil plasmidial, que apesar de bastante utilizado, apresenta limitação inerente ao fato de que plasmídeos são elementos extra-cromossomais, não fazendo parte do genótipo cromossomal que define a estirpe hospedeira. Plasmídeos podem ser espontaneamente perdidos ou prontamente adquiridos, conseqüentemente isolados e epidemiologicamente relacionados, podendo apresentar perfis plasmidiais diferentes (ARBEIT, 1999).

Tem-se ainda, o método da tipagem de *Salmonella* Enteritidis pelo SERE (*Salmonella* Enteritidis Repeat Element) (RAJASHEKARA, 1998) que consiste em uma seqüência de oligonucleotídeos localizada na região promotora do operon *sefABCD* do genoma de *Salmonella* Enteritidis. De acordo com o mesmo autor, esta seqüência também aparece repetidas vezes no DNA cromossomal de *Salmonella* Enteritidis e em outros sorovares de *Salmonella* e com grande similaridade em outras espécies de bactérias.

2.3 Patogênese

Os eventos envolvidos na patogênese da salmonelose aviária são determinados por diversos fatores. A habilidade da bactéria em colonizar o trato gastrointestinal (TGI) parece estar relacionada com a imunidade inata da espécie hospedeira e a diversidade de genes de virulência codificados pelo patógeno (BARROW et al., 1994). Além disso, CHARLES & NAGARAJA (1994) relataram que

a severidade de infecções por *Salmonella* em aves pode ser influenciada pelas condições ambientais, grau de exposição e presença de infecções concomitantes.

Os quadros septicêmicos atribuídos à salmonela estão intimamente relacionados aos efeitos da endotoxina liberada da parede celular bacteriana. A atividade endotóxica está associada com o componente do lipídio A do lipopolissacarídeo da parede celular. Muitos sinais da septicemia pelo patógeno são similares àsquelas produzidas pela inoculação experimental de endotoxinas purificadas. Há evidências de que uma enterotoxina semelhante à enterotoxina termolábel (LT) da *E. coli* é produzida por algumas cepas de *Salmonella* sp. Tanto as enterotoxinas LT e a termoestável (ST) tem sido observadas em extratos livres de células de *S. Enteritidis* (GOMES, 2008).

As infecções causadas por *Salmonella* apresentam uma patogênese complexa. O primeiro passo no processo da doença é a transmissão da bactéria para um hospedeiro suscetível, que ocorre geralmente, pela ingestão do micro-organismo, que atravessa o trato alimentar (KRAMER, 2001).

De acordo com GOMES (2008) a patogenia da enterite por salmonela pode ser dividida em: Fase 1 - a colonização intestinal; Fase 2 - a invasão do epitélio intestinal e Fase 3 - a diarreia ou estímulo à exsoração de fluidos, sendo cada uma das fases descritas a seguir.

a) Fase 1: Colonização do intestino

Após a infecção oral, as células bacterianas podem interagir com a superfície da mucosa, alcançar a lâmina própria, camada na qual as células epiteliais estão ancoradas, constituindo o primeiro passo para se estabelecer a infecção, pois é o local do organismo onde se proliferam (VAN IMMERSEEL et al., 2005). Após isso, os organismos invadem rapidamente os tecidos dos hospedeiros, através do tecido linfóide, inclusive as placas de Peyer e, no caso das galinhas, a amígdala cecal e possivelmente também, os enterócitos da mucosa intestinal (BARROW, 1999).

DESMIDT et al. (1998) acrescentaram que o primeiro passo para o desencadeamento da infecção é a aderência da salmonela na mucosa intestinal. De acordo com ANDRADE (2005) após colonizar o intestino, as bactérias são capazes de estabelecer uma infecção sistêmica e simultaneamente a esse processo, os fagócitos iniciam a eliminação do micro-organismo.

Elas podem, também, provocar dano citotóxico à superfície da mucosa. Já os sorovares responsáveis por gastroenterite, como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, normalmente não penetram além da membrana basal da camada epitelial intestinal e a doença é auto-limitante. Todavia, em vários casos, como em indivíduos imunossuprimidos, estas bactérias podem atingir o sistema retículo-endotelial, provocando quadro clínico sistêmico (BARROW et al., 1987).

A colonização da porção distal do intestino delgado e do cólon é passo inicial e necessário na patogenia da salmonelose entérica. Bactérias fusiformes nativas, que ocupam a mucosa do epitélio intestinal geralmente inibem o crescimento das salmonelas pela produção de ácidos orgânicos voláteis. A microbiota normal também bloqueia o acesso aos sítios de ligação necessários pelas salmonelas. Sendo que fatores que rompem a microbiota normal, tais como terapia com antimicrobianos; dietas e privação de água aumentam a susceptibilidade do hospedeiro à salmonela entérica e septicêmica (GOMES, 2008).

A importância das fímbrias na ligação e colonização intestinal das

salmonelas durante a fase inicial da patogênese da enterite tem sido demonstrada em camundongos. A fímbria adere melhor na mucosa intestinal que as cepas isogênicas sem fímbrias e, portanto são mais infectantes (GOMES, 2008).

De acordo com o mesmo autor, o peristaltismo também influencia a colonização por salmonela, pois permite um supercrescimento temporário, especialmente no intestino delgado. De modo geral, o peristaltismo é estimulado por uma microbiota ativa nativa ou indígena e a supressão destas, aumentam a susceptibilidade à colonização por esse micro-organismo.

Outro fator importante é que com o pH gástrico mais elevado, os indivíduos se tornam são mais suscetíveis à infecção (DARWIN & MILLER, 1999). Pois para sobreviver no intestino delgado e ceco, a *Salmonella* também deve ser capaz de resistir aos efeitos da bile; este processo parece ser mediado por proteínas (VENKINBURGH & GUNN, 1999).

Além desses fatores, a *Salmonella* possui também, outros elementos que interferem no processo da instalação da infecção, conhecidos como fatores de virulência. Os fatores de virulência são produtos bacterianos requeridos pelo micro-organismo para produzir doença. A deleção de qualquer um deles pode resultar em redução na virulência ou na sua perda. Alguns têm sido identificados nas espécies de *Salmonella* sp., atuando em diferentes estágios da infecção (FINLAY & FALKOW, 1988). São necessários, tanto para a bactéria invadir, como para colonizar, sobreviver e multiplicar nas células do hospedeiro (SUZUKI, 1994).

A maioria dos fatores de virulência de *Salmonella* são determinados por genes cromossomais, muitos destes localizados dentro de ilhas de patogenicidade (SPI). As ilhas de patogenicidade são regiões grandes do cromossoma (10 a 200pb) que carregam um ou mais genes de virulência. Estão presentes no genoma de bactérias patogênicas, mas ausentes do genoma de representantes não patogênicos da mesma espécie ou espécie intimamente relacionada e freqüentemente estão localizadas adjacentes a genes de tRNA (SCHMIDT & HENSEL, 2004).

b) Fase 2: Invasão do epitélio intestinal

No intestino, os processos de aderência e invasão são fundamentais para o estabelecimento das infecções causadas por *Salmonella*. Antes de invadir qualquer tipo de célula, as bactérias devem encontrar e aderir a um ou mais tipos de células do intestino. Em *Salmonella* Typhimurium esse tropismo pode envolver vários tipos de fímbrias, quatro das quais foram geneticamente definidas: fímbrias tipo 1 (Fim), fímbrias codificadas por plasmídeos (PE), *long polar fimbriae* (LP) e fímbrias finas agregativas (curli). Foi sugerido que cada fímbria apresenta tropismo específico para certos tipos celulares e que desempenham uma função no recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção (DARWIN & MILLER, 1999).

Depois da invasão da *Salmonella* no epitélio intestinal, esta passa a se multiplicar intracelularmente e devido à inflamação da parede intestinal, macrófagos migram dos vasos sanguíneos para a lâmina própria. Leucócitos realizam a fagocitose, mas diferentemente de outros patógenos, este processo não elimina a *Salmonella* pela presença de substâncias antimicrobianas. Posteriormente, os macrófagos retornam ao vaso sanguíneo e dissemina a bactéria pelos órgãos internos, estabelecendo um quadro de infecção sistêmica, decorrente da hiperatividade do sistema retículoendotelial (VAN IMMERSEEL et al., 2005).

A resposta inflamatória está relacionada também com a liberação de prostaglandinas, que são estimuladoras de adenilciclase, o que resulta em um aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarreia aquosa (MIMS et al.; 2005).

A adesão de *Salmonella Typhimurium* ou *Salmonella Choleraesuis* em culturas de células provoca uma alteração na superfície da célula hospedeira, promovendo um aspecto franzido ou pregueado (ruffling), que resulta na internalização da bactéria no interior de uma vesícula endocítica. Esse processo é acompanhado por extensivo rearranjo da actina próximo ao local de invasão da bactéria. Após o engolfamento, a superfície celular e a organização da actina retornam ao normal. O processo de internalização é mediado por um grupo de genes designados *inv* que são altamente conservados em *Salmonella* (DARWIN & MILLER, 1999).

Os genes necessários para o fenótipo de invasão estão agrupados em uma região definida do cromossoma denominada ilha de patogenicidade de *Salmonella* 1 (SPI-1), que está presente em *Salmonella bongori* e em todas as subespécies e sorovares de *Salmonella enterica* já analisados. SPI-1 codifica um sistema de secreção tipo III que media a translocação de um conjunto complexo de proteínas efetoras para o interior das células eucarióticas. Um subgrupo das proteínas efetoras media a invasão de células não-fagocíticas, um processo que resulta na reorganização temporal do citoesqueleto de actina da célula hospedeira (HENSEL, 2004; SCHMIDT & HENSEL, 2004).

Tem sido demonstrado que a capacidade de invasão aumentada de algumas cepas de *S. Typhimurium* seria devido a gene codificado por plasmídio de 6-70 megadalton, entretanto, a base biológica da virulência aumentada é desconhecida (GOMES, 2008).

De acordo com GOMES (2008) a invasão das salmonelas é também, em parte, determinado pelo número e tipo de monossacarídeos especiais na cadeia de polissacarídeo. O 3,6 -dideoxihexose são encontrados somente nas salmonelas virulentas e invasivas. Sugerindo que o 3,6-dideoxihexose, de algum modo, mascara determinantes na superfície da célula que se ligam ao complemento e a ativam por meio da via alternativa. A falha na ativação do complemento seria claramente uma forma de sobrevivência das salmonelas, uma vez que reduz a chance de fagocitose.

c) Fase 3: Estímulo a exsorção de fluídos

A resposta inflamatória na mucosa intestinal é importante fator no extravasamento de fluído intestinal. Prostaglandinas são liberadas como resultado a essa resposta ativa a adenilatociclase que resulta na grande secreção de água, bicarbonatos e cloretos no lúmen intestinal. A resposta inflamatória também dispara a liberação de substâncias vaso ativas que por sua vez, aumentam a permeabilidade dos vasos da mucosa intestinal levando-os a exsorção de fluído (TOZETTO, 2006).

A invasão da mucosa é necessária, mas não suficiente para o acúmulo de líquido para causar a diarreia. É possível que enterotoxinas sejam responsáveis ou contribuam para a diarreia associada com *Salmonella* (FASANO, 1997; DARWIN & MILLER, 1999). Outra possibilidade é que a interação de *Salmonella* com o epitélio resulta não somente na invasão das células epiteliais, mas também na produção de uma variedade de moléculas sinalizadoras nas células epiteliais. A produção de interleucina-8 (IL-8) e do quimioatratador epitelial induzido por patógeno (PEEC) pelas células epiteliais estimula a inflamação e a transmigração de leucócitos através do epitélio. A produção de prostaglandinas pelos leucócitos induz um aumento na ativi-

dade da adenilatociclase nas células intestinais, inibindo a absorção do Na⁺, o aumento na secreção do Cl⁻, provoca a secreção de fluido que se manifesta como diarreia no hospedeiro (DARWIN & MILLER, 1999).

Estudos *in vitro* mostraram que a *Salmonella* induz o seu engolfamento pela célula epitelial, em um processo ativo que requer gasto de energia pela célula hospedeira (CAMPOS, 2002).

O processo da infecção por salmonelas inicia-se quando estas bactérias atingem o tecido linfóide associado ao trato digestivo ("gut-associated lymphoid tissue" - GALT) e invadem as células M da placa de Peyer (RAUPACH & KAUFMANN, 2001). Como estas bactérias não possuem mecanismo de escape, permanecem restritas ao fagolisossomo, no interior da célula hospedeira (GORVEL & MÉRESSE, 2001).

Outra característica importante de *Salmonella* é a capacidade de sobreviver no interior de fagócitos. A sobrevivência dentro de fagócitos aumenta devido à bactéria tornar-se resistente à degradação pelas enzimas lisossomiais, podendo sobreviver e multiplicar-se no ambiente ácido dos fagolisossomos (GOMES, 2008).

Estudos realizados com *Salmonella* Typhimurium mostraram que esse é um processo complexo, requerendo o envolvimento de cerca de 200 genes que incluem aqueles que auxiliam a bactéria a sobreviver à exposição às formas reativas de oxigênio, baixo pH e defensinas. A função da SPI-2 é essencial para a habilidade de *Salmonella* causar infecções sistêmicas e a proliferação nos órgãos do hospedeiro. Este fenótipo de virulência está ligado à habilidade de *Salmonella enterica* em sobreviver no interior de células fagocíticas e de se replicar dentro de vesículas que contém a bactéria em uma variedade de células eucarióticas (SCHMIDT & HENSEL, 2004).

2.3.1 Resposta imune

A eliminação do agente depende da resposta humoral e da resposta imune local no intestino, que se desenvolvem após o nascimento, sendo que a imunidade local parece ser mais efetiva na salmonelose sistêmica (DESMIDT et al., 1998).

O trato intestinal das aves é o órgão de maior responsabilidade no desenvolvimento da imunidade geral inespecífica. Diferentemente de todas as outras espécies animais, as aves não apresentam linfonodos. Seus órgãos linfóides, espalhados ao longo do trato intestinal, são as placas de Peyer, tonsilas cecais e Bolsa de Fabricius que é uma invaginação da parte final do trato digestivo. Estes tecidos captam antígenos disponibilizados no trato digestivo que estimulam as células B, precursoras de IgA e células T, presentes nas placas de Peyer, para o desenvolvimento de imunidade geral e inespecífica. Através do estímulo imunológico da mucosa, há produção de anticorpos tipo IgA que bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas na luz do trato intestinal (JIN et al., 1998).

Além de estudos dos mecanismos de defesa resultantes de infecção natural, estudos têm sido desenvolvidos com a utilização de vacinas contra salmonelas, que foram inicialmente utilizadas para controle dos quadros de pulrose (*S. Pullorum*) e tifo aviário (*S. Gallinarum*), com vacinas vivas feitas a partir de uma cepa ru-

gosa de *Salmonella* Gallinarum, de baixa patogenicidade (CARDOSO & ROCHA, 2006).

HOPKINS et al. (1995) demonstraram que *Salmonella* Typhimurium é capaz de induzir resposta sistêmica e de mucosa após única imunização por quatro diferentes vias: oral, nasal, retal ou vaginal. Além disso, as salmonelas são capazes de estimular resposta imunológica via complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, após atravessarem as células M da mucosa intestinal (WEISS & KRUSCH, 2001). Os antígenos apresentados por estas duas classes de MHC são reconhecidos respectivamente por células T CD8⁺ e CD4⁺ (YRLID et al., 2001).

Desde o seu desenvolvimento, as linhagens atenuadas de *Salmonella* têm sido caracterizadas como organismos para expressão de antígenos heterólogos (GARMORY et al., 2002). Isso permitiu que a utilização de imunógenos vivos atenuados extrapolasse o problema das salmoneloses, uma vez que se tornou possível o uso destas bactérias como carreadoras de antígenos vacinais (ALMEIDA et al., 2002).

O mecanismo de defesa do lipopolissacarídeo (LPS) mostrou ser capaz de elicitar uma resposta de hipersensibilidade retardada semelhante aquela elicitada pela imunização com doses subletais de organismos vivos. Entretanto, o antígeno deve ser incorporado em lipossomas para o efeito de hipersensibilidade retardada ocorrer. Como exemplo, estudos da principal proteína da membrana externa da *S. Typhimurium* mostrou que ela deve ser misturada com o LPS para induzir a síntese de anticorpos protetores (GOMES, 2008).

Desta maneira, segundo o mesmo autor, os anticorpos humorais são direcionados contra o antígeno da cadeia O do LPS e contra a proteína da membrana externa. Anticorpos O são aglutinantes se eles são do isotipo IgM. Eles podem instigar bacteriólise pela fixação do complemento protetores.

Anticorpos para a proteína de membrana embora não sorovar específico podem atuar como opsoninas (ação protetora). Anticorpos para o core de glicolipídio (2 ceto-3 deoxioctonato-lipídio A) do LPS são efetivos na neutralização do efeito endotóxico do LPS da salmonela. Este efeito pode ser expresso em todas as infecções por bactérias Gram negativas no qual o mesmo core glicolipídio esteja envolvido protetores (GOMES, 2008).

Uma observação importante no estudo de respostas imunes do organismo das aves à *Salmonella*, é que no caso das infecções por *Salmonella* Enteritidis é que, quando este sorovar está presente num lote de aves, outros normalmente encontrados, desaparecem. Podendo postular que a infecção por *Salmonella* Enteritidis possui um excelente mecanismo de resistência às outras salmonelas em aves (CARLI, 2006).

Embora não dominado para efeitos práticos, sabe-se que as aves apresentam mecanismo de resistência genética às salmonelas. Linhagens resistentes a *Salmonella* Enteritidis também o são à *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium* (BARROW, 2000).

2.4 Métodos de diagnóstico

Um diagnóstico definitivo e eficaz para pulorose, tifo aviário e paratifo aviário está baseado no isolamento, identificação e tipificação sorológica da *Salmonel-*

la. Contudo, ele deve ser complementado pelo histórico, sinais clínicos, lesões e dados epidemiológicos (MACHADO, 2000; OLIVEIRA, 2004).

Além dos métodos para diagnosticar a doença clínica, são utilizados métodos para detectar aves portadoras inaparentes. Merecem destaque, os testes sorológicos que têm sido desenvolvidos para detectar anticorpos para *Salmonella* e os que identificam e isolam o agente através das técnicas de microbiologia convencional, diagnóstico molecular e imunoistoquímica (REVOLLEDO, 2009).

A escolha do procedimento laboratorial adequado é um pré-requisito essencial para o isolamento de qualquer micro-organismo, pois sabe-se que há diversos fatores que podem afetar os resultados no isolamento e identificação de agentes infecciosos (ALBUQUERQUE et al., 2000).

a) Testes sorológicos:

Entre os exames laboratoriais mais utilizados para isolar *Salmonella*, pode-se citar os testes sorológicos: hemoaglutinação ou soroaglutinação rápida em placas (SAR), teste de soroaglutinação lenta e ensaio imunoenzimático (EIE ou ELISA) (OLIVEIRA, 2004).

Esses testes permitem avaliar tanto títulos para antígenos somáticos como flagelares. Entretanto, eles apresentam limitações, pois muitos animais infectados não desenvolvem os anticorpos, pois o soro foi colhido muito cedo ou a infecção não foi severa o suficiente para estimular uma resposta imune ou ainda, o animal não respondeu ao estímulo (ALVAREZ et al., 2004). Isto também é possível quando os animais transferem passivamente os organismos ao longo do intestino sem desenvolver resposta imune, gerando assim, a necessidade de estudar outras técnicas de diagnóstico mais precisas (FAKHR et al, 2005).

Para o diagnóstico de portadores da pulrose, usa-se o teste de hemoaglutinação efetuado no próprio aviário, usando antígeno de laboratório idôneo controlado com soros positivos e negativos no momento da execução da prova. Entretanto, ressalta-se, que esse teste pode apresentar resultados falso-positivos, devido ser um teste de baixa especificidade e falso-negativos em consequência, também, da baixa sensibilidade (GAST & BEARD, 1990).

Do mesmo modo, pode-se realizar entre estas técnicas a soroaglutinação rápida (SAR), em que se utiliza o soro sanguíneo para detecção de soroaglutininas, tanto em tubo quanto em lâmina ou pela aglutinação de sangue total em lâmina. O teste de lâmina positivo oferece a mesma interpretação. O antígeno nesse teste é uma suspensão pesada e corada de *Salmonella*. Para detecção de anticorpos existe também, o teste de microaglutinação, sendo este teste mais eficaz na detecção de títulos baixos de anticorpos. Sendo que anticorpos podem ser detectados na gema do ovo das aves infectadas (BAUDART et al., 2000; RASSCHAERT et al., 2005).

Outro teste sorológico bastante utilizado é o ELISA, no qual a detecção de IgG anti-*Salmonella* em monitoramentos sorológicos de infecções naturais ou experimentais (HASSAN et al., 1990) também tem sido amplamente empregado devido sua sensibilidade e simplicidade na sua utilização (BARROW, 2000).

Na técnica imunológica de ELISA, empregam-se anticorpos policlonais ou monoclonais marcados com uma enzima, normalmente cromogênica. Essa enzima funciona como um revelador da ocorrência da ligação do antígeno com o anticorpo específico. Pois, ao se adicionar ao sistema o substrato dessa enzima, há o desenvolvimento de cor. Nos vários trabalhos conduzidos para investigar a possibilidade

do emprego da técnica imunoenzimática para detectar *Salmonella* em aves, verificou-se que essa técnica, apresentou alta especificidade e/ou sensibilidade (FELDSI-NE, 1993).

b) Bacteriologia convencional

A técnica microbiológica convencional é recomendada pelo MAPA (BRASIL, 2003). Sendo que, após a identificação da bactéria pelos testes bioquímicos e sorológicos, a cepa deve ser determinada em laboratório de referência para proceder a sorotipagem (BOPP et al., 1999).

As técnicas convencionais para detecção de *Salmonella* envolvem um grande número de etapas e o tempo para obtenção de resultados é muito longo, daí a principal explicação de muitas pesquisas estarem sendo realizadas visando a introduzir metodologias rápidas e sensíveis para enfrentarem a agilidade que o mercado atual exige (REIS, 2001).

c) Imunoistoquímica

Os exames imunoistoquímicos também estão sendo cada vez mais utilizados na rotina diagnóstica de enfermidades em várias espécies de animais domésticos, inclusive nas aves (SUSTER et al., 2000). Esse crescimento pode ser evidenciado pelo crescente número de laboratórios de patologia que utilizam essa técnica em suas rotinas diagnósticas, bem como pelo crescente volume de trabalho desses laboratórios com o passar dos anos (ALVES et al., 1999).

O uso de imunoistoquímica, como método de diagnóstico, se deve a alguns fatores, entre eles, a necessidade, cada vez mais presente de diagnósticos precisos para determinar tratamento e prognóstico; um número crescente de anticorpos disponíveis para o uso em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina; a disseminação da técnica, com vários avanços, um deles de fundamental importância, a assim chamada técnica de recuperação antigênica (sistemas de recuperação de epítomos através do calor – radiação ou calor úmido) e principalmente, a disseminação da idéia de que o exame imunoistoquímico poderá resolver possíveis dúvidas diagnósticas (GOWN & BACH, 2005).

A imunoistoquímica é considerada um recurso diagnóstico seguro e eficiente para a identificação de constituintes teciduais ou celulares através da interação antígeno-anticorpo. Tais anticorpos marcados através de sua conjugação com enzimas ou substâncias fluorescentes permitem localizar determinantes antigênicos em tecidos fixados e processados por métodos convencionais (AVRAMEAS, 1970).

HAANWINCKEL et al. (2004) confirmaram a sensibilidade, especificidade, a praticidade no processamento, bem como elevada estabilidade dos reagentes utilizados na técnica de imunoistoquímica. Credenciaram então, como um método de fácil execução e que demanda pouco tempo de preparação, portanto, com possibilidade de introdução na rotina diagnóstica.

d) Testes moleculares

A partir da década de 70, estudos de hibridização de DNA demonstraram que as estirpes de *Salmonella* formam um único grupo de hibridização de DNA, com sete subgrupos (EUZÉBY, 1999). Posteriormente, análises de eletroforese de enzimas multilocus confirmaram a existência de subgrupos consistentes com aqueles

baseados em hibridização de DNA, com uma exceção, o que levou à criação da espécie *Salmonella bongori* (BOYD et al., 1996).

Apesar do sucesso na utilização das técnicas de hibridização de DNA, após o surgimento das técnicas de amplificação do ácido nucléico, sua utilização na veterinária diminuiu e ficou restrita a laboratórios de pesquisa. As técnicas de amplificação podem ser aplicadas em amostras clínicas, contendo pequenas quantidades de micro-organismos, com alta sensibilidade e especificidade, apresentam maior segurança e menor custo, uma vez que não utilizam radioisótopos ou marcadores enzimáticos (MORENO, 2009).

De acordo com OYARZÁBAL (1996) a amplificação do DNA pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) é a técnica de maior aceitação entre as demais técnicas moleculares desenvolvidas recentemente (BAILEY & COX, 1996). Apresenta como vantagens, a velocidade e facilidade de sua utilização; a sensibilidade, pois é capaz de amplificar seqüências a partir de discretas quantidades do DNA-alvo e até mesmo do DNA de uma única célula (LI et al., 1988); e robustez, ou seja, por permitir a amplificação de seqüências específicas a partir de material que está gravemente degradado em um meio onde o isolamento de DNA é problemático (READ, 2002).

Outras vantagens das provas moleculares incluem a elevada especificidade e sua utilização para detectar um gene ou seqüência de ácidos nucléicos de um organismo particular ou de um grupo de organismos, o uso para detectar e identificar organismos sem a necessidade de cultivo e isolamento em cultura pura, descartando a subjetividade dos testes microbiológicos; serem designadas e usadas para detectar organismos específicos ou grupos taxonômicos amplificados, como é o caso de provas de regiões alvo da molécula de RNA ribossômico (rRNA) com diferentes níveis de variabilidade (COUTINHO et al., 1999).

Além disso, a PCR permite a replicação *in vitro* de seqüências definidas de DNA, não sendo necessário, para isto, conhecer a estrutura completa do DNA alvo, mas apenas aquelas que flanqueiam a região a ser amplificada, definida como primers ou iniciadores, que hibridizam com estas regiões (MULLIS et al., 1986). Segundo COHEN et al. (1994), devido ao fato da PCR detectar uma região única de um genoma bacteriano, a técnica demonstra maior especificidade quando comparada com os métodos microbiológicos tradicionais.

A seleção das seqüências que flanqueiam os segmentos de DNA que se pretende amplificar por PCR é um ponto crítico da técnica. A especificidade da PCR decorre da precisão com que os iniciadores desempenham esta tarefa, ou seja, hibridizam com o DNA alvo. Para a detecção de salmonelas, a região escolhida deve ser comum a maioria das cepas, codificar para proteínas com importância na patogenicidade da bactéria e não apresentar homologia com outros micro-organismos, o que poderia fornecer resultados falso-positivos (STONE et al., 1994).

BAUMLER et al. (1997) relataram vários iniciadores utilizados para detecção de salmonelas, como *invA*, *agfA*, *IS200*, *hin*, *H-li*, *iagAB*, *spvR*, *viaB*, *mkfA*, *ompC*, *oriC*, e cita como principal diferença entre eles a especificidade. Por exemplo, o gene *invA* estaria presente nas espécies enterica e bongori, enquanto *iagAB* identificaria apenas os sorovares enterica subespécie I.

GALAN et al. (1992) efetuaram a caracterização molecular de um dos genes de invasão de *Salmonella* e identificaram um *locus* genético, denominado *inv*, como o primeiro de um *operon* de genes arranjados na mesma unidade transcricio-

nal, que codificaria proteínas relacionadas com penetração celular, sendo considerado um componente essencial para a patogênese da doença. Os grupos de genes *inv*, denominados A, B, C, D e E estão presentes na maioria das salmonelas e ausentes na região correspondente de *E. coli*, sendo considerados hábeis para distinguir entre *Salmonella* e outras espécies bacterianas através de hibridização com sondas específicas ou amplificação por PCR.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das medidas de biossegurança empregadas na indústria avícola, essa enfermidade continua sendo responsável por perdas econômicas tanto para a avicultura, por causar severos quadros septicêmicos e entéricos, com redução da produção, como também, freqüentes problemas de saúde pública.

Embora sua ocorrência tenha diminuído nos últimos anos, é ainda um dos patógenos bacterianos mais comuns, em doenças transmitidas por alimentos de origem avícola para os seres humanos. Além do que, o controle e a prevenção sanitária são requisitos fundamentais para garantir à avicultura brasileira o mercado internacional para seus produtos, pois, a presença de bactérias, como a *Salmonella* sp. em produtos de origem animal pode representar barreira sanitária ao comércio de produtos avícolas.

O estudo da *Salmonella* permite uma melhor caracterização do patógeno, pois a identificação e caracterização molecular do micro-organismo são importantes ferramentas nos laboratórios de doenças de aves e de saúde pública. Além disso, podem também, auxiliar na identificação da fonte de contaminação, no controle de surtos e levar a uma redução nas taxas de transmissão.

Sabe-se que, a atual posição mundial do Brasil na produção de frangos, não se deve somente ao preço, mas também a qualidade sanitária dos seus produtos, que atende um mercado consumidor cada vez mais exigente.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C.I . Estudo comparativo de diferentes meios de cultura para o isolamento de *Salmonella* em matérias-primas e rações. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.1, p. 56-64, 2000.

ALMEIDA, M. E. S. *Salmonella* vacinais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 25, p. 22-26, 2002.

ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A. B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Development of a Multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1734-1738, 2004.

ALVES, V. F. A.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. Editores. Manual de Imunoistoquímica. **Sociedade Brasileira de Patologia**, p.1-270, 1999.

ANDRADE, M. A. **Inoculação de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 4 em ovos embrionados de duas linhagens de frango de corte.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005. 110 p.

ARBEIT, R. D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganism. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7 ed. Washington, ASM Press, p.116-137, 1999.

AVRAMEAS, S.; GONATAS, N. K. Detection of plasma membrane carbohydrates with lectin peroxidase conjugates. **The Journal of Cell Biology**, v. 59, p. 436-443, 1970.

BACK, A. **Manual de doenças das aves**. Cascavel-PR, p. 62-78, 2002.

BACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J. A. Monitoria e controle de *Salmonella*: aspectos práticos. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. **Anais...** Embrapa Suínos e Aves, p. 95-103, 2006.

BAILEY, J.S., COX, N.A. Detecting specific *Salmonella* strains. **World Poultry, Special for *Salmonella***. Netherlands, p.18-19, 1996.

BARROW, P. A., HUGGINS, M. B., LOVELL, M. A. Host specificity of *Salmonella* infectious in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and Immunity**, n. 62, p. 4602-4610, 1994.

BARROW, P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A.; BINNS, M. Contribution of *Salmonella Gallinarum* Large Plasmid toward Virulence in Fowl Typhoid. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 2, p. 388-392, 1987.

BARROW, P. A.; WALLIS, T. S. Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In: WRAY, C. (Ed.) ***Salmonella in domestic animals***. CAB International, Oxford, England, p. 323-339, 2000.

BARROW, P. A. *Salmonella* infections in poultry – problems and new thoughts on the possibilities of control. **Brazilian Journal Poultry Science**, v. 1, n. 1, p. 9-16, 1999.

BAUDART, J.; LEMARCHAND, K.; BRISABOIS, A.; LEBARON, P. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 66 p. 1544-1552, 2000.

BERCHIERI JR., A. Salmoneloses Aviárias. In: **Doenças das Aves**, FACTA, Campinas – SP, p. 185-196, 2000.

BERCHIERI JR., A; OLIVEIRA, G. H. Salmoneloses Aviárias. In: **Saúde Aviária e Doenças**, ROCA, São Paulo – SP, p. 84-111, 2007.

BOPP, C.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCPBINE, N. *Escherichia, Salmonella and Shigella*. In: BOPP, C.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCPBINE, N. **Manual Clinical of Microbiology**. Washington, D.C. ASM, p. 459-474, 1999.

BOYD, F. E.; WANG, F.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Molecular genetic relationships of the *Salmonellae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 804-808, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003, que institui o Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. Brasília: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2003.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of clinical Microbiology**, v. 38, n.7, p. 2456-2467, 2000.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, A. Electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 313-320, 2002.

CARDOSO, B.; ROCHA, L. C. Controle de salmonelas em avicultura através do uso de vacinas. V Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM. **Anais...** Santa Maria, RS, p. 95-98, 2006.

CARLI, E. M.; FRIES, L. M.; TERRA, N. M.; FLORES, M. L.; PADILHA, A. D.; CAMPAGNOL, P. C.; VEIT, D.; FURTADO, A.; SANTOS, B. Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico no controle de *Salmonella* Enteritidis na indústria avícola. **Revista Nacional da Carne**, n. 357, p. 22-32, 2006.

CDC- Centers for disease control. *Salmonella* surveillance: Annual summary, 2004. Atlanta, Georgia: United States. Department of Health and Human Services, CDC, 2005.

CDC- Centers for disease control. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2003. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2004.

CHARLES, S. D.; NAGARAJA, K. V. Adjuvanted subunit vaccines for the control of *Salmonella* Enteritidis infection in turkeys. **American Journal of Veterinary Research**, Estados Unidos, v. 55, n. 5, p. 636-642, 1994.

COHEN, N. D.; McGRUDER, E. D.; NEIBERG, H. L.; BEHLE, R. W.; WALLIS, D. E.; HARGIS, B. M. Detection of *Salmonella* enteritidis in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the Genus *Salmonella*. **Poultry Science**, v. 73, p. 354-357, 1994.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M. MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S.; Evaluating the Microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **An. Acad. Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 71, p. 491-503, 1999.

COX , N. A., BERRANGE, M. E., CASON, J. A. *Salmonella* penetration of eggs shells and proliferation in broiler hatching eggs. **Poultry Science**, v. 79, n.11, p. 1571-1574, 2000.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. **Clinical and Microbiology Revision**, 12: 405-428, 1999.

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

EUZÉBY, J. P. LE MINOR, A. C.; POPOFF, C. S.; WELDIN, A.; SCHROETER, J. M.; WARREN, B. D.; SCOTT, G. L. Request for an opinion. **International Journal System Bacteriology**, v. 49, p. 927-930, 1999.

FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K.; LOGUE, C. M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2215-2219, 2005.

FARBER, J. M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **J. Food Prot.**, v. 59, p. 1091-1101, 1996.

FASANO, A. Cellular microbiology: how enteric pathogens socialize with their intestinal host. **ASM News**, v. 63, p. 259-265, 1997.

FELDSINE, P. T.; FALBO-NELSON, M. T.; HUSTEAD, D. L. Polyclonal enzyme immunoassay method for detection of motile and non-motile *Salmonella* in foods: Collaborative study. **Journal Association Official Analytical Chemistry Institute**, v. 76, n. 3, p. 694-697, 1993.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Virulence factors associated with *Salmonella* species. **Microbiology. Science**, v. 5, n. 11, p. 325-328, 1988.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 33-81, 1996.

FRIEDMAN, A. BAR-SHIRA; E, SKLAN. Ontogeny of gut associated immune competente in the chick. **World's Poultry Science Journal**, v. 59, n. 2, p. 209-219, 2003.

GALAN, J. E.; GINICHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. **Journal Bacteriology**, v. 174, p. 4338-4340, 1992.

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

GARMORY, H.; BROWN, K.; TITBALL, R. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. **FEMS Microbiology Rev.**, Amsterdam, v.26, p.339-353, 2002.

GAST, R. K., BEARD, C. W. Production of *Salmonella enteritidis* contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Diseases**, v. 34, p. 438-446, 1990.

GOMES, M. J. P. ENTEROBACTERIÁCEAS (*Salmonella spp*). BACTERIOLOGIA DA FAVET – UFRGS. Laboratório de Análises clínicas veterinárias. Microbiologia Clínica, 2008. Disponível em: www.ufrgs.br/labacvet. Acessado em: 25/09/2008.

GORVEL, J. P.; MÉRESSE, S. Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. **Microbes Infectious**, Paris, v.3, p.1299-1303, 2001.

GOWN A. M.; BACCHI C. E. United States and Canadian Academy of Pathology. Educational Materials. Short Courses. **Diagnostic Immunohistochemistry of Solid Tumors**, p. 102-132, 2005.

GUINEE, W. J.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Phage typing of *Salmonella*. In: T. BERGEN J.R.; NORRIS (Editors), *Methods in Microbiology*, **Academic Press**, London, p. 157-162, 1978.

HAANWINCKEL, B. S (1978). Avaliação da prova de imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal, **Arquivo do Instituto de Biologia**. São Paulo, v. 71, n. 3, p. 293-301, 2004.

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

HOPKINS, S. A recombinant *Salmonella* Typhimurium vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. **Infectious Immunology**, Washington, DC, v.63, n.9, p.3279-3286, 1995.

JIN, L. Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, v.77, p.1259-1265, 1998.

KAUFMANN, S.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes Infectious**, Paris, v.3, p.1177-1181, 2001.

MACHADO, J. N. Tendências atuais e futuras no uso de colonizadores bacterianos intestinais na avicultura industrial. In: Encontro Internacional de Ciências Aviárias, 4, 2000. Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: FAMEV- UFU, p. 18-27, 2000.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, 728 p.

MORENO, A. M. Técnicas moleculares de diagnóstico. In: Patologia Aviária, Manole, Barueri – SP, p. 413-427, 2009.

MULLIS, K. B.; FALLONA, F. Specific Synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. **Methodology Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1986.

OLIVEIRA, W. F. Isolamento e tipificação de *Salmonella* da cadeia produtiva de frango de corte da região metropolitana de Fortaleza-CE. Ceará. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. 2004, 104 p.

OYARZÁBAL, O. A. Técnicas moleculares para o diagnóstico de patógenos aviários. **Avicultura Profissional**, v.14, n.16, p.19-21, 1996.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRICKX, M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 3615-3623, 2005.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. E. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to chose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? **Microbes Infect.**, Paris, v.3, p.1261-1269, 2001.

READ, S. C., IRWIN, R. J., POPPE, C., HARRIS, J. A comparison of two methods for isolation of *Salmonella* from poultry litter samples. **Poultry Science**, v. 73, p. 1617-1621, 2002.

REIS, R. B.; MAMIZUKA, E. M.; GOMBOSSY, B. D.; FRANCO, B. D. G. M. Produção de imunorreagentes para uso em um teste imunoenzimático de detecção de *Salmonella* em alimentos. **Ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas, v. 21, n. 3, p. 261-266, 2001.

REVOLLEDO, L. Pulorose. In: Patologia Aviária, Manole, Barueri – SP, p. 124-128, 2009.

REZENDE, C. S. M. **Ácidos Orgânicos em Rações experimentalmente contaminadas com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium**. Goiânia, 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. 94 p.

RODRIGUES, D. P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e materiais avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS. **Anais...** Campinas: FACTA, v.2, p. 223-228, 2005.

SAVAGE, D. C. The effect of stress, diet and environment on the stability of the gastrointestinal microflora. In: Normal and induced changes in the gastro-intestinal microflora in man and animals with special regard to animal performance, n.33, 1980. Oslo. **International Symposium**, Oslo, p. 23-31, 1980.

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

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 2959-2965, 2004.

SILVA, P. L. Segurança alimentar e legislação na produção. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. Chapecó-SC. Embrapa Suínos e Aves, p. 34-40, 2006.

SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, p. 415-428, 2001.

SPOLAORE, A. J. G. **Prevalência de *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos de suínos abatidos na região oeste do Paraná e potencial de disseminação em bandejas, facas e luvas de manipuladores durante a inspeção post-mortem.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. 59 p.

STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; McVEY, S.; GALLAND, J.; CURTSS, R.; KELLY, S. M.; CHEMGAPPA, M. Detection of *S. Typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1292-1295, 1994.

SUSTER, S.; MORAN, C. A.; WICK, B. Seminars in Diagnostic Pathology. **Immunohistochemistry in Tumor Diagnosis**, v. 17, n.3, p. 169-256, 2000.

SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 21, p. 89-105, 1994.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G. M. Molecular typing methods. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications.** Washington, D.C., ASM Press, p. 26-50, 1993.

TOZETTO, S. M. Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella enterica* no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004. Dissertação. Universida-

de Federal do Paraná. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. 83 p.

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, I.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P.A. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiology. Infectious**, v. 133, n. 6, p. 959-978, 2005.

VENKINBURGH, J. C. V.; GUNN, J. S. PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. **Infections Immunologic**, v. 67, p. 1614-1622, 1999.

WEISS, S.; KRUSCH, S. Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids into mammalian host cells. **Biol. Chem.**, Berlin, v. 382, p. 533-541, 2001.

YRLID, U. Antigen-presenting cells and anti-*Salmonella* immunity. **Microbes Infect.**, Paris, v. 3, p. 1239-1248, 2001.