

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DETECÇÃO DOS GENES *spvC* E *prot6E* E AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE  
*Salmonella* sp. EM POEDEIRAS COMERCIAIS

Samantha Verdi Figueira  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA  
2019



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS  
DE TESES E  
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**      ☐ Dissertação      ☒ Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

Nome completo do autor: Samantha Verdi Figueira

Título do trabalho: DETECÇÃO DOS GENES *spvC* E *prot6E* E AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE *Salmonella* sp. EM POEDEIRAS COMERCIAIS

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM      ☐ NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 27 / 08 / 19

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

SAMANTHA VERDI FIGUEIRA

**DETECÇÃO DOS GENES *spvC* E *prot6E* E AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE  
*Salmonella* sp. EM POEDEIRAS COMERCIAIS**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Ciência Animal junto à Escola de  
Veterinária e Zootecnia da Universidade  
Federal de Goiás

**Área de concentração:**

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de  
alimentos

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Andrade –  
EVZ/UFG

**Comitê de orientação:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Silva Minafra e Rezende –  
EVZ/UFG

Dr<sup>a</sup>. Dunya Mara Cardoso Moraes – SUPER  
FRANGO

GOIÂNIA

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Verdi Figueira, Samantha

DETECÇÃO DOS GENES *spvC* E *prot6E* E AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE *Salmonella* sp. EM POEDEIRAS COMERCIAIS [manuscrito] / Samantha Verdi Figueira. - 2019. XC, 90 f.: il.

Orientador: Prof. Maria Auxiliadora Andrade; co-orientador Cíntia Silva Minafra e Rezende; co-orientador Dunya Mara Cardoso Moraes.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Genes de virulência. 2. Ovos. 3. Postura. 4. Sorovares. I. Andrade, Maria Auxiliadora, orient. II. Título.

CDU 639.09

ATA NÚMERO 269 DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR Samantha Verdi Figueira. Às 14h00min do dia 06/03/2019, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) Samantha Verdi Figueira, intitulada "Detecção dos genes *spvC* e *prot6E* e avaliação da infecciosidade de *Salmonella sp.* em poedeiras comerciais", apresentada para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos desta Universidade. O (A) Presidente da Comissão Julgadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Andrade, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) Samantha Verdi Figueira para exposição em quarenta minutos do seu trabalho. A seguir, o (a) senhor (a) Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de vinte minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Andrade

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Marques Faria

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Rodrigues Taveira Rocha

Prof. Dr. José Henrique Stringhini

Prof. Dr. Weslen Fabricio Pires Teixeira

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) Samantha Verdi Figueira, habilitada [(Habilitado (a) ou não Habilitado (a)] pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):



ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



33

34

35

36

37

38 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

39

40

41

42

43

44

45 Nada mais havendo a tratar, eu, **Prof.ª Dr.ª Maria Auxiliadora Andrade**, lavrei a presente ata que,  
46 após lida e achada conforme, foi por todos assinada.

47 Prof.ª Dr.ª Maria Auxiliadora Andrade

48 Prof.ª Dr.ª Adriana Marques Faria

49 Prof.ª Dr.ª Fernanda Rodrigues Taveira Rocha

50 Prof. Dr. José Henrique Stringhini

51 Prof. Dr. Weslen Fabricio Pires Teixeira

*[Handwritten signatures of the five members of the Examining Board]*

*DEDICO*

*À minha família querida, minha mãe Maria Ivany e ao meu irmão Theo. Só o amor constrói pontes indestrutíveis.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre e diariamente a Deus pela vida, saúde e pelo privilégio da realização de um sonho.

À minha família por todo amor, companheirismo e apoio, a minha mãe Maria Ivany do Nascimento Verdi Figueira e meu irmão Theo Verdi Figueira. Ao meu falecido pai Wilson Verdi Figueira Filho, que sempre incentivou o estudo e a dedicação. É por vocês e por causa de vocês que hoje posso viver essa felicidade.

À minha orientadora Maria Auxiliadora Andrade, por absolutamente tudo, a disponibilidade, confiança, paciência, tolerância, broncas, carinho e amizade. Obrigada por ser meu maior exemplo de profissionalismo e caráter.

Aos meus co-orientadores Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Silva Minafra e Rezende e em especial a Dr<sup>a</sup> Dunya Mara Moraes pela disponibilidade, auxílio e amizade ao longo desses anos. Aos professores do programa de pós-graduação em ciência animal, que tive o privilégio de conviver. Em especial, ao Prof. Dr Marcos Barcellos Café pela sua disposição e ajuda, e aqueles que contribuíram para realização dessa pesquisa, professores Dr<sup>a</sup>. Nadja Susana Mogyca Leandro e Dr. José Henrique Stringhini.

Às queridas companheiras do laboratório de bacteriologia e do setor de Preventiva, Maria Auxiliadora Leão e Nazaré. Aos companheiros de pós-graduação: Adriana, Amanda, Angélica, Thaís e Thiago. Agradeço em especial a minha amiga Ana Maria, que ao longo desse período se tornou uma verdadeira irmã.

Aos meus amigos que me inspiram todos os dias: Arthur, Emannuela, Gabriela, Jaime, Nicolás e Tainá. Pelo carinho e paciência.

À Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, que tem sido minha segunda casa ao longo destes 12 anos, desde o começo da graduação em 2007. A Capes pelas bolsas de doutorado e de doutorado sanduíche. A Universidade da Geórgia, ao PDRC e ao professor John Maurer por me receberem.

Muito obrigada!



## SÚMARIO

|                                                                                                                                          |                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....                                                                                                 | 1                                    |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                      | 1                                    |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....                                                                                                            | 2                                    |
| 2.1 <i>Salmonella enterica</i> .....                                                                                                     | 2                                    |
| 2.2 Genes de virulência de <i>Salmonella</i> .....                                                                                       | 4                                    |
| 2.2.1 Genes plasmidiais de virulência.....                                                                                               | 5                                    |
| 2.3 Mecanismos de defesa das aves e dos ovos .....                                                                                       | 7                                    |
| 4. REFERÊNCIAS.....                                                                                                                      | 10                                   |
| CAPÍTULO 2. DETECÇÃO DE GENES PLASMIDIAIS EM SOROVARES DE <i>Salmonella enterica</i><br>PROVENIENTES DE AMOSTRAS DA CADEIA AVÍCOLA ..... | 16                                   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                      | 17                                   |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                              | 18                                   |
| 2.1. Local e período.....                                                                                                                | 18                                   |
| 2.2. Amostragem .....                                                                                                                    | 18                                   |
| 2.3. Extração do DNA.....                                                                                                                | 19                                   |
| 2.4. Detecção dos genes por PCR em tempo real.....                                                                                       | 20                                   |
| 2.5. Análises estatísticas.....                                                                                                          | 20                                   |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                          | 21                                   |
| 3.1 Resultados .....                                                                                                                     | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 3.2 Discussão.....                                                                                                                       | 21                                   |
| 3.2.1 Detecção do gene <i>spvC</i> .....                                                                                                 | 21                                   |
| 3.2.2 Detecção do gene <i>prot6E</i> .....                                                                                               | 24                                   |
| 4. CONCLUSÕES.....                                                                                                                       | 26                                   |
| 5. REFERÊNCIAS.....                                                                                                                      | 27                                   |
| CAPÍTULO 3. INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE <i>Salmonella GALLINARUM</i> COM E SEM O<br>GENE <i>spvC</i> EM EMBRIÕES E NEONATOS POSTURA ..... | 31                                   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                      | 33                                   |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                              | 34                                   |
| 2.1 Local.....                                                                                                                           | 34                                   |
| 2.2 Caracterização do isolado.....                                                                                                       | 34                                   |
| 2.3 Protocolo de inoculação .....                                                                                                        | 34                                   |
| 2.4 Delineamento experimental.....                                                                                                       | 35                                   |
| 2.5 Variáveis estudadas .....                                                                                                            | 36                                   |
| 2.5.1 Embriodiagnóstico .....                                                                                                            | 36                                   |
| 2.5.2 Relação entre o peso do neonato e o peso do ovo.....                                                                               | 36                                   |
| 2.5.3 Qualidade do neonato.....                                                                                                          | 36                                   |
| 2.5.4 Avaliação clínica e anatomopatológica.....                                                                                         | 37                                   |

|                                                                                                                          |                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 2.5.5 Biometria dos órgãos das aves necropsiadas.....                                                                    | 38                                   |
| 2.5.6 Pesquisa de <i>Salmonella</i> Gallinarum nos órgãos.....                                                           | 38                                   |
| 2.6 Análises estatísticas.....                                                                                           | 38                                   |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                          | 39                                   |
| 4. CONCLUSÃO .....                                                                                                       | 46                                   |
| 5. REFERÊNCIAS.....                                                                                                      | 47                                   |
| CAPÍTULO 4. INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE <i>Salmonella</i> HEIDELBERG COM GENE <i>prot6E</i> EM POEDEIRAS COMERCIAIS ..... | 51                                   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                      | 52                                   |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                              | 53                                   |
| 2.1 Local.....                                                                                                           | 53                                   |
| 2.2 Caracterização do isolado de <i>Salmonella</i> .....                                                                 | 53                                   |
| 2.3 Delineamento experimental.....                                                                                       | 53                                   |
| 2.4 Preparação do inóculo .....                                                                                          | 54                                   |
| 2.5 Manejo das aves .....                                                                                                | 54                                   |
| 2.6 Pesquisa de <i>Salmonella</i> Heidelberg .....                                                                       | 54                                   |
| 2.7 Avaliação clínica.....                                                                                               | 55                                   |
| 2.8 Análises estatísticas.....                                                                                           | 55                                   |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                          | 55                                   |
| 3.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> Heidelberg .....                                                                      | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 3.1.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> Heidelberg nas excretas .....                                                        | 55                                   |
| 3.1.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> Heidelberg nos ovos .....                                                            | 58                                   |
| 3.2. Avaliação clínica.....                                                                                              | 62                                   |
| 4. CONCLUSÃO .....                                                                                                       | 63                                   |
| 5. REFÊRENCIAS.....                                                                                                      | 64                                   |
| CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                                                   | 69                                   |
| ANEXO Parecer de Aprovação no Comitê de Ética.....                                                                       | 71                                   |

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

|                                                                                                                                                       |   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| FIGURA 1 - Esquema representativo da contaminação de ovos por <i>Salmonella</i> .....                                                                 | 4 |
| FIGURA 2- Representação esquemática do cromossomo de <i>Salmonella enterica</i> . Ilhas de patogenicidade (SPI), plasmídeo e genes de virulência..... | 5 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1- Detecção dos genes <i>spvC</i> e <i>prot6E</i> em isolados de sorovares de <i>Salmonella</i> identificados de órgãos e ovos de aves ..... | 21 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO 3

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1- Mortalidade embrionária das aves dos tratamentos inoculados na câmara de ar com 19 dias de incubação (T7, 8 e 9) .....                                                                       | 39 |
| TABELA 2- Relação entre os pesos dos neonatos e pesos dos ovos dos tratamentos inoculados na câmara de ar.....                                                                                         | 40 |
| TABELA 3- Qualidade dos neonatos dos tratamentos inoculados na câmara de ar.....                                                                                                                       | 40 |
| TABELA 4- Pesquisa de <i>Salmonella Gallinarum</i> no coração, baço, fígado e ceco das aves com 28 dias de vida, distribuídos entre os tratamentos inoculados na câmara de ar e via oral .....         | 41 |
| TABELA 5- Relação entre o peso em gramas da ave e dos órgãos coração, baço, fígado, intestino e comprimento do intestino, distribuídos entre os tratamentos inoculados na câmara de ar e via oral..... | 42 |

### CAPÍTULO 4

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1- <i>Salmonella</i> Heidelberg recuperada com 12 horas após a inoculação por diferentes vias de infecção.....                                          | 55 |
| TABELA 2- <i>Salmonella</i> Heidelberg na casca, albúmen e gema de ovos aos 12, 24 e 48 horas, sete e 15 dias após a inoculação experimental em poedeiras..... | 58 |
| TABELA 3- <i>Salmonella</i> Heidelberg na casca, albúmen, gema e ovo inteiro após inoculação experimental em poedeiras .....                                   | 58 |

**LISTA DE QUADROS**

## CAPÍTULO 2.

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| QUADRO 1- Sorovares de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de amostras da cadeia avícola..... | 19 |
| QUADRO 2- Oligonucleotídeos iniciadores para os genes <i>spvC</i> e <i>prot6E</i> .....       | 20 |

## CAPÍTULO 3

|                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| QUADRO 1- Quadro explicativo das variáveis e suas definições, características e escores de avaliação de parâmetros de qualidade de pintos, de acordo com Tona et al. (2003) ..... | 36 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

**SIGLAS E ABREVIACÕES**

|     |                                 |
|-----|---------------------------------|
| DVA | Doença veiculada por alimento   |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase  |
| UFC | Unidades formadoras de colônias |



## RESUMO

A patogenia de *Salmonella* abrange diferentes fatores, como os genes plasmidiais, que por serem mecanismos genéticos móveis podem aumentar a diversidade genética bacteriana contribuindo para a modificação de virulência e adaptação aos hospedeiros. O presente trabalho foi desenvolvido para detectar a presença dos genes *spvC* e *prot6E* de virulência em diferentes sorovares de *Salmonella enterica* circulantes na região metropolitana de Goiânia e verificar a capacidade dos sorovares com o genes de expressar sua patogenicidade em ovos embrionados, neonatos e poedeiras e causar contaminação em ovos de consumo em modelos experimentais. No experimento 1, isolados de *Salmonella* Enteritidis, Gallinarum, Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund e Typhimurium foram obtidas de amostras de órgãos de aves doentes, ovos e de meio ambiente da cadeia avícola e foram submetidas a PCR em tempo real para investigar a presença dos genes *spvC* e *prot6E*. Dos 47 isolados, 15 (31,9%) foram positivos para o gene *spvC* e cinco (10,6%) para o gene *prot6E*. Conclui-se que *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium e Gallinarum, isolados de aves e de ovos contêm os genes *spvC*. O gene *prot6E* é detectado nos sorovares *Salmonella* Enteritidis, Heidelberg e Typhimurium oriundos de amostras de ovos. E os sorovares de *Salmonella* Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund e Typhimurium oriundas de amostras ambientais não apresentam os genes plasmidiais *spvC* e *prot6E*. No experimento 2, dois isolados de *Salmonella* Gallinarum, um positivo e outro negativo para o gene *spvC*, foram inoculados em ovos embrionados e neonatos de aves de postura para investigar se a presença do gene *spvC*, no sorovar Gallinarum, é capaz de determinar mortalidade embrionária, afetar a qualidade do neonato e do pinto, os parâmetros de produção e causar doença sistêmica em aves jovens. Foi observada alta mortalidade dos grupos inoculados com *Salmonella* Gallinarum via alantóide com um e 14 dias de incubação, independente da presença do gene *spvC*. Não foi observada mortalidade embrionária, alterações na relação peso neonato/peso ovo e alterações na qualidade do neonato para as aves inoculadas via câmara de ar com 19 dias. *Salmonella* Gallinarum sem e com o gene *spvC* foi recuperada do coração, baço, fígado e ceco das aves inoculadas via câmara de ar, enquanto para o grupo inoculado via oral, o patógeno sem o gene foi recuperado apenas no ceco e o patógeno com o gene foi recuperado no baço e ceco. A inoculação de *Salmonella* levou a diminuição do ganho de peso e alteração na biometria do coração e intestino. Conclui-se que *Salmonella* Gallinarum é capaz de causar mortalidade embrionária em embriões inoculados com um e 14 dias na cavidade alantóide. A presença do gene *spvC* em *Salmonella* Gallinarum não afeta a mortalidade embrionária, os parâmetros de incubação e a disseminação sistêmica para aves inoculadas na câmara de ar. Para as aves inoculadas pela via oral, a presença do gene *spvC* determina infecção entérica e sistêmica, enquanto o isolado sem o gene permanece restrito ao ceco. No experimento 3, o isolado de *Salmonella* Heidelberg positivo para o gene *prot6E* no experimento 1, foi inoculado em poedeiras nas vias oral, intravaginal e intravenosa, com o intuito de investigar a sua habilidade de causar doença clínica, contaminação dos ovos e do trato gastrointestinal. O patógeno foi isolado apenas com 12 horas após a inoculação nas excretas em 33% das aves inoculadas via oral e 66% das aves inoculadas via intravaginal. Nos ovos, o patógeno foi isolado com 24 e 48 horas, sete e 15 dias. Conclui-se que a presença do gene *prot6E* em *Salmonella* Heidelberg não é suficiente para causar salmonelose clínica em aves poedeiras, mas determina contaminação dos ovos e do trato gastrointestinal de galinhas, independente da via de inoculação, oral, intravaginal e intravenosa.

Palavras-chave: Genes de virulência, ovos, postura, sorovares.

## DETECTION OF *spvC* AND *prot6E* GENES AND EVALUATION OF THE INFECTIVITY OF *Salmonella* sp. IN LAYING HENS

### ABSTRACT

The pathogenesis of *Salmonella* includes different factors, such as plasmidial genes, which because they are mobile genetic mechanisms can increase the bacterial genetic diversity contributing to the modification of virulence and adaptation to the hosts. The present work was developed to detect the presence of the virulence genes *spvC* and *prot6E* in different serovars of *Salmonella enteric* present in the metropolitan region of Goiânia and to verify the ability of these serovars to express their pathogenicity in embryonated eggs, neonates and laying hens and to cause contamination in eggs in experimental models. In Experiment 1, isolates of *Salmonella* Enteritidis, Gallinarum, Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund and Typhimurium were obtained from organs of sick bird, eggs and environment of poultry chain and were investigated the presence of *spvC* and *prot6E* genes by real-time PCR. Of the 47 isolates, 15 (31.9%) were positive for the *spvC* gene and five (10.6%) for the *prot6E* gene. It is concluded that *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium and Gallinarum, isolated from the bird and eggs contain the *spvC* genes. The *prot6E* gene was detected in the serovars *Salmonella* Enteritidis, Heidelberg and Typhimurium from egg samples. The serovars of *Salmonella* Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund and Typhimurium from environmental samples do not have the plasmid genes *spvC* and *prot6E*. In experiment 2, two isolates of *Salmonella* Gallinarum, one positive and one negative for the *spvC* gene, were inoculated into embryos and neonates of laying birds to investigate whether the presence of the *spvC* gene in the Gallinarum serovar is able to determine embryonic mortality, affect the quality of the neonate and chick, production parameters and cause systemic disease in young birds. It was observed high mortality of the groups inoculated with *Salmonella* Gallinarum in allantoid route with one and 14 days of incubation, independent of the presence of the *spvC* gene. No embryonic mortality, changes in neonatal weight / egg weight and changes in neonatal quality were observed for birds inoculated through a 19-day in air chamber. *Salmonella* Gallinarum without and with the *spvC* gene was recovered from the heart, spleen, liver and ceca of birds inoculated in the air chamber, whereas for the oral inoculated group, the pathogen without the gene was recovered only in the ceca and the pathogen with the gene was recovered from spleen and cecum. *Salmonella* inoculation led to decreased weight gain and altered biometry of the heart and intestine. It is concluded that *Salmonella* Gallinarum is capable of causing embryonic mortality in embryos inoculated with one and 14 days in the allantoic cavity. The presence of the *spvC* gene in *Salmonella* Gallinarum does not affect embryo mortality, incubation parameters and systemic dissemination for birds inoculated in the air chamber. For birds inoculated by the oral route, the presence of the *spvC* gene determines enteric and systemic infection, whereas the isolate without the gene remains restricted to the cecum. In Experiment 3, the *Salmonella* Heidelberg isolate positive for the *prot6E* gene in experiment 1 was inoculated in laying hens in the oral, intravaginal and intravenous routes in order to investigate their ability to cause clinical disease, egg and gastrointestinal tract contamination. The pathogen was isolated in the excreta, only 12 hours after inoculation in 33% of the birds inoculated from oral route and 66% of the birds inoculated intravaginal route. In the eggs, the pathogen was isolated at 24 and 48 hours, seven and 15 days. It is concluded that the presence of the *prot6E* gene in *Salmonella* Heidelberg is not sufficient to cause clinical salmonellosis in laying hens, but it determines contamination of the eggs and the gastrointestinal tract of chickens, regardless of the route of inoculation, oral, intravaginal and intravenous.

**Keywords:** Eggs, laying hens, *Salmonella*, virulence genes.

## CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1. INTRODUÇÃO

Os ovos são considerados alimentos completos e avaliados como a fonte mais barata de proteína de origem animal para o homem<sup>1</sup>. Apesar disso, ao se ponderar o custo-benefício do alimento, observa-se que o interesse e a atração dos consumidores pelo produto ainda sofre influência da não confiabilidade na sua qualidade física, química, e principalmente microbiológica, tendo em vista que, os produtos avícolas, ovos e carne de frango, são os alimentos de origem animal mais incriminados como veículo nas salmoneloses pelas doenças veiculadas por alimentos (DVA)<sup>2</sup>.

*Salmonella* é o agente bacteriano de maior ocorrência em surtos de infecção alimentar em humanos no mundo<sup>3</sup>. No Brasil, o Ministério da Saúde relatou a ocorrência de 12.503 surtos de DVAs no período entre 2000 a 2017, com 30% dos surtos causados por *Salmonella* e 7,36% destes foram associados aos ovos e produtos a base de ovos como fonte de infecção<sup>4</sup>.

Os sorovares de *Salmonella* podem compor a microbiota intestinal das galinhas de postura sem determinar sinais clínicos, possibilitando a postura de ovos contaminados que não apresentam alterações organolépticas, tais como alterações de cor, cheiro e sabor, impedindo a rejeição pelo consumidor e constituindo uma ameaça a saúde do homem<sup>5</sup>.

Os mecanismos de interação desse patógeno com seus hospedeiros são complexos e sua patogenia abrange diversos fatores de virulência envolvidos no processo infeccioso<sup>6</sup>. Os genes de virulência são os agentes mais estudados neste processo, sendo que supressão de um deles pode reduzir ou até inibir a virulência<sup>7</sup>, diminuindo assim, a probabilidade dos sorovares de *Salmonella* de persistirem na cadeia avícola<sup>8</sup>.

A melhor compreensão dos fatores de virulência da bactéria e da sua associação aos mecanismos de defesa das aves e dos ovos possibilita a elaboração de medidas de controle, diagnóstico e vigilância, e consequentemente, a redução de surtos de infecção alimentar pelo consumo de ovos e ovoprodutos contaminados com *Salmonella*<sup>9,10</sup>.

Desta maneira, o presente trabalho foi desenvolvido para detectar os genes *spvC* e *prot6E* de virulência em diferentes sorovares de *Salmonella enterica* circulantes na região metropolitana de Goiânia, além de verificar a capacidade dos sorovares de expressar sua patogenicidade em ovos embrionados e poedeiras, bem como avaliar sua capacidade de sobrevivência e multiplicação em ovos de consumo em modelos experimentais.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Salmonella enterica*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e são caracterizadas como bacilos pequenos, Gram-negativos, desprovidos de cápsula, aeróbios ou anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. Mesófilas crescem entre 5°C e 45°C, mas com a temperatura ótima de crescimento entre 37°C a 40°C e pH ideal de 7, mas crescem em pH entre 4 a 9,5. A maioria é móvel, apresenta flagelos peritríquios, com exceção de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*<sup>11</sup>.

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, classificadas de acordo com características bioquímicas, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*<sup>12</sup>. Possuem aproximadamente 2.659 sorovares já identificados, destes apenas 23 pertencem a *S. bongori*. *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*<sup>13</sup>. A subespécie *enterica* apresenta a maioria dos sorovares identificados, com 1586 e está associada a 99% das infecções em humanos e animais<sup>14</sup>.

Embora, tanto a identificação como a classificação de *Salmonella* sejam complexas estas se baseiam principalmente na detecção sorológica dos antígenos<sup>15</sup>, seguindo o esquema de Kaufmann-White. Este esquema classifica a bactéria em tipos sorológicos baseados na diversidade dos anticorpos específicos para estruturas antigênicas que são os antígenos somáticos (O) presentes na parede celular, antígenos flagelares (H), presentes nos flagelos, antígenos capsulares (Vi), presentes no envelope celular<sup>14</sup>.

A variação genética dos sorovares de *Salmonella* é responsável pela codificação das estruturas como os lipopolissacarídeo (LPS), flagelos e fímbrias e também pela expressão de genes de virulência específicos. O polimorfismo genético pode promover a variação antigênica que resulta em expressão, ou não, das estruturas de superfície<sup>16</sup>. No entanto, sorovares de *Salmonella enterica* possuem semelhanças na organização linear e sequências dos genomas, com homologia de sequências das regiões conservadas correspondente de 96 a 99%<sup>17</sup>.

Além disso, os sorovares também podem diferir um do outro pela especificidade do hospedeiro e apresentarem características clínicas e epidemiológicas, as quais permitem ser caracterizadas em três grupos: Sorovar altamente adaptado ao homem, como *Salmonella Typhi* e *Paratyphi A, B e C*. Sorovar altamente adaptado à espécie animal, como *Salmonella Dublin* (bovinos), *Choleraesuis* (suínos) e *Pullorum* e *Gallinarum* (aves). Sorovares sem predileção por espécie, conhecidos como paratíficos, podem afetar tanto homem quanto animais, sendo considerados zoonóticos, como *Salmonella Enteritidis* e *Typhimurium*<sup>11,18</sup>.

Os fatores envolvidos na patogênese de *Salmonella enterica* são complexos e estão associados com a genética da bactéria, expressão dos fatores genéticos, o estado imune do hospedeiro, especificidade do patógeno, o ambiente de acometimento e interações com a microbiota intestinal<sup>19</sup>. Dependendo desses fatores, a bactéria *Salmonella* pode causar doença mesmo em doses baixas, principalmente em hospedeiros suscetíveis como crianças, idosos e pessoas imunossuprimidas<sup>20</sup>, aspecto preocupante para saúde pública e para os órgãos mundiais de saúde.

Nos Estados Unidos, Scharff (2012)<sup>21</sup> estimou que apenas um a cada 20 mil (0,005%) ovos estão contaminados com *Salmonella*. Porém, ao se considerar a alta produção, que atinge patamares de 70 bilhões de ovos por ano no país, pode-se sugerir a entrada no mercado consumidor de 3,5 milhões de ovos contaminados. Além disso, os consumidores não conseguem discernir entre os ovos contaminados e não contaminados no momento da aquisição desses produtos<sup>22</sup>. Por isso, no intuito de diminuir a incidência de casos de salmonelose em humanos, são realizadas pesquisas tanto nas aves de postura, para monitorar a prevalência da bactéria na criação avícola, quanto nos ovos de consumo.

Estas pesquisas têm focado, cada vez mais, no uso de tecnologias que diminuam o tempo de diagnóstico e aumentem a precisão dos resultados. Como a pesquisa realizada em ovos provenientes de supermercados e feiras da região de Goiânia, que das 387 amostras analisadas de casca, albúmen e gema, de ovos de mesa, 21 amostras (5,4%) foram positivas para *Salmonella* pela técnica de bacteriologia convencional e 62 (16%) pela técnica de PCR em tempo real<sup>23</sup>, mostrando a importância da monitoria dos ovos de consumo.

Essa monitoria também deve ser realizada nas criações de poedeiras, pois a entrada da *Salmonella* nas criações de aves de postura pode ocorrer de forma vertical, via matrizes, ou no incubatório, por meio de contaminação cruzada, infectando o ovo embrionado e de forma horizontal, principalmente pela ingestão da bactéria no meio ambiente contaminado. Os ovos, por sua vez, podem ser contaminados por transmissão vertical, em que a bactéria se incorpora ao ovo durante sua passagem pelos órgãos do sistema reprodutor ou por transmissão horizontal pós-postura, que ocorre quando o ovo já formado entra em contato com as fezes, durante sua passagem pela cloaca ou presentes no ambiente<sup>24</sup>.

Cada uma das estruturas dos ovos, gema, albúmen, membranas e casca, são formadas em uma porção do sistema reprodutor das aves. No ovário são produzidos os folículos ovarianos, que são captados pelo infundíbulo, passam para o magno no qual ocorre a deposição do albúmen, para o istmo no qual são formadas as membranas internas e externas da casca, pelo útero no qual ocorre a deposição da casca e pela vagina para ser expelido.

Assim, a contaminação das estruturas dos ovos também pode estar relacionada com a infecção por *Salmonella* na região do trato reprodutor em que a estrutura é formada. Ou seja, folículo ovariano infectado contamina gema, infundíbulo contamina a membrana vitelina, magno contamina albúmen, istmo contamina membrana da casca e útero infectado contamina casca, como demonstrado na Figura 1<sup>26</sup>.

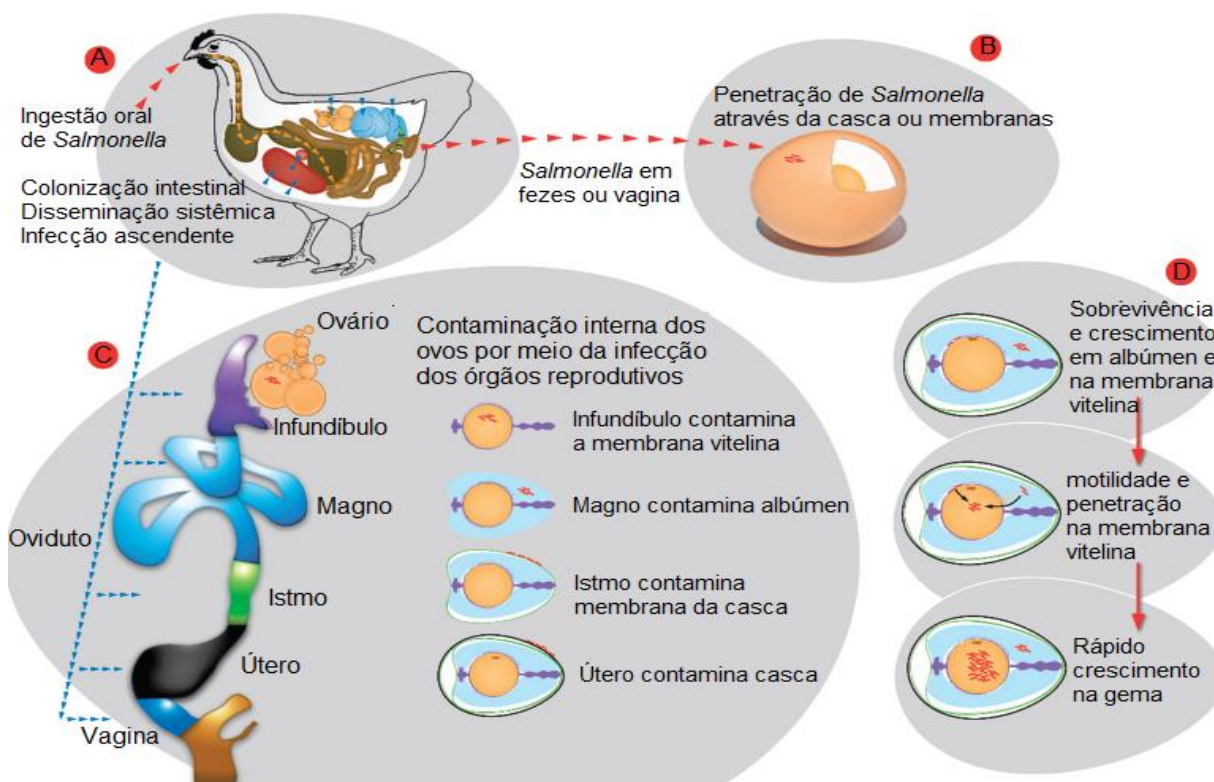


FIGURA 1 – Esquema representativo da contaminação de ovos por *Salmonella*.  
Fonte: Adaptado de Gantois et al. (2009)<sup>26</sup>

No entanto, para causar infecção nas aves e contaminação dos ovos, os sorovares de *Salmonella* precisam apresentar fatores de virulência que são necessários para as diferentes etapas do processo infeccioso: adesão, invasão, disseminação e resistência aos mecanismos de defesa das aves e também dos ovos<sup>27</sup>, dentre esses fatores destacam-se os genes de virulência.

## 2.2 Genes de virulência de *Salmonella*

Os genes são segmentos de DNA, organizados em arranjo linear dentro do cromossomo (*locus* genético). Bactérias possuem em média 500 genes que compõem o DNA. Estes genes codificam produtos funcionais, possuem funções específicas e podem ou não serem expressos<sup>28</sup>.

Os genes de virulência estão contidos em elementos genéticos que fazem parte de regiões específicas dos microrganismos como o cromossomo, nas chamadas ilhas de patogenicidade e na superfície estrutural como as fímbrias, ou em elementos genéticos móveis como os plasmídeos<sup>29</sup>, que são segmentos de DNA extracromossomal, a maioria de forma circular com tamanho variável, variando de 50 a 100kd<sup>30</sup>. (Figura 2)<sup>31</sup>.

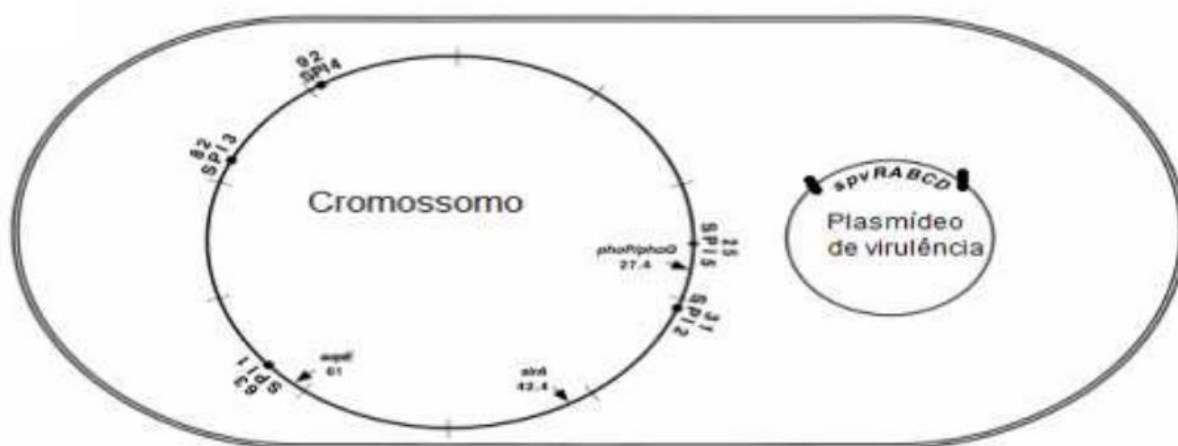


FIGURA 2 - Representação esquemática do cromossomo de *Salmonella enterica*. Ilhas de patogenicidade (SPI), plasmídeo e genes de virulência.  
Fonte: Adaptado de Marcus et al. (2000)<sup>31</sup>

A presença ou ausência de determinados plasmídeos levanta questões sobre o que leva a bactéria a mantê-los como parte do genoma e as suas funções biológicas<sup>32</sup>. Alguns genes são necessários para a sobrevivência, por isso codificam proteínas responsáveis pela respiração, locomoção e nutrição. Enquanto, outros possuem a função de determinar vantagem evolutiva e competitiva e por isso estão relacionados com a invasão e resistência frente aos fatores adversos, como substâncias antimicrobianas<sup>33</sup>. Além disso, a aquisição de elementos genéticos móveis confere diversidade a *Salmonella enterica*<sup>34</sup>, o que pode levar ao aumento da virulência e adaptação a novos hospedeiros<sup>35,36</sup>.

Os plasmídeos estão presentes em diversos sorovares, podem carrear informações genéticas e possuem a capacidade de codificar fatores de virulência mediante seus genes de virulência<sup>32,37</sup>.

### 2.2.1 Genes plasmidiais de virulência

Os genes plasmidiais estão contidos nos plasmídeos, sendo que, vários sorovares de *Salmonella* abriga um plasmídeo de alta massa molecular, chamado de *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) que codifica um grupo de genes de virulência composto por cinco genes

*spvRABCD*<sup>37</sup>. Estes genes são considerados conservados e estáveis, o que sugere que eles desempenhem um papel fundamental na expressão da virulência no processo infeccioso e auxiliem na sobrevivência a diferentes seleções e ambientes intra e extracelulares<sup>38</sup>.

As funções dos genes plasmidiais do *spv* estão mais relacionadas à capacidade de auxiliar no crescimento, sobrevivência e multiplicação da bactéria<sup>37</sup> e são considerados como essenciais para a bactéria multiplicar e sobreviver em estágios intracelulares da infecção<sup>39, 40</sup>. Além disso, estes genes estão relacionados a capacidade de invasão nas células do fígado de frango, nas células do oviduto de poedeiras e pode levar ao aumento de 40 a 100% da mortalidade<sup>41,42,43</sup>

#### a) Gene plasmidial *spvC*

Especificamente, o gene *spvC* é considerado essencial para a sobrevivência intracelular<sup>44</sup>, apontado como um dos principais genes de virulência de *Salmonella*<sup>37</sup> e tem sido relacionado como responsável por infecção sistêmica em estudos experimentais<sup>45,46</sup>. No mais, também é conhecido por codificar os principais fatores para a virulência mediada por plasmídeos em alguns sorovares de *Salmonella*<sup>47</sup>.

Além disso, o gene está envolvido na regulação da liberação de citocinas, no crescimento da bactéria nas células infectadas e na proliferação de *Salmonella* no sistema reticuloendotelial<sup>45,48,49</sup> e aumenta a possibilidade de sobrevivência da bactéria fora do intestino<sup>50</sup>. Ainda, *spvC* também está relacionado ao bloqueio da função pró-inflamatória da resposta imune, o que leva a supressão do sistema imune do hospedeiro<sup>37,51</sup>.

Em suma, o plasmídeo *spv* e, especificamente, o gene *spvC* estão associados a diversas funções em *Salmonella* e estão presentes em vários sorovares como Gallinarum<sup>52,53</sup>, Enteritidis<sup>54</sup>, Typhimurium<sup>35</sup> e até mesmo em sorovares menos comuns como Infantis<sup>46</sup>.

Entretanto, nem todos os genes plasmidiais de virulência apresentam funções tão amplas e/ou estão presentes em diversos sorovares de *Salmonella*. Alguns apresentam funções mais específicas e são exclusivos a determinados sorovares, como o gene plasmidial *prot6E*.

#### b) Gene plasmidial *prot6E*

O gene *prot6E* apresenta funções de virulência mais específicas e é amplamente relatado em *Salmonella* Enteritidis. Sabe-se que este sorovar é o mais frequentemente relacionado a contaminação dos ovos<sup>55</sup> e que possui tropismo pelos tecidos do sistema reprodutor das aves<sup>56</sup>, sendo considerado uma importante ameaça para a saúde pública no mundo todo<sup>57</sup>.



Dentre os fatores que aumentam a capacidade adaptativa de *Salmonella* Enteritidis ao sistema reprodutor das aves e aos ovos está o gene *prot6E*<sup>9</sup>. Este gene plasmidial está localizado em um plasmídeo de virulência da 60kd, possui funções específicas relacionadas aos órgãos reprodutores das aves, como colonização do oviduto e interação com os componentes do albúmen do ovo<sup>58</sup>.

Embora o papel desse gene ainda não esteja totalmente esclarecido<sup>59</sup>, sabe-se que essa melhor interação com a albumina presente no oviduto das aves e no ovo se deve a expressão de fímbrias de superfície que facilitam a colonização do sistema reprodutor das aves e contaminação dos ovos<sup>9,60,61</sup>.

No entanto, considerando que segundo Hu et al. (2019)<sup>57</sup> poucos estudos foram publicados descrevendo a extensão de variação genética e dos efeitos dessas possíveis variações sobre as estruturas de proteínas resultantes do gene *prot6E* e considerando que os genes plasmidiais são móveis o que possibilita trocas entre bactérias, que levam a alteração na virulência e possíveis adaptações a novos nichos ambientais e/ou hospedeiros<sup>35</sup>. Apesar de ainda não haver plena elucidação da capacidade dos sorovares de burlar os mecanismos de defesa dos hospedeiros e o que leva a sua permanência na cadeia produtiva até atingir o consumidor final.

## 2.3 Mecanismos de defesa das aves e dos ovos

### a) Mecanismos de defesa das aves

A resposta imune pode ser dividida em resposta imune inata, que representa a primeira linha de defesa e envolve a participação de células fagocíticas, sistema complemento e anticorpos naturais e células não linfoides. E em resposta imune ativa ou adaptativa, que resulta na cooperação entre os linfócitos T e B, células apresentadoras de antígenos e anticorpos específicos, e apresenta especificidade e memória imunológica<sup>62,63</sup>.

A bactéria precisa burlar o sistema imune das aves, que incluem barreiras físicas, químicas e biológicas, como a pele, citocinas, peptídeos antimicrobianos, componentes do sistema complemento, células sanguíneas como os linfócitos, macrófagos, heterófilos e células dendríticas, e os órgãos do sistema linfóide<sup>62</sup>.

A fagocitose ocorre por meio de receptores que reconhecem padrões presentes na superfície da membrana, ou por opsonização dos microrganismos por anticorpos ou sistema complemento. A fagocitose e a apresentação do antígeno relacionam as respostas inata e adaptativa, resultando na eliminação ou neutralização do patógeno<sup>63</sup>.

Além disso, o sistema reprodutivo das aves é considerado um ambiente hostil para o desenvolvimento bacteriano, por apresentar componentes antimicrobianos tais como a lisozima, que são proteínas que danificam a parede celular das bactérias e condições de limitação nutricional<sup>64</sup>, o que desencadeia a necessidade da expressão de genes que possam burlar os fatores estressantes.

Os mecanismos que burlam o sistema de defesa do hospedeiro e os eventos mutacionais que possibilitam a adaptação, frente ao estresse metabólico, oxidativo ou por temperatura, são fatores de virulência fundamentais para a perpetuação de determinados sorovares de *Salmonella* frente à diversidade de hospedeiros e diferentes situações de colonização. Essa adaptação advém das mudanças sequenciais nos genes e a aquisição de resistência a determinados antibióticos<sup>65</sup>.

#### b) Mecanismos de defesa dos ovos

O ovo também possui barreiras físicas e químicas que dificultam a invasão e multiplicação de microrganismos<sup>66</sup>. Para suplantar tais defesas, *Salmonella* apresenta fatores de virulência que são necessários para penetração, multiplicação e sobrevivência dentro dos ovos<sup>26</sup>.

A cutícula e a casca são consideradas a primeira linha de defesa do ovo, por formarem uma barreira física que impede a entrada de microrganismos<sup>67</sup>. A contaminação destas estruturas está associada à presença do patógeno nas fezes e na poeira do ambiente de criação e pode promover a contaminação do conteúdo interno de ovos, por penetração pelos poros ou ainda durante a utilização dos ovos na cozinha<sup>68</sup>. As membranas da casca internas e externas são consideradas a segunda linha de defesa e possuem a função de uma barreira física, pois retêm os microrganismos em uma espécie de filtro formado por uma rede de fibras orientadas aleatoriamente e também tem ação antibactericida<sup>69</sup>.

O tempo de sobrevivência de *Salmonella* na superfície dessas estruturas e a sua capacidade de migrar para o interior do ovo dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os primeiros estão relacionados à qualidade das estruturas, tais como a idade, integridade, espessura, porosidade, defeitos e propriedades das membranas. Já os fatores extrínsecos, compreendem a cepa, concentração de bactérias, os processos sofridos pelos ovos, a temperatura, a umidade e a presença de matéria orgânica<sup>67</sup>.

No entanto, proteínas presentes na cutícula, casca e membranas da casca, possuem a função de reforçar a barreira física e aumentar as defesas antimicrobianas. Na cutícula são apontadas como predominantes a Ovocalyxin-25, proteína que tem função de diminuir a

permeabilidade na casca e aumentar a resistência contra microrganismos, inclusive *Salmonella*, e a Ovocalyxin-32 que se relaciona a características de qualidade da casca e possui a função de inibir a protease, utilizada pelos dos microrganismos para sua nutrição<sup>64</sup>.

O albúmen, que representa 60% do ovo, é considerado um ambiente hostil e pobre para o crescimento bacteriano, devido às suas características e condições físico-químicas, tais como a alta viscosidade, temperatura, pH alcalino, deficiências nutricionais e presença de substâncias antimicrobianas<sup>9,70</sup>.

A lisozima e a ovotransferrina são as principais proteínas do albúmen com atividade antimicrobiana<sup>64</sup>. A lisozima forma poros na parede celular das bactérias tanto Gram negativas e quanto Gram positivas<sup>71</sup>. E a ovotransferrina também causa danos à parede celular das bactérias, embora sua principal função esteja relacionada ao fator antinutricional, ao se ligar em todo o ferro livre, criando um ambiente com deficiência deste elemento, que participa de vários processos biológicos das bactérias<sup>72</sup>. Para as bactérias driblarem as atividades antimicrobianas conferidas pelas proteínas que modificam a parede celular é necessário que haja a expressão de genes com funções de proteção, manutenção e reparação da integridade da parede celular<sup>8</sup>.

Na membrana vitelina também existem mecanismo de defesa, tais como o fator antimicrobiano chamado  $\beta$ -defensinas aviárias (AvBDs) que promovem proteção da gema durante o desenvolvimento embrionário<sup>73</sup>. A gema precisa ser protegida, pois não apresenta mecanismos de defesa próprios e é rica em nutrientes que podem promover multiplicação rápida de microrganismos, culminando em possível infecção dos consumidores<sup>26,74</sup>.

O controle da infecção em poedeiras representa um desafio pela variedade de sorovares adaptados e por vezes de difícil detecção nestas aves. Medidas que visam reduzir a infecção em poedeiras e contaminação dos ovos são desejáveis na cadeia avícola. Com base no exposto, o presente estudo visa detectar os genes plasmidiais de virulência *spvC* e *prot6E*, em diferentes sorovares de *Salmonella* provenientes de amostras avícolas e investigar a habilidade de isolados com estes genes apresentarem virulência em aves.

## REFERÊNCIAS

1. CEPEA: Consumo de ovos deve seguir favorecido em 2017. Piracicaba, SP: Universidade de São Paulo, 2017. [acesso em: 15 fev 2019]. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br>.
2. De Knecht LV, Pires SM, Hald T. Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. *Epidemiol Infect* (2015) 143:1175–86.
3. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. 2018. [acesso em 30 dez 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
4. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, 2018. [acesso 28 jan 2019]. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>
5. Andreatti FRL. Paratifo aviário. In: Andreatti FRL, autor. Saúde aviária e doenças. São Paulo: Rocca; 2007. p.112-117.
6. Shah DH, Casavant C, Hawley Q, Addwebi T, Call DR, Guard J. *Salmonella* Enteritidis strains from poultry exhibit differential responses to acid stress, oxidative stress, and survival in the egg albumen. *Foodborne Pathog Dis*. 2012;9(3):258-64.
7. Vieira MAM. [Pathogenicity islands]. *O mundo da saúde*. 2009;33(4):406-14. Portuguese.
8. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Van Immerseel F. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens. *Appl Environ Microbiol*. 2008a;74 (21):6616-22.
9. Clavijo RI, Loui C, Andersen GL, Riley LW, Lu S. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(2):1055-64.
10. Addwebi TM, Call DR, Shah DH. Contribution of *Salmonella* Enteritidis virulence factors to intestinal colonization and systemic dissemination in 1-day-old chickens. *Poult Sci*. 2014;93 (4):871-81.
11. Gast RK. *Salmonella* Infections. In: Saif YM, editor. *Diseases of Poultry*. 12th ed. Iowa: Blackwell; 2008. p.619-65.
12. Barrow PA, Jones MA, Thomson N. *Salmonella*. In: Gyles CL; Prescott JF, Songer G, Thoen CO, editores. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4th ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p 231- 57.
13. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PA, Weill FX. Supplement 2003 e 2007 (no 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbio*. 2010;161(1):26-9.

14. Jeanjean SI, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, Pinna E, Nair S, Fiels PI, Weill FX. Supplement 2008-2010 (n48) to the White-Kauffmann – Le Minor Scheme. Res. Microbiol. 2014;165(7):526-30.
15. Bale et al., 2016). Bale J, Meunier D, Weill FX, Pinna E, Peters T, Nair S. Characterization of new *Salmonella* serovars by whole-genome sequencing and traditional typing techniques. J Medical Microbiol. 2016, 65:1074-78.
16. Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. J Clin Invest. 2001;107:775-80.
17. Edwards RA, Olsen GJ, Maloy SR. Comparative genomics of closely related salmonellae. Trends Microbiol. 2002;10(2):94–9.
18. OIE. World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code Prevention, Detection and Control of *Salmonella* in Poultry. Chapter 6.6. 2018b. [acesso 23 nov 2018] Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_prevent\\_salm onella.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_salm onella.pdf)
19. Gast RK, Guraya RG, Guard J, Holt PS. Frequency and magnitude of internal organ colonization following exposure of laying hens to different oral doses of *Salmonella* Enteritidis. J. Poult. Sci. 2011;10(4):325-31.
20. Sirtoli DB, Comarella L. O papel da vigilância sanitária na prevenção das doenças transmitidas por alimentos (DTA). Revista Saúde e Desenvolvimento. 2018;12(10):197-209.
21. Scharff RL. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. J. Food Prot. 2012;75:123–131.
22. Roberts T, Scharff LR. Pathogen information is the basic problem for economic incentives. food safety economics. 2018:13-28.
23. Moraes DMC, Duarte SCI, Bastos TSA, Rezende CLG, Leandro NSM, Café MB, Stringhini JH, Andrade MA. Detection of *Salmonella* spp. by Conventional Bacteriology and by Quantitative Polymerase-Chain Reaction in Commercial Egg Structures. Braz J Poultry Sci. 2016;18(1):117-24.
24. Di Fábio J, Martins PC. Biossegurança no incubatório. In: Macari M, Gonzales E, Patrício IS, Naas IA, Martins PC, autor e editor. Manejo da incubação, 3a Ed. Jaboticabal: Facta; 2013. p.411-58.
25. Sesti L, Ito NMK. Fisiopatologia do sistema reprodutor. In: Berchieri Júnior A, Silva EN, Di Fábio J; Sesti L; Zuanaze MAF, autor e editor. Doenças das aves. 2ª ed. Campinas: Facta; 2009. p.142-59.
26. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiol Rev. 2009;33(4):718-38.

27. Shah DH. RNA sequencing reveals differences between the global transcriptomes of *Salmonella enterica* serovar enteritidis strains with high and low pathogenicities. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(3):896-906.
28. Keller EF. The century beyond the gene. *J Biosci.* 2005;30(1):3-10.
29. Van Asten AJ, Van Dijk JE. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;44(1): 251–9.
30. Van Elsas JD, Bailey MJ. The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microb Eco.* 2002;42:187–197.
31. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* 2000;2(2):145-56.
32. Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*, *J. Vet. Microbiol.* 2006;112:1-10.
33. Langridge GC, Phan MD, Turner DJ, Perkins TT, Parts L, Haase J, Charles I, Maskell DJ, Peters SE, Dougan G, Wain J, Parkhill J, Turner AK. Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants. *Genome Res.* 2009;19(12):2308–16.
34. Rotger R, Casadesús J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *International Microbiology.* 2010;2(3):177-184.
35. Li X, Liu L, Li Q, Xu G, Zheng J. *Salmonella* Enteritidis in Layer Farms of Different Sizes Located in Northern China: On-Farm Sampling and Detection by the PCR Method. *Braz J Poultry Sci.* 2017;19(3):377-86.
36. Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, Helmuth R, Hauser E, Guerra B, Beutlich J, Brisabois A, Peters T, Svensson L, Madajczak G, Litrup E, Imre A, Herrera-Leon S, Mevius D, Newell DG, Malorny B. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(5):523-35.
37. Hur J, Kim JH, Park JH, Lee YJ, Lee JH. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. *Vet J.* 2011;189(3):306-11.
38. Chu C, Feng Y, Chien AC, Hu S, Chu CH, Chiu CH. Evolution of genes on the *Salmonella* Virulence plasmid phylogeny revealed from sequencing of the virulence plasmids of *S. enterica* serotype Dublin and comparative analysis. *Genomics.* 2008;92 (5): 339–43.
39. Hooton SP, Timms AR, Cummings NJ, Moreton J, Wilson R, Connerton IF. The complete plasmid sequences of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium U288. *Plasmid.* 2014;76:32-9.
40. Haneda T, Ishii Y, Shimizu H, Ohshima K, Iida N, Danbara H, Okada N. *Salmonella* type III effector *SpvC*, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. *Cell Microbiol.* 2012;14(4):485-99.

41. Addwebi TM, Call DR, Shah DH. Contribution of *Salmonella* Enteritidis virulence factors to intestinal colonization and systemic dissemination in 1-day-old chickens. *Poult Sci*. 2014;93 (4):871-81.
42. Shah DH, Zhou X, Kim HY, Call DR, Guard J. Transposon mutagenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis identifies genes that contribute to invasiveness in human and chicken cells and survival in egg albumen. *Infect Immun*. 2012;80(12):4203-15.
43. Bakshi CS, Singh VP, Malik M, Singh RK, Sharma B. 55 kb plasmid and virulence-associated genes are positively correlated with *Salmonella* enteritidis pathogenicity in mice and chickens. *Vet Res Commun*. 2003;27:425–32.
44. Krzyzanowski F Jr, Zappelini L, Martone-Rocha S, Dropa M, Matté MH, Nacache F, Razzolini MT. Quantification and characterization of *Salmonella* spp. isolates in sewage sludge with potential usage in agriculture. *BMC Microbiol*. 2014;14:263.
45. Chaudhary JH, Nayak JB, Brahmbhatt MN, Makwana PP. Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughter house environment in Ahmedabad, Gujarat. *Vet. World*. 2015;8(1):121-4.
46. Figueiredo R, Card R, Nunes C, AbuOun M, Bagnall MC, Nunez J, Mendonça N, Anjum MF, da Silva GJ. Virulence Characterization of *Salmonella enterica* by a New Microarray: Detection and Evaluation of the Cytolethal Distending Toxin Gene Activity in the Unusual Host *S. Typhimurium*. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135010.
47. Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA. Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J Bacteriol*. 2001;183(15):4652-8.
48. Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol*. 1993;7(6):825-30.
49. Rodicio MR, Herrero A, Rodriguez I, Garcia P, Montero I, Beutlich Janine, Rodicio R, Guerra B, Mendoza MC. Acquisition of antimicrobial resistance determinants of virulence plasmids by specific serotypes of *Salmonella enterica* nontyphoid. *Rev Med Microbiol*. 2011;22(3):55-65.
50. Abd-Elghany SM, Sallam KI, Abd-Elkhalek A, Tamura T. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol Infect*. 2015;143(5):997-1003.
51. Mazurkiewicz P, Thomas J, Thompson JA, Liu M, Arbibe L, Sansonetti P, Holden DW. *SpvC* is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol*. 2008;67(6):1371-83.
52. Pal S, Dey S, Batabyal K, Banerjee A, Joardar SN, Samanta I, Isore DP. Characterization of *Salmonella* Gallinarum isolates from backyard poultry by polymerase chain reaction detection of invasion (*invA*) and *Salmonella* plasmid virulence (*spvC*) genes. *Vet World*. 2017;10(7):814-817.

53. Mir IA, Wani SA, Hussain I, Qureshi SD, Bhat MA, Nishikawa Y. Molecular epidemiology and in vitro antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from poultry in Kashmir. *Rev Sci Tech*. 2010;29(3):677-86.
54. Mkrtchyan MS, Zakharyan MK, Arakelova KA, Sedrakyan AM, Gevorgyan ZU, Ktsoyan ZA. Molecular determinants of virulence genes of *Salmonella* Enteritidis prevailing in Armenia. *Chem Biol*; 2016;1:55–60.
55. Wright A., Richardson L, Mahon B, Rothenberg R., Cole D. The rise and decline in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis outbreaks attributed to egg-containing foods in the United States, 1973-2009. *Epidemiol Infect*. 2016;144(4):810–9.
56. Gast RK, Guraya R, Jones DR, Anderson KE, Karcher DM. Frequency and Duration of Fecal Shedding of *Salmonella* Enteritidis by Experimentally Infected Laying Hens Housed in Enriched Colony Cages at Different Stocking Densities. *Front Vet Sci*. 2017;10;4:47.
57. Hu L, Stones RM, Brown EW, Allard MW, Zhang G. DNA sequences and predicted protein structures of *prot6E* and *sefA* genes for *Salmonella* ser. Enteritidis detection. *Food Control*. 2019;96:271-80.
58. Li S, Zhang Z, Pace L, Lillehoj H, Zhang S. Functions exerted by the virulence-associated type-three secretion systems during *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion into and survival within chicken oviduct epithelial cells and macrophages. *Avian Pathol*. 2009;38(2):97-106.
59. Hu L, Ma LM, Zheng S, He X, Hammack TS, Brown EW, Zhang G. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella* ser. Enteritidis from egg products. *Food control*. 2018;88:190-7.
60. González-Escalona N, Zhang G, Brown EW. Multiplex TaqMan real-time pcr (qPCR) assay targeting *prot6E* and *invA* genes for fast and accurate detection of *Salmonella* Enteritidis. *Salmonella-A diversified superbug*, InTech. 2012;27. doi:10.5772/28657
61. Marlony B, Bunge C, Helmuth R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *J Microbiol Methods*. 2007;70(2):245-51.
62. Erf GF. Cell-mediated immunity in poultry. *Poult Scie*. 2008;83:580-90.
63. Abbas AK, Litchman AH, Poer JS. Cellular and molecular immunology. 8 ed. Philadelphia WB Saunders, 2014.
64. Marie P, Labas V, Brionne A, Harichaux G, Hennequet-Antier C, Nys Y, Gautron J. Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization. *J Proteomics*. 2015;113:178-93.
65. Gantois I, Eeckhaut V, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathol* 2008;37:399–406.
66. Sesti L, Ito NMK. Fisiopatologia do sistema reprodutor. In: Berchieri Júnior A, Silva EN, Di Fábio J; Sesti L; Zuanaze MAF, autor e editor. *Doenças das aves*. 2ª ed. Campinas: Facta; 2009. p.142-59.



67. Gonzales E, Patrício IS, Naas IA, Martins PC. Manejo da incubação, 3ª edição, Ed. FACTA, Jaboticabal, 2013. Seção 2, cap. 2.10, p. 245-71.
68. Gole VC, Torok V, Sexton M, Caraguel CG, Chousalkar KK. Association between indoor environmental contamination by *Salmonella* enterica and contamination of eggs on layer farms. J Clin Microbiol. 2014;52(9):3250-8.
69. Ruiz J, Lunam CA. Ultrastructural analysis of the eggshell: contribution of the individual calcified layers and the cuticle to hatchability and egg viability in broiler breeders. Br Poult Sci. 2002;41:584-92.
70. Alabdeh M, Lechevalier V, Nau F, Gautier M, Cochet MF, Gonnet F, Jan S, Baron F. Role of incubation conditions and protein fraction on the antimicrobial activity of egg white against *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli*. J Food Prot. 2011;74(1):24-31.
71. Abdou AM, Kim M, Sato K. Functional Proteins and Peptides of Hen's Egg Origin, Bioactive Food Peptides in Health and Disease. 2013. [acesso 25 out 2016]. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/bioactive-food-peptides-in-health-and-disease/functional-proteins-and-peptides-of-hen-s-egg-origin>
72. Wu J, Acero-Lopez A. Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation. Food Res Int. 2012;46(2):480-7.
73. Lynn DJ, Higgs R, Gaines S, Tierney J, James T, Lloyd AT, Fares MA, Mulcahy G, O'Farrelly C. Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken. Immunogenetics. 2004;56(3):170-7.
74. Hervé-Grépinet V, Réhault-Godbert S, Labas V, Magallon T, Derache C, Lavergne M, Gautron J, Lalmanach AC, Nys Y. Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(10):4401-9.

## CAPÍTULO 2. DETECÇÃO DOS GENES PLASMIDIAIS *spvC* E *prot6E* EM *Salmonella enterica* PROVENIENTE DE AMOSTRAS DA CADEIA AVÍCOLA

### RESUMO

A virulência de *Salmonella* envolve diversos fatores, dentre eles os genes plasmidiais, que podem conferir maior virulência e adaptação a novos hospedeiros. O presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de detectar os genes plasmidiais *spvC* e *prot6E*, em amostras de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, Gallinarum, Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund e Typhimurium provenientes de fontes avícolas. Isolados de *Salmonella* obtidas de amostras de órgãos de aves doentes, ovos e de meio ambiente da cadeia avícola goiana foram submetidas a PCR em tempo real para investigar a presença dos genes plasmidiais *spvC* e *prot6E*. Dos 47 isolados, 15 (31,9%) foram positivos para o gene *spvC*, sendo três Enteritidis, um Typhimurium e 11 Gallinarum; cinco (10,6%) para o gene *prot6E*, sendo três Enteritidis, um Typhimurium e um Heidelberg. Conclui-se que *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium e Gallinarum isolados dos órgãos de aves e de ovos contêm os genes *spvC*. O gene *prot6E* foi detectado em *Salmonella* Enteritidis, Heidelberg e Typhimurium oriundos de fígados e ovos. Sorovares de *Salmonella* Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund e Typhimurium oriundas de amostras ambientais não apresentam os genes plasmidiais *spvC* e *prot6E*.

Palavras chaves: avicultura, PCR em tempo real, plasmídeos, virulência.

### DETECTION OF PLASMIDAL GENES *spvC* AND *prot6E* OF *Salmonella enterica* FROM POULTRY CHAIN SAMPLES

### ABSTRACT

*Salmonella* virulence involves several factors, including plasmid genes, which may confer increase of virulence and adaptation to new hosts. The present work was developed to detect the plasmid genes *spvC* and *prot6E* in samples of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Gallinarum, Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund and Typhimurium from poultry sources. *Salmonella* isolates obtained from organs of sick birds, eggs and the environment of the poultry chain were submitted to real-time PCR to investigate the presence of the plasmid genes *spvC* and *prot6E*. Of the 47 isolates, 15 (31.9%) were positive for the *spvC* gene, three Enteritidis, one Typhimurium and 11 Gallinarum; five (10.6%) for the *prot6E* gene, three Enteritidis, one Typhimurium and one Heidelberg. It is concluded that *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium and Gallinarum isolated from the organs of birds and eggs contain the *spvC* genes. The *prot6E* gene was detected in *Salmonella* Enteritidis, Heidelberg and Typhimurium from livers and eggs. *Salmonella* Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund and Typhimurium serovars from environmental samples do not have the plasmid genes *spvC* and *prot6E*.

Keywords: PCR in real time, plasmids, poultry, virulence.

## 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella enterica* é considerada pela Organização Mundial de Saúde (WHO), uma das causas mais frequentes de doenças diarreicas em humanos no mundo, atingindo aproximadamente uma a cada 10 pessoas, ocasionados principalmente devido ao consumo de alimentos contaminados<sup>1</sup>. Este patógeno se destaca, tanto por seu impacto na saúde pública, quanto pelos prejuízos econômicos gerados à produção avícola.

Na cadeia avícola brasileira, estudos apontam para a presença de diversos sorovares de *Salmonella enterica*, que apesar de apresentarem alto grau de similaridade genética, estão associados às manifestações clínicas distintas, como doença entérica ou sistêmica, além de determinar diferentes graus de morbidade e mortalidade, dependendo das características patogênicas e especificidade aos hospedeiros<sup>2</sup>.

Com relação aos hospedeiros, *Salmonella enterica* pode ser classificada pela especificidade ao homem, como *Salmonella* Typhi. Especificidade à espécie animal como *Salmonella* Pullorum e Gallinarum, sendo estes específicos das aves. E ainda, os sorovares que não apresentam especificidade, adaptando-se tanto aos homens quanto a outras espécies animais, apresentando assim, potencial zoonótico, como *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium<sup>3,4</sup>.

A especificidade dos sorovares aos hospedeiros e as características patogênicas ainda não estão completamente compreendidas, mas sabe-se que a virulência envolve múltiplos fatores, sendo muitas vezes específicos para cada sorovar<sup>2</sup>. Dentre esses fatores, destacam-se os plasmídeos, os elementos genéticos móveis, que estão ligados ao aumento da diversidade genética, devido à aquisição ou perda de genes, que podem ser trocados horizontalmente entre populações bacterianas<sup>5</sup>, e ao aumento da virulência<sup>6</sup>.

*Salmonella* possui um importante fator de virulência codificado por plasmídeos, chamado de *Salmonella plasmid virulence* (spv), detendo genes considerados essenciais para o ciclo de vida intracelular<sup>7</sup> e que estão relacionadas à capacidade de auxiliar no crescimento, sobrevivência e multiplicação da bactéria<sup>6</sup>. Especificamente, o gene *spvC* está envolvido na regulação da liberação de citocinas e no crescimento da bactéria nas células infectadas<sup>8,9</sup>. Dessa forma, o plasmídeo *spv* está associado a características gerais de virulência, sendo presente em diversos sorovares da espécie *enterica*, como Enteritidis, Gallinarum e Typhimurium<sup>7</sup>.

Por outro lado, alguns genes plasmidiais são exclusivos de determinados sorovares e apresentam funções de virulência mais específicas. Como, o gene plasmidial *prot6E*, até então relatado apenas em *Salmonella* Enteritidis, e que possui funções específicas

relacionadas aos órgãos reprodutores das aves, como colonização do oviduto e interação com os componentes do albúmen do ovo, sendo um dos genes que relaciona a frequente detecção de *Salmonella* Enteritidis à contaminação de ovos<sup>10,11</sup>.

Devido às características de especificidade ou generalidade dos genes plasmidiais, a análise do perfil de plasmídeos tem sido útil para a identificação de genes, compreensão das suas funções, verificação da sua permanência frente a fatores adversos<sup>12</sup> e caracterização de muitos sorovares de *Salmonella*<sup>13</sup>.

Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de detectar os genes plasmidiais *spvC* e *prot6E*, em amostras de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, Gallinarum, Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund e Typhimurium provenientes de fontes avícolas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local e período

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Bacteriologia e de Diagnóstico Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG), do ano 2016 e primeiro semestre de 2017. Com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFG, protocolo registro -45/2016 CEUA/UFG.

### 2.2. Amostragem

Foram analisados 47 isolados de *Salmonella*, sendo quatro do sorovar Enteritidis, 13 do sorovar Gallinarum, cinco sorovar Heidelberg, 10 sorovar Infantis, 11 sorovar Schwarzengrund e quatro do sorovar Typhimurium, previamente tipificados pela Fiocruz – Rio de Janeiro.

Os isolados pertencem a coleção de cultura do Laboratório de Bacteriologia do departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, estavam estocados em ágar nutriente, em geladeira e foram gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Andrade.

Cada um dos isolados era oriundo de amostras pertencentes à cadeia avícola goiana, obtidos entre os anos de 2014 a 2017, originados de órgãos de aves, ovos e ambiente. Não foram utilizados, em hipótese alguma, isolados pertencentes a uma mesma propriedade, ave ou caso clínico. Como discriminado no Quadro 1.

QUADRO 1- Isolados de *Salmonella enterica* utilizados no presente estudo

| <i>Salmonella</i><br>sorovar | Amostras |    |      |             |    |      |                     |    |      |
|------------------------------|----------|----|------|-------------|----|------|---------------------|----|------|
|                              | Aves     | Nº | Ano  | Ovos        | Nº | Ano  | Ambiente            | Nº | Ano  |
| Enteritidis                  | Fígado   | 1  | 2016 | -           | -  |      | -                   | -  |      |
|                              | Fígado   | 3  | 2014 |             |    |      |                     |    |      |
| Gallinarum                   | Coração  | 1  | 2016 |             |    |      |                     |    |      |
|                              | Coração  | 1  | 2015 | Ovo de mesa | 1  | 2016 | -                   | -  |      |
|                              | Fígado   | 1  | 2017 | -           | -  |      | -                   | -  |      |
|                              | Fígado   | 4  | 2016 |             |    |      |                     |    |      |
|                              | Fígado   | 1  | 2015 |             |    |      |                     |    |      |
|                              | Baço     | 1  | 2017 |             |    |      |                     |    |      |
|                              | Baço     | 1  | 2016 | -           | -  |      | -                   | -  |      |
|                              | Ovário   | 2  | 2016 | -           | -  |      | -                   | -  |      |
| Heidelberg                   | -        | -  |      | Ovo líquido | 1  | 2016 | Suabe de fábrica    | 1  | 2014 |
|                              | -        | -  |      | Ovo de pata | 2  | 2015 | Farinha de vísceras | 1  | 2015 |
| Infantis                     | Fígado   | 2  | 2016 | -           | -  |      | Farinha de vísceras | 2  | 2016 |
|                              | Fígado   | 1  | 2015 |             |    |      | Farinha de vísceras | 1  | 2014 |
|                              |          |    |      | -           | -  |      | Farinha de carne    | 2  | 2016 |
|                              |          |    |      |             |    |      | Farinha de carne    | 2  | 2015 |
| Schwarzengrund               | -        | -  |      | Ovo de pata | 4  | 2015 | Suabe de fábrica    | 1  | 2016 |
|                              | -        | -  |      | -           | -  |      | Suabe de arrasto    | 1  | 2016 |
|                              | -        | -  |      | -           | -  |      | Farinha de carne    | 4  | 2016 |
|                              | -        | -  |      | -           | -  |      | Ração               | 1  | 2016 |
| Typhimurium                  | Excreta  | 1  | 2015 | Ovo de pata | 2  | 2015 | Calcário            | 1  | 2014 |

(-) representa ausência de amostra.

### 2.3. Extração do DNA

Previamente ao processo de extração do DNA, os isolados estocados em ágar nutriente foram submetidos a um novo enriquecimento bacteriano sendo transferidos para 2mL de caldo Selenito-Cistina e incubados a 37°C por 24h.

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o *kit* comercial de extração de plasmídeo, mini *kit* QIAGEN Plasmid (cat. Nos. 12123 e 12125), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

#### 2.4. Detecção dos genes por PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real para detecção dos genes plasmidiais, *spvC* e *prot6E*, foram realizados de acordo com Bugarel et al. (2011)<sup>14</sup> em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, Gallinarum, Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund e Typhimurium.

Os eluatos obtidos das amostras extraídas foram utilizados para realização do PCR em tempo real empregando o sistema TaqMan® o volume adotado foi de 20µL utilizando 4,6µL de água mili-Q, 10µL de Máster Mix (1x), 2µL de mix de IPC (10x), 0,4µL de IPC DNA (50x) e 1µL de oligonucleotídeos iniciadores (concentração 30mM) e sonda (concentração de 10mM) acrescentando 2µL de amostras de DNA. Como controle interno da reação em um dos poços da placa de 96 poços foi utilizado o IPC DNA com reagente bloqueador de IPC (*negative controlblocked* IPC, Life®) e outro com IPC DNA sem bloqueador. As amostras foram submetidas ao ensaio de presença e ausência em termociclador StepOne Plus (*Applied Biosystems*) nas condições: pré PCR a 60°C por 30 segundos seguida de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (fase de desnaturação) e 60°C por 1 minuto e 60°C por 30 segundos para extensão. Todas as reações foram feitas em duplicata. Para detecção dos genes pela PCR em tempo real empregou-se o sistema TaqMan®, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores para os genes: Quadro 2.

QUADRO 2- Oligonucleotídeos iniciadores para os genes *spvC* e *prot6E*

|                    |                                                  |
|--------------------|--------------------------------------------------|
| Gene <i>spvC</i>   | Fw: 5'-AATGAACTACGAAGTGGGCG -3'                  |
|                    | Rv: 5'-TCAAACGATAAAACGGTTCCTC -3'                |
|                    | Sonda: FAM-ATGGTGGCGAAATGCAGAGACAGGC - BHQ       |
|                    | Referência: Bugarel et al., (2011) <sup>14</sup> |
| Gene <i>prot6E</i> | Fw: 5'- ATATCGTCGTTGCTGCTTCC -3'                 |
|                    | Rv: 5'- CATTGTTCCACCGTCACTTTG -3'                |
|                    | Sonda: FAM-AGGCGCTCATCGGTCCTGCTGT-BHQ            |
|                    | Referência: Marlony et al., (2007) <sup>15</sup> |

#### 2.5. Análises estatísticas

Foi realizada estatística descritiva por meio da frequência dos dados.

### 3. RESULTADOS

Os resultados da PCR em tempo real das amostras de *Salmonella* Enteritidis, Gallinarum, Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund e Typhimurium de isolados de aves, ovos e ambiente estão discriminados na Tabela 1. Dos 47 isolados, 15 (31,9%) foram positivos para o gene *spvC* e cinco (10,6%) para o gene *prot6E*.

TABELA 1- Detecção dos genes *spvC* e *prot6E* em isolados de sorovares de *Salmonella* identificados de órgãos e ovos de aves e no ambiente

| <i>Salmonella</i><br>Sorovar | Origem    | Amostra             | Número de<br>isolados<br>utilizados | Positivos para gene<br><i>spvC</i> | <i>prot6E</i> |
|------------------------------|-----------|---------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------|
| Enteritidis                  | Ave       | Fígado              | 4                                   | 3                                  | 3             |
| Gallinarum                   | Ave       | Fígado              | 7                                   | 6                                  | -             |
|                              |           | Coração             | 2                                   | 1                                  | -             |
|                              |           | Baço                | 1                                   | 1                                  | -             |
|                              |           | Ovário              | 2                                   | 1                                  | -             |
|                              | Ovos      | Ovo de mesa         | 1                                   | 1                                  | -             |
| Heidelberg                   | Ovos      | Ovo líquido         | 1                                   | -                                  | 1             |
|                              |           | Ovos de pata        | 2                                   | -                                  | -             |
|                              | Ambiental | Farinha de vísceras | 1                                   | -                                  | -             |
|                              |           | Suabe fábrica       | 1                                   | -                                  | -             |
| Infantis                     | Aves      | Fígado              | 3                                   | -                                  | -             |
|                              | Ambiental | Farinha de vísceras | 3                                   | -                                  | -             |
|                              |           | Farinha de carne    | 4                                   | -                                  | -             |
| Schwarzengrund               | Ovos      | Ovos de pata        | 4                                   | -                                  | -             |
|                              | Ambiental | Suabe fábrica       | 1                                   | -                                  | -             |
|                              |           | Suabe de arrasto    | 1                                   | -                                  | -             |
|                              |           | Farinha de carne    | 4                                   | -                                  | -             |
|                              |           | Ração               | 1                                   | -                                  | -             |
| Typhimurium                  | Aves      | Excretas            | 1                                   | -                                  | -             |
|                              | Ovos      | Ovos de pata        | 2                                   | 1                                  | 1             |
|                              | Ambiental | Calcário            | 1                                   | -                                  | -             |
| Total                        |           |                     | 47                                  | 15                                 | 5             |

(-) representa amostra negativa.

### 4. DISCUSSÃO

#### 4.1 Detecção do gene *spvC*

O gene *spvC*, essencial para a sobrevivência intracelular<sup>7</sup> e apontado como um dos principais genes de virulência de *Salmonella*<sup>6</sup> foi detectado em órgãos de aves nos sorovares Enteritidis e Gallinarum e em ovos no sorovar Typhimurium. Este gene tem sido frequentemente relacionado aos sorovares de maior frequência, como *Salmonella* Enteritidis e

*Typhimurium* e também aos sorovares que são espécie-específicos como *Gallinarum*<sup>16</sup>. Enquanto os sorovares identificados com menor frequência, como *Salmonella* *Infantis*, geralmente são livres de genes plasmidiais<sup>17</sup>.

A ausência deste gene no sorovar *Infantis* foi observada neste estudo e pode ser respaldada por Diarra et al. (2014)<sup>18</sup> e Abd-Elghany et al. (2015)<sup>19</sup>, que também não detectaram o referido gene nesse sorovar, detectando apenas em *Salmonella* *Enteritidis* e *Typhimurium*, dentre os 17 e sete sorovares pesquisados, respectivamente. Por outro lado, Karacan e Akan (2019)<sup>20</sup> encontraram 20 amostras positivas para o gene *spvC* dos 224 (8,92%) isolados de *Salmonella* *Infantis* pesquisados. Esta diferença pode ser atribuída a maior quantidade de isolados pesquisados e também as características regionais dos sorovares que podem variar.

O gene *spvC* tem sido relacionado como responsável por infecção sistêmica em estudos experimentais<sup>21</sup>. Este fato pode ser sugestivo neste estudo, pois o gene foi detectado em amostras de órgãos de aves doentes, especialmente oriundas de amostra de fígados que, de acordo com Vohra et al. (2018)<sup>22</sup>, é um importante indicativo de infecção sistêmica, estando o plasmídeo *spv* fortemente associado a cepas que causam bacteremia<sup>23</sup>.

A detecção do gene *spvC*, em três dos quatro isolados pesquisados de *Salmonella* *Enteritidis*, se apoia nos resultados de Soto et al. (2006)<sup>24</sup>, Amini et al. (2010)<sup>25</sup> e Mkrtchyan et al. (2016)<sup>26</sup> que detectaram este gene na maioria dos isolados obtidos de órgãos e excretas de aves, inclusive de fígado. Bakshi et al. (2003)<sup>27</sup> observaram que as cepas de *Salmonella* *Enteritidis*, oriundos de fígados de frangos, que possuíam o plasmídeo de virulência, ao serem inoculadas via oral em galinhas causaram aumento de mortalidade entre 40 a 100% e aparecimento de sinais característicos de salmonelose. Enquanto as cepas que não possuíam o plasmídeo eram avirulentas e não foram capazes de causar mortalidade.

Em *Salmonella* *Typhimurium* e *Enteritidis* sabe-se que o plasmídeo de virulência, *spvC*, aumenta a taxa de crescimento dos microrganismos em locais além do intestino e ajuda na colonização de tecidos mais profundos<sup>19</sup>. Os plasmídeos envolvidos na virulência também estão relacionados à sobrevivência e ao crescimento da bactéria nas células hospedeiras, ao permitir que a bactéria persista nas células do sistema reticuloendotelial, como o baço e o fígado<sup>28</sup>. O que foi observado nesse estudo, para os sorovares *Enteritidis* e *Gallinarum*.

Dos 13 isolados de *Salmonella* *Gallinarum* analisados para a presença do gene *spvC*, 11 continham o gene e foram obtidos de amostras de órgãos de aves doentes, o que confirma a habilidade de *Salmonella* *Gallinarum*, com o gene *spvC*, de causar doença



sistêmica. A alta positividade deste gene em *Salmonella* Gallinarum também foi relatada por Mir et al. (2010)<sup>29</sup> e Pal et al. (2017)<sup>30</sup>.

As duas amostras de *Salmonella* Gallinarum que não apresentaram o gene de virulência foram isolados em 2015, em comparação com as amostras positivas que foram isoladas em 2016 e 2017. Esse fato pode ser atribuído ao tempo prolongado de armazenamento que pode levar a perdas dos genes de virulência<sup>31</sup>.

Para *Salmonella* Typhimurium, a detecção do gene em apenas uma amostra das quatro pesquisadas (25%), corresponde com o encontrado por Chaudhary et. al. (2015)<sup>21</sup> e com Ammar et al. (2016)<sup>32</sup>, que não detectaram o gene em 24 e em sete isolados do sorovar pesquisadas, respectivamente. No entanto, Li et al. (2017)<sup>5</sup> encontraram 55 dos 138 (39,9%) isolados de carne de frango crua positivos, sendo o gene *spvC* o mais detectado entre os genes plasmidiais pesquisados. O que pode estar associado ao fato do gene codificar um dos principais fatores para a virulência mediada por plasmídeos do sorovar Typhimurium<sup>33</sup> e por isso ser frequentemente detectado no sorovar, sobretudo nos que estão relacionados a infecção em animais e/ou contaminação de produtos.

Neste sorovar, a detecção do gene ocorreu em isolado oriundo de ovos de aves aparentemente saudáveis, o que implica na presença de aves portadoras assintomáticas ou contaminação dos ovos no momento da ovoposição pela passagem na cloaca. Sabe-se que este gene aumenta a possibilidade de sobrevivência do isolado fora do intestino, podendo sobreviver melhor em locais hostis, como o meio ambiente<sup>19</sup>.

Cepas bacterianas com maior capacidade de causar infecção sistêmica ou mesmo de contaminar ovos podem ser originadas de reservatórios ambientais<sup>34</sup>. No entanto, neste estudo, todos os isolados de *Salmonella enterica* oriundos de amostras ambientais como as rações e suabes ambientais (Tabela 1) não apresentaram os genes de virulência pesquisados. Por conseguinte, provavelmente os isolados não precisaram possuir ou expressar fatores de virulência para garantir a sobrevivência e/ou adaptação ao meio em que se encontravam. Já que a presença ou ausência de genes plasmidiais pode estar relacionada à expressão da virulência durante o processo infeccioso, adaptação da bactéria ao hospedeiro e ao ambiente intra ou extracelular. E advém da seleção, troca ou deleção dos genes considerados funcionais ou necessários para as diferentes situações<sup>35</sup>.

A possibilidade de troca e transferência de genes plasmidiais de virulência entre bactérias é considerada um potencial risco para a saúde, principalmente relacionado à possibilidade de adaptação a novos hospedeiros e aumento da patogenicidade<sup>5</sup>. O que torna a detecção de genes plasmidiais de virulência em sorovares diferentes dos relatados até o

momento, um fator preocupante, como ocorreu para a detecção do gene *prot6E*, neste trabalho.

#### 4.2 Detecção do gene *prot6E*

Este é o primeiro relato do gene *prot6E* em sorovares de *Salmonella* que não o Enteritidis, encontrado em literatura. O gene *prot6E* é considerado específico para o sorovar Enteritidis e relatado como importante para a patogenicidade do sorovar<sup>15,27,36</sup>. Dos quatro isolados de *Salmonella* Enteritidis pesquisados, um foi negativo para o gene *prot6E*, este resultado se aproxima do encontrado por González-Escalona et al. (2012)<sup>37</sup> que detectaram uma das três cepas testadas (33,3%) como negativa para o gene.

Não obstante, de modo geral tem sido relatada uma alta positividade para os isolados de *Salmonella* Enteritidis testadas para o gene *prot6E*<sup>15,36,38,39</sup>, como exemplificado por Hu et al. (2018)<sup>39</sup>, que obtiverem 97,4% de positividade para os 114 isolados de *Salmonella* Enteritidis testados. Ao mesmo tempo, nenhum sorovar diferente de Enteritidis, foi relatado como positivo para o gene, como exemplificado por Hu et al. (2018)<sup>39</sup> que relataram 100% de negativos dos 34 isolados de outras bactérias que não *Salmonella* e 35 isolados de *Salmonella* que não o sorovar Enteritidis, incluindo quase todos os sorovares utilizados na presente pesquisa, como a negatividade do sorovar Schwarzengrund relatado por Liu et al. (2016)<sup>40</sup>.

A alta positividade e a especificidade fazem com que os autores utilizem o gene *prot6E* como específico para detecção de *Salmonella* Enteritidis<sup>41,42</sup> e promove o desenvolvimento de testes para detecção rápida de *Salmonella* Enteritidis por PCR utilizando o gene *prot6E* como gene de detecção exclusiva do sorovar<sup>5</sup>. No entanto, *prot6E* está localizado em um plasmídeo, no qual são relatados casos que esse plasmídeo e/ou gene plasmidial estão ausentes em isolados de Enteritidis<sup>42</sup>, como observado nesta pesquisa. Ainda, a diversidade genética de isolados de diferentes áreas geográficas pode levar ao aparecimento de mutações nos genes plasmidiais, como relatado por Hu et al. (2019)<sup>42</sup> para o gene *prot6E*, o que pode levar a casos de falsos negativos<sup>15,37</sup>.

Ademais, a atribuição específica de genes plasmidiais, como o gene *prot6E*, com sorovares específicos, como o sorovar Enteritidis, não é recomendada. Pois, os genes transportados por um plasmídeo estão propensos a perdas ou modificações. Como observado para a presença do gene *prot6E* em um dos quatro isolados de *Salmonella* Typhimurium e um dos cinco isolados de *Salmonella* Heidelberg testados. Este resultado difere dos relatados por Marlony et al. (2007)<sup>15</sup>, Hadjinicolaou et al. (2009)<sup>36</sup>, Jamshidi et al. (2010)<sup>43</sup>, Chero et al.

(2017)<sup>41</sup>, Afshari et al. (2018)<sup>43</sup> e Hu et al. (2018<sup>39</sup>, 2019<sup>42</sup>) que expuseram não haver detecção do gene *prot6E* em isolados de sorovares que não Enteritidis.

Os isolados de *Salmonella* Heidelberg e Typhimurium positivos para o gene *prot6E* eram oriundos de ovos (Tabela 1). Os ovos podem ser fonte de infecção de *Salmonella* em humanos, sendo o sorovar Enteritidis o mais frequentemente encontrado em infecções alimentares por essa fonte<sup>44</sup>. Contudo, os sorovares Heidelberg e Typhimurium apresentam tropismo pelos tecidos do sistema reprodutor das aves e são cada vez mais associados a doenças alimentares causadas por ovos contaminados<sup>45</sup>.

Portanto, a presença do gene *prot6E* pode ter levado a adaptação e sobrevivência desses isolados ao ambiente da sua fonte de origem, de ovos líquidos e ovos de patas, pois o gene apresenta função específica para tal nicho. Segundo Clavijó et al. (2006)<sup>11</sup>, o gene *prot6E* pode fornecer fímbrias superficiais únicas para *Salmonella* Enteritidis e alterar sua interação com os componentes do albúmen do ovo, sendo considerado um dos fatores de virulência, que contribuem para a frequência mais acentuada deste sorovar na contaminação dos ovos e infecção do sistema reprodutor das aves de postura, quando comparada com outros sorovares, como *Salmonella* Heidelberg e Typhimurium.

No entanto, com o aumento da frequência destes sorovares em ovos e ovoprodutos em várias partes do mundo, pode-se sugerir que esteja havendo alterações nos fatores de virulência presentes nos sorovares Heidelberg e Typhimurium que culminem com melhor adaptação e capacidade de sobrevivência no sistema reprodutor das aves e nos ovos. Dentre esses fatores, os plasmídeos e genes plasmidiais são propensos a perdas e modificações e são mantidos dentro das populações bacterianas devido ao seu papel na mediação para melhor adaptação ao meio<sup>15</sup>, sendo uma hipótese a ser estudada. Além disso, estudos são necessários para compreensão mais profunda do gene *prot6E*, que ainda não tem suas características totalmente definidas (Hu et al., 2019)<sup>42</sup>.

Assim como há a necessidade de mais estudos nos isolados de *Salmonella* Heidelberg e Typhimurium com o gene *prot6E*, pois o achado desse gene em novos sorovares pode indicar uma possível troca genética entre as bactérias para adaptação a nichos específicos. Ainda são indispensáveis mais esforços que busquem investigar as funções específicas desse gene, assim como sua real contribuição na capacidade de sorovares de *Salmonella* causarem doença alimentar em humanos e assim elaborar medidas que reduzam os riscos do patógeno chegar até o consumidor final.

## 5. CONCLUSÕES

*Salmonella* Enteritidis, Typhimurium e Gallinarum isolados dos órgãos de aves e de ovos contem os genes *spvC*.

O gene *prot6E* é detectado nos sorovares *Salmonella* Enteritidis, Heidelberg e Typhimurium oriundos de amostras de ovos, este é provavelmente o primeiro relato do gene em sorovares que não o sorovar Enteritidis.

Sorovares de *Salmonella* Heidelberg, Infantis, Schwarzengrund e Typhimurium oriundas de amostras ambientais não apresentam os genes plasmidiais *spvC* e *prot6E*.

## REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization. *Salmonella* (non-typhoidal). 2018. [acesso: 20 ago 2018]. Disponível: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
2. Hannemann S, Galán JE. *Salmonella enterica* serovar-specific transcriptional reprogramming of infected cells. PLoS Pathog. 2017;24;13(7):e1006532.
3. Gast RK. *Salmonella* Infections. In: Saif YM, editor. Diseases of Poultry. 12th ed. Iowa: Blacwell; 2008. p.619-65.
4. OIE. World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code Prevention, Detection and Control of *Salmonella* in Poultry. Chapter 6.6. 2018b. [acesso 23 nov 2018] Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_prevent\\_salm onella.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_salm onella.pdf)
5. Li X, Liu L, Li Q, Xu G, Zheng J. *Salmonella* Enteritidis in Layer Farms of Different Sizes Located in Northern China: On-Farm Sampling and Detection by the PCR Method. Braz J Poultry Sci. 2017;19(3):377-86.
6. Hur J, Choi YY, Park JH, Jeon BW, Lee HS, Kim AR, Lee JH. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. Can J Vet Res. 2011;75(1):49-56.
7. Hooton SP, Timms AR, Cummings NJ, Moreton J, Wilson R, Connerton IF. The complete plasmid sequences of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium U288. Plasmid. 2014;76:32-9.
8. Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. Mol Microbiol. 1993;7(6):825-30.
9. Rodicio MR, Herrero A, Rodriguez I, Garcia P, Montero I, Beutlich Janine, Rodicio R, Guerra B, Mendoza MC. Acquisition of antimicrobial resistance determinants of virulence plasmids by specific serotypes of *Salmonella enterica* nontyphoid. Rev Med Microbiol. 2011;22(3):55-65.
10. Li S, Zhang Z, Pace L, Lillehoj H, Zhang S. Functions exerted by the virulence-associated type-three secretion systems during *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion into and survival within chicken oviduct epithelial cells and macrophages. Avian Pathol. 2009;38(2):97-106.
11. Clavijo RI, Loui C, Andersen GL, Riley LW, Lu S. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. Appl Environ Microbiol. 2006;72(2):1055-64.
12. Mezal EH, Sabol A, Khan M, Ali N, Stefanova R, Khan AA. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. Food microbio. 2014;38:67-74.

13. Oluduro AO, Thonda OA, Kolawole DO. Phenotypic and Molecular Characterization of *Salmonella* serotypes in cow milk and milk products in Nigeria. *Afr. J. Biotechnology*. 2014;13:3774 -3789.
14. Bugarel M, Granier SA, Weill F-X, Fach P, Brisabois A. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *BMC microbiology*. 2011;11(1):1.
15. Mar Marlony B, Bunge C, Helmuth R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *J Microbiol Methods*. 2007;70(2):245-51.
16. Crăciunaș C1, Keul AL, Flonta M, Cristea M. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hila*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. *J Environ Manage*. 2012;95.
17. Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*, *J. Vet. Microbiol*. 2006;112:1-10.
18. Diarra MS, Delaquis P, Rempel H, Bach S, Harlton C, Aslam M, Pritchard J, Topp E. Antibiotic resistance and diversity of *Salmonella enterica* serovars associated with broiler chickens. *J Food Prot*. 2014;77(1):40-9.
19. Abd-Elghany SM, Sallam KI, Abd-Elkhalek A, Tamura T. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol Infect*. 2015;143(5):997-1003.
20. Karacan Sever N, Akan M. Molecular analysis of virulence genes of *Salmonella* Infantis isolated from chickens and turkeys. *Microb Pathog*. 2019;6:199-204.
21. Chaudhary JH, Nayak JB, Brahmabhatt MN, Makwana PP. Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughter house environment in Ahmedabad, Gujarat. *Vet. World*. 2015;8(1):121-4.
22. Vohra P, Bugarel M, Turner F, Loneragan GH, Hope JC, Hopkins J, Stevensa MP. Quantifying the Survival of Multiple *Salmonella enterica* Serovars In Vivo via Massively Parallel Whole-Genome Sequencing To Predict Zoonotic Risk. *Appl. Environ. Microbiol*. 2018;84:1-13.
23. Guiney DG, Fierer J. The Role of the *spv* genes in *Salmonella* Pathogenesis. *Front Microbiol*. 2011;14;2:129.
24. Soto SM, Rodriguez I, Rodicio MR, Vila J, and Mendoza MC. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. *J Med Microbiol* 2006;55:365–373.
25. Amini K, Salehi TZ, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei SB. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. *Afr. J. Microbiol. Res*. 2010;4(21):2202-10.
26. Mkrtchyan MS, Zakharyan MK, Arakelova KA, Sedrakyan AM, Gevorgyan ZU, Ktsoyan ZA. Molecular determinants of virulence genes of *Salmonella* Enteritidis prevailing in Armenia. *Chem Biol*;2016;1:55–60.

27. Bakshi CS, Singh VP, Malik M, Singh RK, Sharma B. 55 kb plasmid and virulence-associated genes are positively correlated with *Salmonella* Enteritidis pathogenicity in mice and chickens. *Vet Res Commun*. 2003;27(6):425-32.
28. Swamy SC, Barnhart HM, Lee MD, Dreesen DW. Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(10):3768-71.
29. Mir IA, Wani SA, Hussain I, Qureshi SD, Bhat MA, Nishikawa Y. Molecular epidemiology and in vitro antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from poultry in Kashmir. *Rev Sci Tech*. 2010;29(3):677-86.
30. Pal S, Dey S, Batabyal K, Banerjee A, Joardar SN, Samanta I, Isore DP. Characterization of *Salmonella* Gallinarum isolates from backyard poultry by polymerase chain reaction detection of invasion (*invA*) and *Salmonella* plasmid virulence (*spvC*) genes. *Vet World*. 2017;10(7):814-817
31. Chosa H, Makino S, Sasakawa C, Okada N, Yamada M, Komatsu K, Suk JS, Yoshikawa M. Loss of virulence in *Shigella* strains preserved in culture collections due to molecular alteration of the invasion plasmid. *Microb Pathog*. 1989;6(5):337-42.
32. Ammar AM1, Mohamed AA, Abd El-Hamid MI, El-Azzouny MM. Virulence genotypes of clinical *Salmonella* Serovars from broilers in Egypt. *J Infect Dev Ctries*. 2016;28;10(4):337-46.
33. Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA. Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J Bacteriol*. 2001;183(15):4652-8.
34. Henzler DJ, Kradel DC, Sisco WM. Management and environmental risk factors for *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs. *Am J Vet Res*. 1998;59(7):824-9.
35. Chu C, Feng Y, Chien AC, Hu S, Chu CH, Chiu CH. Evolution of genes on the *Salmonella* virulence plasmid phylogeny revealed from sequencing of the virulence plasmids of *S. enterica* serotype Dublin and comparative analysis. *Genomics*. 2008;92(5):339-43.
36. Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Emmanue MA, Kakoyiannis CK, Kostrikis LG. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. *BMC Microbiol*. 2009;9: 97.
37. González-Escalona N, Zhang G, Brown EW. Multiplex TaqMan real-time pcr (qPCR) assay targeting *prot6E* and *invA* genes for fast and accurate detection of *Salmonella* Enteritidis. *Salmonella-A diversified superbug*, InTech. 2012;27.
38. Campioni F, Moratto Bergamini AM, Falcão JP. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiol*. 2012;32(2):254-64

39. Hu L, Ma LM, Zheng S, He X, Hammack TS, Brown EW, Zhang G. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella* ser. Enteritidis from egg products. Food control. 2018;88:190-7. Liu et al. (2016).
40. Chero AO, Rosadio RA, Marcelo GM, Díaz GO, Jiménez RA, Castro YG, Maturrano LH. Identificación Molecular de *Salmonella* Typhimurium en Cuyes al Primer Parto mediante la Técnica de PCR Múltiple. Rev Inv Vet Perú 2017; 28(3):679-686. Spanish.
41. Afshari A, Baratpour A, Khanzade S, Jamshidi A. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium identification in poultry carcasses. Iran J Microbiol. 2018;10(1): 45–50.
42. Hu L, Stones RM, Brown EW, Allard MW, Zhang G. DNA sequences and predicted protein structures of *prot6E* and *sefA* genes for *Salmonella* ser. Enteritidis detection. Food Control. 2019;96:271-80.
43. Jamshidi A, Kalidari GA, Hedayati M. Isolation and Identification of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from the eggs of retail stores in mashhad, iran using conventional culture method and multiplex PCR assay. J Food Safety. 2010;30:558–68.
44. Wright A., Richardson L, Mahon B, Rothenberg R., ColeD. The rise and decline in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis outbreaks attributed to egg-containing foods in the United States, 1973-2009. Epidemiol Infect. 2016;144(4):810–9.
45. Gast RK, Guraya R, Jones DR, Guard J, Anderson KE, Karcher DM. Colonization of internal organs by *Salmonella* serovars Heidelberg and Typhimurium in experimentally infected laying hens housed in enriched colony cages at different stocking densities. Poult Sci. 2017;1;96(5):1402-1409.



### CAPÍTULO 3. SALMONELOSE EXPERIMENTAL POR *Salmonella* GALLINARUM COM E SEM O GENE *spvC* EM EMBRIÕES E NEONATOS DE POSTURA COMERCIAL

#### RESUMO

*Salmonella* Gallinarum causa tifo aviário, importante doença para indústria avícola. O presente estudo visa investigar se a presença do gene *spvC*, no sorovar Gallinarum, é capaz de determinar mortalidade embrionária, afetar a qualidade do neonato e do pinto, os parâmetros de produção e causar doença sistêmica em aves jovens. Foram incubados 336 ovos férteis de aves poedeiras Hy Line W 36, distribuídos em quatro vias de inoculação, alantóide com um (T1-3) e com 14 dias de incubação (T4-6); via câmara de ar com 19 dias de incubação (T7-9) e via oral em neonatos (T10-12). Cada via de inoculação continha três tipos de inóculo, solução salina para tratamento controle (T1, 4, 7 e 9), *Salmonella* Gallinarum sem o gene *spvC* (T2, 5, 8, 11) e Gallinarum com o gene *spvC* (T3, 6, 9 e 12), totalizando 12 tratamentos. Foram analisadas as variáveis de mortalidade embrionária, relação peso neonato/peso ovo, qualidade do neonato, pesquisa de *Salmonella* e biometria dos órgãos. Foi observada alta mortalidade dos grupos inoculados com *Salmonella* Gallinarum via alantóide com um e 14 dias de incubação. Não foi observada mortalidade embrionária, alterações na relação peso neonato/peso ovo e alterações na qualidade do neonato para as aves inoculadas via câmara de ar. *Salmonella* foi recuperada de todos os órgãos das aves inoculadas por esta via. Para o grupo inoculado via oral, o patógeno sem o gene foi recuperado no ceco e o com o gene foi recuperado de baço e ceco. A inoculação de *Salmonella* levou a alteração na biometria do coração e intestino. Conclui-se que *Salmonella* Gallinarum foi capaz de causar mortalidade embrionária, causar disseminação e alterar ganho de peso. Para as aves inoculadas pela via oral, a presença do gene *spvC* determinou infecção entérica e sistêmica, enquanto o isolado sem o gene apenas infecção entérica.

Palavras-chaves: Avicultura, genes de virulência, poedeira, tifo aviário.

#### EXPERIMENTAL SALMONELLOSIS BY *Salmonella* GALLINARUM WITH AND WITHOUT THE *spvC* GENE IN EMBRYOS AND NEONATES OF LAYING GENETIC LINE

#### ABSTRACT

*Salmonella* Gallinarum causes fowl typhoid, a disease that causes economic damage to the poultry industry. The present experiment was developed to investigate whether the presence of the *spvC* gene in the Gallinarum serovar is able to determine embryonic mortality, affect the quality of the neonate and the chick, the production parameters and cause systemic disease in young birds. A total of 336 fertile eggs of Hy Line W 36 laying hens were distributed in four inoculation routes, allantoic inoculation with one (T1-3) and 14 days incubation (T4-6), inoculation in the air chamber with 19-day incubation (T7-9) and oral inoculation in neonates (T10-12). Each inoculation route contained three types of inoculum, saline solution for control treatment (T1, 4, 7 and 9), *Salmonella* Gallinarum without the *spvC* gene (T2, 5, 8, 11) and *Salmonella* Gallinarum with the *spvC* gene (T3, 6, 9 and 12), totaling 12 treatments. The variables of embryonic mortality, neonatal weight / egg weight ratio, neonatal quality, *Salmonella* Gallinarum research and organ biometry were analyzed. High mortality of the groups inoculated with *Salmonella* Gallinarum in allantoic was observed with one and 14 days of incubation. No embryonic mortality, changes in neonatal weight / egg weight and changes in neonatal quality were observed for birds inoculated through a 19-day air chamber. *Salmonella* was recovered from all organs of the birds inoculated in the air chamber. For the

group inoculated orally, the pathogen without the gene was recovered in the cecum and with the gene was recovered from spleen and cecum. *Salmonella* inoculation led to changes in the biometry of the heart and intestine. It is concluded that *Salmonella Gallinarum* was able to cause embryonic mortality, cause dissemination and alter weight gain. For birds inoculated by the oral route, the presence of the *spvC* gene determined enteric and systemic infection, whereas the isolate without the gene determined just enteric infection.

*Keywords:* Fowl typhoid, laying, poultry, virulence genes.

## 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella* Gallinarum é um sorovar específico das aves, causadora do tifo aviário, doença sistêmica e grave, que pode ser observado em aves jovens e adultas, com alta mortalidade dependendo da cepa infectante<sup>1</sup>.

O tifo aviário tem distribuição global, sendo endêmica em muitas partes do mundo<sup>2</sup> e resulta em diversas perdas econômicas, principalmente em países em desenvolvimento<sup>3</sup>, ocasionando nos últimos anos, a retomada no interesse em *Salmonella* Gallinarum<sup>4</sup>. No Brasil, a partir de 1994, com a implantação do Plano Nacional de Saúde Avícola (PNSA), a avicultura brasileira apresentou diversos avanços com relação à saúde dos plantéis, sendo as salmonelas tíficas (*Salmonella* Gallinarum e Pullorum) praticamente erradicadas. Por outro lado, nos últimos anos têm se observado uma re-emergência de infecções tifóides na avicultura de corte e de postura em vários estados brasileiros<sup>5</sup>.

A re-emergência e a propagação do tifo aviário em nível nacional sugerem o envolvimento da transmissão vertical e da incubação de ovos infectados com *Salmonella* Gallinarum, os quais podem originar progênie contaminada, tornando-se dessa maneira, potenciais fontes de disseminação<sup>5</sup>. As principais fontes de infecção por *Salmonella* em aves de produção, consistem na aquisição de progênies infectadas de matrizes portadoras, infecção cruzada no incubatório e contaminação ambiental nos galpões de criação<sup>6</sup>.

A patogenicidade de *Salmonella* está associada a diversos fatores de virulência, com destaque para o plasmídeo de virulência chamado *Salmonella plasmid virulence* (*spv*), que contem cinco genes de virulência (*spvRABCD*) envolvidos na sobrevivência em macrófagos e na disseminação sistêmica do patógeno<sup>7,8</sup>. Especificamente, o gene *spvC* está relacionado à regulação da liberação de citocinas e com o crescimento bacteriano nas células infectadas, sendo de ocorrência frequente no sorovar Gallinarum<sup>9,10</sup>.

Os patógenos espécie-específicos, *Salmonella* Gallinarum, geralmente estão relacionados com a forma mais grave da doença e apresentam equilíbrio entre a aquisição e a perda de genes que pode alterar a virulência dos sorovares<sup>11</sup>. Além disso, a aquisição de genes plasmidiais de virulência pode levar a adaptação a novos hospedeiros<sup>12</sup>.

No entanto, esses mecanismos genéticos ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo necessário maior entendimento do processo de adaptação do hospedeiro, da evolução do patógeno e da interação de *Salmonella* Gallinarum com as aves, propiciando a partir de uma mais ampla compreensão a cerca do tema, a elaboração de novas abordagens de controle e erradicação da doença na avicultura<sup>4,13</sup>.

Com base no exposto, com o presente estudo objetivou-se investigar se a presença do gene *spvC*, no sorovar *Gallinarum*, é capaz de determinar mortalidade embrionária, afetar a qualidade do neonato e pinto, os parâmetros de produção e causar doença sistêmica em aves jovens.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia e no Núcleo Experimental de Doença de Aves do Setor de Medicina Veterinária Preventiva, do Departamento de Medicina Veterinária, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG, com número de protocolo registro CEUA/UFG 045/2016.

### 2.2 Caracterização do isolado

Foram utilizados dois isolados de *Salmonella* *Gallinarum*, um contendo o gene *spvC* e o outro não, provenientes de órgãos de aves poedeiras que apresentaram doença clínica, estocados em ágar nutriente em refrigeração durante os anos de 2015 e 2016, respectivamente. Tais isolados compõem o acervo do Laboratório de Bacteriologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da EVZ/UFG, foram tipificados pelo laboratório FIOCRUZ – RJ e gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Andrade.

A detecção da presença ou ausência do gene *spvC* por PCR em tempo real nos isolados de *Salmonella* *Gallinarum* ocorreu previamente a pesquisa em parceria com o laboratório de diagnóstico molecular do Departamento de Medicina Veterinária da EVZ/UFG.

### 2.3 Protocolo de inoculação

Para preparação do inóculo os dois isolados foram repicados em ágar verde brilhante, separadamente, para purificação e incubados em temperatura de 37°C por 24 horas.

As unidades formadoras de colônia (UFC) foram então suspensas em solução salina tamponada a 0,85% e a concentração ajustada com auxílio da escala Mac Farland<sup>15</sup> e confirmada por plaqueamento das diluições seriadas em ágar verde brilhante, com as placas incubadas em temperatura de 37°C por 24 horas e contagem das UFC da *Salmonella* *Gallinarum*, em que foi obtida a diluição de  $1 \times 10^2$  para inoculação em ovos embrionados, via alantóide e câmara de ar, e em neonatos via oral.

Para inoculação dos ovos dos tratamentos 1 a 9, estes foram submetidos à ovoscopia para marcação da região do alantóide ou câmara de ar, foi realizada assepsia da região marcada e a perfuração ocorreu com agulhas esterilizadas e em capela de fluxo laminar.

Para os tratamentos 10 a 12, a inoculação foi realizada com o auxílio de uma seringa e o inóculo foi depositado diretamente no inglúvio dos neonatos, individualmente.

## 2.4 Delineamento experimental

Foram incubados 378 ovos férteis de aves poedeiras Hy Line W 36 obtidos de um incubatório comercial. Antes da incubação, os ovos foram classificados para atender as características necessárias para incubação, de acordo os critérios sugeridos por Patrício (2013)<sup>15</sup> de ovos livres de anomalias como deformidades, trincados, quebrados ou sujos. E foi realizada a ovoscopia para retirada de ovos claros ou inférteis.

Os ovos foram distribuídos, inteiramente ao acaso, em doze tratamentos com 28 ovos por tratamento, totalizando 336 ovos que foram incubados até a eclosão, ou durante 22 dias (504 horas).

Nos tratamentos 1, 2 e 3, os ovos embrionados foram inoculados via alantóide no primeiro dia de incubação. No tratamento 1 (controle da inoculação via alantóide com um dia), os ovos foram inoculados com 0,1mL de solução salina esterilizada tamponada. No tratamento 2 os ovos embrionados foram inoculados com 0,1mL de solução contendo  $10^2$  UFC de *Salmonella* Gallinarum sem o gene *spvC*. No tratamento 3 os ovos embrionados foram inoculados com 0,1mL de solução contendo  $10^2$  UFC de *Salmonella* Gallinarum com o gene *spvC*.

Nos tratamentos 4, 5 e 6, os ovos embrionados foram inoculados via alantóide com 14 dias de incubação, seguindo o mesmo esquema descrito para os ovos dos tratamentos 1, 2 e 3, sendo o tratamento 4 o controle sem inoculação de *Salmonella*, o tratamento 5 inoculado com *Salmonella* Gallinarum sem o gene *spvC* e o tratamento 6 inoculado com *Salmonella* Gallinarum com o gene *spvC*.

Nos tratamentos 7, 8 e 9, os ovos embrionados foram inoculados via câmara de ar com 19 dias de incubação. No tratamento 7 (controle da inoculação via câmara de ar), os ovos embrionados foram inoculados com 0,1mL de solução salina esterilizada tamponada. No tratamento 8 (inoculado com *Salmonella* Gallinarum sem o gene via câmara de ar) os ovos embrionados foram inoculados com 0,1mL de solução contendo  $10^2$  UFC de *Salmonella* Gallinarum sem o gene *spvC*. No tratamento 9 (inoculado com *Salmonella* Gallinarum com o

gene via câmara de ar) os ovos embrionados foram inoculados com 0,1mL de solução contendo  $10^2$  UFC de *Salmonella* Gallinarum com o gene *spvC*.

Nos tratamentos 10, 11 e 12 a inoculação do patógeno ocorreu após a eclosão dos pintos com um dia de vida (neonatos), sendo 19 aves por tratamento. No tratamento 10 (controle da inoculação via oral), os neonatos foram inoculados com 0,1mL de solução salina esterilizada tamponada. No tratamento 11 (inoculado com *Salmonella* Gallinarum sem o gene) os neonatos foram inoculados via oral com 0,1mL de solução contendo  $10^2$  UFC de *Salmonella* Gallinarum sem o gene *spvC*. No tratamento 12 (inoculado com *Salmonella* Gallinarum com o gene por via oral) os neonatos foram inoculados com 0,1mL de solução contendo  $10^2$  UFC de *Salmonella* Gallinarum com o gene *spvC*.

## 2.5 Variáveis estudadas

### 2.5.1 Eclodibilidade dos ovos férteis

Aos 22 dias, após 504 horas de incubação, os ovos que não eclodiram foram quebrados e avaliados para determinar a fase de desenvolvimento embrionário em que ocorreu a morte.

A eclodibilidade dos ovos férteis foi calculada pelo número de ovos eclodidos divididos pelo número de ovos férteis e o resultado multiplicado por 100:  $E = (NE/NF) \times 100$ .

A mortalidade embrionária foi dada pela equação: mortalidade embrionária =  $100 - [(NE/NF) \times 100]$ , sendo E= eclodibilidade, NE= número de ovos eclodidos e NF= número de ovos férteis incubados.

### 2.5.2 Relação entre o peso do neonato e o peso do ovo

Os ovos dos tratamentos inoculados durante a incubação na câmara de ar (T7, 8 e 9) foram pesados antes da incubação, marcados para identificação e colocados em sacos de telas, com espaço suficiente para eclosão. Após a eclosão, o neonato foi pesado e foi calculada a relação entre seu peso e o peso do ovo.

### 2.5.3 Qualidade do neonato

A avaliação individual da qualidade de cada neonato dos tratamentos inoculados durante a incubação na câmara de ar (T7, 8 e 9) foi realizada com a atribuição das notas para cada variável, seguindo os escores de característica desejável, mediana e indesejável como descrito no Quadro 1.

Esses escores foram aplicados a cada neonato antes da transferência da incubadora para as gaiolas de criação. Os dados foram então condensados para formar uma média para cada tratamento.

QUADRO 1: Quadro explicativo das variáveis e suas definições, características e escores de avaliação de parâmetros de qualidade de neonatos, de acordo com Tona et al. (2003)<sup>16</sup>.

| Variável              | Definição                                                                                                                                                        | Características                                                              | Escore       |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Atividade             | Verificada quando se coloca o pintainho de costas. Um rápido retorno à posição em pé é definida como boa. Se permanecer deitado, é fraca.                        | Bom<br>Médio<br>Fraco                                                        | 16<br>8<br>0 |
| Penugem               | A aparência deve ser limpa e seca. Se estiver úmida e suja, ou ambas é classificada como ruim.                                                                   | Limpa e seca<br>Limpa e úmida<br>Suja e úmida                                | 12<br>6<br>0 |
| Olhos                 | Coloca-se o pintainho em pé e observam-se seus olhos, o brilho e a extensão que ocupa a pálpebra.                                                                | Abertos e brilhantes<br>Abertos e sem brilho<br>Fechados                     | 10<br>5<br>0 |
| Umbigo                | Examina-se a área do umbigo e ao redor dele, verificando-se o seu fechamento e sua cor. Se a cor for diferente da cor da pele, registra-se como de má qualidade. | Fechado e limpo<br>Fechamento incompleto, cor normal<br>Aberto e cor anormal | 12<br>6<br>0 |
| Membrana remanescente | Na área do umbigo avalia-se o tamanho de uma possível membrana remanescente.                                                                                     | Sem membrana<br>Pequena<br>Grande                                            | 12<br>6<br>0 |
| Abdômen               | Examina-se o abdômen do pintainho visualmente. Se estiver grande é classificado como ruim.                                                                       | Normal<br>Médio<br>Distendido                                                | 12<br>6<br>0 |
| Pernas                | O pintainho é colocado em pé para determinar se permanece firme nessa posição. É examinada a conformação dos dedos e da articulação do joelho.                   | Pernas/dedos e articulações normais<br>Uma afetada<br>Duas afetadas          | 10<br>5<br>0 |
| Canelas               | Observam-se o brilho e a cor da canela. A normal deve ser avermelhada e brilhante.                                                                               | Brilhante, avermelhada<br>Brilhante e pálida<br>Opaca e pálida               | 16<br>8<br>0 |

#### 2.5.4 Avaliação clínica e anatomopatológica

As aves dos grupos que eclodiram foram avaliadas diariamente até os 28 dias de vida, quando ocorreu a necropsia. Os principais sinais clínicos foram anotados em uma ficha própria, assim como a mortalidade. Foi realizada necropsia em duas aves dos tratamentos controles (T7 e T10) e em cinco aves dos tratamentos contaminados por *Salmonella Gallinarum* sem e com gene *spvC* (T8, T9, T11 e T12).

As 24 aves foram pesadas e eutanasiadas por meio do uso de gás CO<sub>2</sub> seguido de deslocamento cervical, as lesões macroscópicas anotadas, os órgãos retirados, pesados e processados para pesquisa de *Salmonella*.

#### 2.5.5 Biometria dos órgãos das aves necropsiadas

Durante a necropsia, as aves e os órgãos foram pesados para obtenção do peso relativo, que é o peso do órgão dividido pelo peso da ave e multiplicado por 100. O baço, fígado, coração e intestino foram pesados assepticamente e individualmente em balança de precisão (0,00g), antes de serem devidamente separados para análises bacteriológicas.

#### 2.5.6 Pesquisa de *Salmonella* Gallinarum nos órgãos

As amostras foram processadas de acordo com a metodologia descrita por Georgia Poultry Laboratory (1997)<sup>17</sup>, com modificações.

Foi realizada a pesquisa do patógeno no baço, coração, fígado com vesícula biliar, e conteúdo do ceco com tonsila cecal, que foram processados, individualmente. Cada órgão foi macerado em placas de Petri esterilizadas e colocado aproximadamente um grama da amostra em tubos de rosca contendo água peptonada 1% na proporção de 1:10.

As amostras em água peptonada foram incubadas a 37°C por 24h, depois transferidos 1,0 mL dessa solução para 9,0 mL de caldo selenito cistina (CS) e 0,1 mL para 10,0 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e incubadas a 37°C por 24h. Em seguida, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas foram plaqueadas em duplicata por esgotamento em estrias nos ágar verde brilhante e Hektoen e incubados a 37°C por 24h.

Foram então selecionadas de três a cinco UFC com características morfológicas de *Salmonella* e transferidas para tubos contendo triplice açúcar ferro (TSI) e incubados a 37°C por 24h. Os tubos de TSI com crescimento sugestivo da bactéria foram submetidos a testes bioquímicos para comprovação, sendo estes: teste de urease, produção de indol, vermelho metila, motilidade, descarboxilase de lisina, malonato e citrato de Simmons.

#### 2.6 Análises estatísticas

As frequências foram comparadas pelo Teste Exato de Fischer. Para as variáveis numéricas, as paramétricas foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott e as não paramétricas o Teste de Kruskal-Wallis. Foi adotado nível de 0,05 de significância em todos os testes e foi utilizado o auxílio do *software* R (Core Development Core Team, 2018).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada mortalidade de 100% dos embriões inoculados na cavidade alantóide no primeiro dia de incubação, com os isolados de *Salmonella* Gallinarum contendo ou não o gene *spvC* (T2 e T3). Também foi constatada alta mortalidade para os embriões inoculados na cavidade alantóide com 14 dias de incubação, com mortalidade de 96,4% (27/28) dos embriões inoculados com *Salmonella* Gallinarum sem o gene (T5) e 100% (28/28) com o gene *spvC* (T6).

O mesmo foi relatado por Celis-Estupiñan et al., (2017)<sup>5</sup> que obtiveram mortalidade embrionária de 100% após inoculação de *Salmonella* Gallinarum em saco vitelínico dos ovos de pintainhas de postura no primeiro dia de incubação, no intuito de simular a transmissão vertical pela contaminação dos folículos ovarianos. Por outro lado, Prosdócimo et al. (2011)<sup>18</sup> relataram mortalidade de aproximadamente 29% em ovos embrionados inoculados via cavidade alantóide com 11 dias de incubação, mesmo assim pode-se considerar como uma mortalidade embrionária significativa, pois os autores utilizaram o inóculo contendo a concentração de  $10^1$  UFC de *Salmonella* Gallinarum.

A alta mortalidade embrionária de ovos férteis contaminados com *Salmonella* Gallinarum é relatada em literatura<sup>6</sup>. Geralmente, as inoculações experimentais são realizadas com alta concentração do patógeno, como Celis-Estupiñan et al., (2017)<sup>5</sup> que utilizaram  $6 \times 10^8$  UFC. No entanto, no presente estudo foi utilizada a concentração de  $10^2$  UFC, o que demonstra que *Salmonella* Gallinarum possui a capacidade de causar alta mortalidade embrionária até mesmo quando inoculada em baixas doses, posto que até mesmo uma unidade formadora de colônia é suficiente para causar infecção em embriões e neonatos<sup>18</sup>.

Devido à alta mortalidade embrionária dos tratamentos inoculados na cavidade alantóide com um e 14 dias de incubação (T1 – T6) as variáveis de mortalidade embrionária, relação peso pinto/ovo e qualidade do neonato não foram estudadas nestes grupos, sendo estudadas apenas nas aves dos tratamentos inoculados na câmara de ar com 19 dias (T7-T9) (Tabelas 1, 2 e 3). Enquanto, a pesquisa de *Salmonella* e biometria dos órgãos foram realizadas nas aves dos tratamentos inoculados na câmara de ar com 19 dias e nos neonatos dos tratamentos inoculados por via oral (T7-12) (Tabelas 4 e 5).

A mortalidade embrionária dos tratamentos inoculados na câmara de ar com 19 dias pode ser verificada na Tabela 1, a seguir.

TABELA 1. Mortalidade embrionária das aves dos tratamentos inoculados na câmara de ar com 19 dias de incubação (T7, 8 e 9)

| Tratamentos                          | Neonatos nascidos | Eclodibilidade | Mortalidade |
|--------------------------------------|-------------------|----------------|-------------|
|                                      | n/N               | %              | %           |
| T7 (Controle)                        | 18/28             | 64,3           | 35,7        |
| T8 (Inoculado sem gene <i>spvC</i> ) | 22/28             | 78,6           | 21,4        |
| T9 (Inoculado com gene <i>spvC</i> ) | 20/28             | 71,4           | 28,6        |

Não houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos pelo Teste exato de Fischer.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos controle e inoculados e entre os tratamentos inoculados com *Salmonella* Gallinarum sem e com o gene *spvC*. Portanto, a contaminação e a presença do gene não foram capazes de causar mortalidade nos embriões inoculados no ovo via câmara de ar com 19 dias.

Pode-se observar que houve uma alta mortalidade embrionária, inclusive no grupo controle que não teve contato com o patógeno, sendo que a eclodibilidade média dos três tratamentos está abaixo do postulado de 75 a 90%<sup>19</sup>. No entanto, sabe-se que as condições de incubação industrial geralmente apresentam melhores resultados do que incubações experimentais<sup>21</sup>, além de proporcionarem maior controle dos fatores externos, como a idade das matrizes e tempo de armazenamento dos ovos férteis, que afetam negativamente a eclodibilidade<sup>22</sup>.

Para os ovos inoculados com *Salmonella* Gallinarum na câmara de ar com 19 dias, a mortalidade de 21,4% (T8) e 28,6% (T9) difere do relatado por Celis-Estupiñan et al. (2017)<sup>5</sup> que obtiveram 51,4% de mortalidade para a mesma via de inoculação e idade de inoculação mas com a concentração de  $10^8$  UFC. A mortalidade embrionária depende de diversos fatores, como a virulência do isolado, concentração do inóculo, via de inoculação e também a idade de incubação em que o embrião recebe o inóculo. Considerando que ambos os isolados utilizados, com e sem o gene *spvC*, eram oriundos de órgãos de aves doentes, o que infere na presença de características de virulência e que a concentração de  $10^2$  UFC foi comprovadamente capaz de causar mortalidade embrionária nos grupos inoculados com um e 14 dias de incubação, a não diferença de mortalidade entre o grupo controle e grupos inoculados com *Salmonella* Gallinarum pode ser explicado pelo pouco tempo entre a inoculação e a eclosão das aves.

A absorção pelo embrião das soluções injetadas na câmara de ar se inicia com a bicagem interna, que ocorre aproximadamente no 20º dia de incubação<sup>22</sup>, com a inoculação com 19 dias e a eclosão com 21 é provável que os embriões tenham absorvido o patógeno, mas não tenha havido tempo hábil para causar mortalidade embrionária e influenciar na

qualidade dos neonatos, como demonstrados nas Tabelas 2 e 3. Contudo, o patógeno foi capaz de causar mortalidade ainda na primeira semana de vida e infectar os pintainhos (Tabela 4).

TABELA 2. Relação entre os pesos dos neonatos e pesos dos ovos dos tratamentos inoculados na câmara de ar

| Tratamentos                          | Peso do Neonato (g) | Peso do Ovo (g) | Relação (%) |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------|-------------|
| T7 (Controle)                        | 38,4                | 61,4            | 62,63       |
| T8 (Inoculado sem gene <i>spvC</i> ) | 40,2                | 61,2            | 65,75       |
| T9 (Inoculado com gene <i>spvC</i> ) | 38,8                | 60,8            | 63,78       |

Não houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e contaminado e/ou entre a presença do gene, o que sugere que os isolados com ou sem o gene não foram capazes de causar alterações nos embriões no final da incubação, assim como não determinaram alterações na mortalidade (Tabela 1). Provavelmente, este resultado também tenha ocorrido pelo motivo descrito anteriormente, de não haver tempo hábil entre a inoculação e a contaminação dos embriões antes da eclosão.

Pode-se observar que a relação média entre peso do pinto/peso do ovo dos três tratamentos é de aproximadamente 64%, este valor está abaixo do esperado para a espécie, que tem como meta 67% do rendimento<sup>19</sup>. Essa variação também pode ser atribuída a diferença entre a incubação experimental e a incubação industrial. No entanto, essa diferença não foi significativa, pois os neonatos também não apresentaram grandes alterações nos parâmetros de qualidade, como registrado na Tabela 3.

TABELA 3. Qualidade dos neonatos dos tratamentos inoculados na câmara de ar com 19 dias de incubação

| Tratamento                           | Atividade | Penugem | Olhos | Umbigo | Membrana | Abdômen | Pernas | Canelas |
|--------------------------------------|-----------|---------|-------|--------|----------|---------|--------|---------|
| T7 (Controle)                        | 11,6      | 8,5     | 10,0  | 9,8    | 8,7      | 10,9    | 8,6    | 12,3    |
| T8 (Inoculado sem gene <i>spvC</i> ) | 8,0       | 7,6     | 10,0  | 8,7    | 8,5      | 10,4    | 7,5    | 11,3    |
| T9 (Inoculado com gene <i>spvC</i> ) | 10,8      | 9,0     | 9,8   | 9,3    | 8,1 5    | 11,1    | 9,5    | 9,2     |

Não houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Não houve diferença entre os grupos controle e contaminados ou entre os grupos contaminados com *Salmonella Gallinarum* com e sem o gene *spvC*, o que indica que a presença da bactéria, com ou sem o gene, não foi capaz de causar diferença nos parâmetros de qualidade dos neonatos que eclodiram. Porém mesmo que não tenha havido diferença estatística entre os tratamentos, pode-se observar que os parâmetros das aves inoculados com

o patógeno foram, de modo geral, menores do que das aves não inoculadas (Tabela 3). Este resultado era esperado, devido à alta patogenicidade atribuída ao sorovar Gallinarum e sua capacidade de causar alterações na qualidade dos neonatos<sup>4</sup>.

Além disso, para o tratamento inoculado com o gene *spvC* (T9) era esperado um exacerbamento das possíveis alterações encontradas nos neonatos, devido a sua função associado ao crescimento bacteriano intracelular e disseminação<sup>9,19</sup>, o que poderia facilitar a infecção sistêmica e levar a diminuição da qualidade do neonato. Contudo, o resultado observado está em contraste com o relatado pela literatura, que a presença do patógeno no incubatório leva ao nascimento de aves fracas, com baixo peso e moribundas que morrem logo após a eclosão<sup>6</sup> e do resultado observado por Celis-Estupiñan et al. (2017)<sup>5</sup> que relataram apatia, prostração, penas eriçadas e sinais de tifo aviário nas aves eclodidas após a inoculação do patógeno na câmara de ar.

Embora as aves que eclodiram tenham apresentado parâmetros de qualidade relativamente bons, o que confirma que a bactéria não foi capaz de infectar os embriões antes da eclosão. Após a eclosão foi possível verificar mortalidade nas aves inoculadas na câmara de ar com o patógeno contendo o gene *spvC* (T9), em que dos 20 neonatos apenas dois chegaram a idade de necropsia com 28 dias, tendo uma mortalidade de 90%, o que pode ser respaldado por Addwebi et al. (2014)<sup>23</sup> que relata aumento da mortalidade entre 40 a 100%.

Além disso, pode se verificar a presença do patógeno nos órgãos das aves dos tratamentos inoculados, indicando que houve infecção das aves (Tabela 4).

TABELA 4. Pesquisa de *Salmonella* Gallinarum no coração, baço, fígado e ceco das aves com 28 dias de vida, distribuídos entre os tratamentos inoculados na câmara de ar e via oral

| Tratamento                                                     | Coração |    | Baço   |    | Fígado |    | Ceco   |     |
|----------------------------------------------------------------|---------|----|--------|----|--------|----|--------|-----|
| Inoculado em embriões na câmara de ar com 19 dias de incubação |         |    |        |    |        |    |        |     |
|                                                                | N       | %  | N      | %  | N      | %  | N      | %   |
| T7 (Controle)                                                  | -       | -  | -      | -  | -      | -  | -      | -   |
| T8 (Inoculado sem gene <i>spvC</i> )                           | 3/5     | 60 | 4/5    | 80 | 3/5    | 60 | 4/5    | 80  |
| T9 (Inoculado com gene <i>spvC</i> )                           | 1/2     | 50 | ½      | 50 | 1/2    | 50 | 1/2    | 50  |
| Inoculado em neonatos via oral com um dia de vida              |         |    |        |    |        |    |        |     |
| T10 (Controle)                                                 | -       |    | -      | -  | -      | -  | -      | -   |
| T11 (Inoculado sem gene <i>spvC</i> )                          | -       |    | -      | -  | -      | -  | 5/5    | 100 |
| T12 (Inoculado com gene <i>spvC</i> )                          | -       |    | 2/5    | 40 | -      | -  | 2/5    | 40  |
| P                                                              | 0,0802  |    | 0,1067 |    | 0,3135 |    | 0,0567 |     |

Não houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos pelo Teste Exato de Fischer. (-) representa resultados negativos para a presença da bactéria (0%).

*Salmonella* Gallinarum foi capaz de infectar todos os órgãos pesquisados, coração, baço, fígado e ceco, das aves dos tratamentos inoculados via câmara de ar com 19 dias, independente da presença ou não do gene (Tabela 4). Estes resultados concordaram com Prosdócimo et al. (2011)<sup>18</sup>, que também encontraram a bactéria em fígado, coração, baço e ceco de pintainhos inoculados durante a incubação em níveis acima de 50% e com Celis-Estupiñan et al. (2017)<sup>5</sup> que relataram que 100% dos órgãos pesquisados foram positivos com 10 dias pós-eclosão. A presença da bactéria nos órgãos, independente da presença do gene, apoia o observado por Castilla et al. (2006)<sup>24</sup> que relataram que a presença do gene *spvC* provavelmente não influenciou a colonização do ceco ou a invasão do fígado e do baço. Além disso, pode-se observar na Tabela 4 que as porcentagens dos órgãos contaminados das aves do tratamento inoculado sem o gene (T8) são mais altas do que os órgãos das aves inoculadas com o gene (T9), no entanto, as aves do tratamento inoculado com o gene na câmara de ar (T9) apresentaram alta mortalidade na primeira semana resultando em apenas duas aves para a realização da necropsia, número menor do que as cinco aves do tratamento inoculado sem o gene (T8).

Esta alta mortalidade durante os primeiros dias pós-eclosão também foi relatada por Celis-Estupiñan et al. (2017)<sup>5</sup> que observaram mortalidade de 11 das 17 (64,7%) aves inoculadas na câmara de ar. Este aumento da mortalidade pode ser relacionado a virulência dos isolados utilizados, pois os autores utilizaram um isolado oriundo de surto de tifo aviário que provavelmente apresentava fatores de virulência. Similarmente ao isolado utilizado neste estudo de *Salmonella* Gallinarum que continha o gene *spvC*, gene conhecido como um dos principais genes de virulência de *Salmonella*<sup>25</sup>.

A presença do gene pode ter contribuído para o aumento da mortalidade, pois esta condição não foi observada nas aves inoculadas sem o gene (T8) pela mesma via, que apresentaram 0% de mortalidade. Este fato pode estar atribuído a presença do gene *spvC*, pois sabe-se que este gene bloqueia a função pró-inflamatória da resposta imune, suprimindo o sistema imune<sup>26,27</sup> ainda imaturo por serem aves recém-eclodidas<sup>28</sup>, além de auxiliar na disseminação sistêmica da bactéria<sup>7,29,30</sup>.

A disseminação sistêmica também pode ser observada na inoculação via oral em neonatos, as aves do tratamento inoculado com o gene (T12) apresentaram baços e cecos positivos, demonstrando uma possível infecção sistêmica, enquanto as aves inoculadas sem o gene (T11) apresentaram apenas os cecos positivos, demonstrando que houve apenas infecção entérica. Este fato pode ser explicado pela função do gene *spvC* de aumentar a sobrevivência

do patógeno fora do intestino, contribuído para o efeito sistêmico do patógeno no organismo do hospedeiro<sup>31,32</sup>.

Diferentemente das aves inoculadas durante a incubação com *Salmonella Gallinarum* contendo o gene (T9), as aves inoculadas por via oral não apresentaram mortalidade, independente da ausência ou presença do gene *spvC*. Resultado semelhante também foi observado por Berchieri et al. (2001)<sup>33</sup>, que obtiveram baixa mortalidade para as aves inoculadas com 10<sup>2</sup> UFC, com início apenas após nove dias de inoculação. Os autores relataram ainda que o aumento da mortalidade e redução do tempo pós-inoculação está associada com o aumento da dose inoculada, o mesmo foi relatado por Freitas-Neto et al. (2007)<sup>34</sup>, que observaram mortalidade entre 7 a 40% e Hajam et al. (2018)<sup>2</sup> com mortalidade de 75% em aves inoculadas por via oral com um dia de vida com inóculos de 10<sup>8</sup> e 10<sup>6</sup> UFC, respectivamente, demonstrando que a concentração do inóculo pode afetar a mortalidade.

A presença da bactéria nos órgãos também pode levar a alteração na biometria dos órgãos infectados, como demonstrado na Tabela 5.

TABELA 5. Relação entre o peso em gramas da ave e dos órgãos coração, baço, fígado e intestino das aves necropsiadas com 28 dias, distribuídos entre os tratamentos inoculados na câmara de ar e via oral

| Tratamentos                                                    | Coração           | Baço   | Fígado | Intestino         |
|----------------------------------------------------------------|-------------------|--------|--------|-------------------|
| Inoculado em embriões na câmara de ar com 19 dias de incubação |                   |        |        |                   |
| T7 (Controle)                                                  | 0,74 <sup>b</sup> | 0,14   | 2,72   | 7,81 <sup>b</sup> |
| T8 (Inoculado sem gene <i>spvC</i> )                           | 1,31 <sup>a</sup> | 0,34   | 5,26   | 9,02 <sup>a</sup> |
| T9 (Inoculado com gene <i>spvC</i> )                           | 0,81 <sup>b</sup> | 0,25   | 3,43   | 9,90 <sup>a</sup> |
| Inoculado em neonatos via oral com um dia de vida              |                   |        |        |                   |
| T10 (Controle)                                                 | 0,78 <sup>b</sup> | 0,15   | 2,92   | 8,98 <sup>a</sup> |
| T11 (Inoculado sem gene <i>spvC</i> )                          | 0,87 <sup>b</sup> | 0,15   | 3,01   | 7,53 <sup>b</sup> |
| T12 (Inoculado com gene <i>spvC</i> )                          | 0,92 <sup>b</sup> | 0,18   | 3,10   | 6,43 <sup>b</sup> |
| CV                                                             | 27,26             | 62,01  | 36,89  | 19,46             |
| P                                                              | 0,0368            | 0,4830 | 0,2255 | 0,0168            |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos pelo Teste de Scott-Knott para todas as variáveis.

A inoculação na câmara de ar da bactéria sem o gene *spvC* (T8) provocou diminuição do ganho de peso das aves, sendo estatisticamente diferente do grupo controle (T7), observa-se na Tabela 4 que a maioria das aves desse grupo apresentava infecção nos órgãos, indicando que a salmonelose contribuiu para redução no ganho de peso. Além disso, essas aves apresentaram o peso do coração e intestino significativamente maior do que as aves

controles, e embora não haja diferença estatística, é possível observar que os pesos de baço e fígado também foram maiores. Este aumento do peso dos órgãos pode indicar presença de processo inflamatório e também foi relatado por Celis-Estupiñan et al. (2017)<sup>5</sup> que observaram aumento do coração, fígado e baço nas aves inoculadas na câmara de ar com *Salmonella Gallinarum*.

A diferença estatística entre as aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* com o gene *spvC* na câmara de ar (T9) e as aves controles (T7) apenas para o peso do intestino se deve provavelmente pela alta mortalidade observada para este grupo inoculado, em que das duas aves necropsiadas, apenas uma foi positiva para o patógeno (Tabela 4), indicando que a outra ave do grupo não estava infectada e assim não apresentaria alterações na biometria dos órgãos, justificando o porquê o grupo inoculado sem o gene (T8) tenha apresentado mais diferenças com o controle (T7).

Para as aves do tratamento inoculadas por via oral foi observado menor ganho de peso das aves inoculadas com a *Salmonella Gallinarum* com o gene (T12) em relação às aves do controle (T10) e as aves inoculadas sem o gene (T11), indicando que provavelmente a presença do gene *spvC* foi capaz de levar a alterações, mesmo que não tão aparentes, que levassem a redução no consumo ou aproveitamento da ração. O que pode estar relacionado as funções do gene *spvC* de causar infecção sistêmica e ser apontado como um dos principais codificadores de fatores de virulência mediados por plasmídeos<sup>35,36</sup> e importante para patogenicidade de *Salmonella Gallinarum*<sup>37</sup>. Até mesmo porque, os pesos dos intestinos das aves desse tratamento, juntamente com os pesos dos intestinos das aves do tratamento inoculado sem gene (T11), foram significativamente menores do que o das aves do tratamento controle, o que indica possível problema no desenvolvimento do sistema digestivo relacionado a presença do patógeno.

Não foi observada hepatoesplenomegalia, achado considerado comum em aves infectadas com *Salmonella Gallinarum*<sup>13</sup>. O que é compreensível para as aves não inoculadas com o gene, posto que estas não apresentaram infecções nos baços ou fígados, diferentemente das aves inoculadas com o gene, que apresentaram 40% dos baços positivos para a bactéria, contudo mesmo que não tenha havido diferença estatística significativa, pode-se notar que o baço dessas aves apresentaram valores relativos maiores do que o das aves controles e inoculadas sem o gene.

Não foram observadas diferenças na biometria para os outros órgãos pesquisados, indicando que tanto a presença da bactéria quanto a presença do gene *spvC* não foram suficientes para causar alterações nos órgãos das as aves inoculadas via oral. Este fato era

esperado considerando que não houve contaminação dos órgãos, como observado na Tabela 4, o que pode ser atribuída à baixa concentração de bactéria no inóculo, pois estas são dependentes da dose infectante<sup>38</sup>. Por outro lado, os mecanismos de interação do patógeno com o hospedeiro e a presença de genes de virulência são complexos, como enfatizado por Batista et al. (2018)<sup>13</sup>, sendo necessárias mais investigações para aumentar o conhecimento da Tifo aviária, principalmente relacionados à incubação comercial, a transmissão e disseminação do patógeno<sup>5</sup> e diagnósticos com menos limitações como o tempo para o resultado e a presença reduzida em órgãos ou amostras do meio ambiente<sup>39</sup>.

Portanto, é importante ressaltar que, embora não se tenha encontrado grandes diferenças entre os isolados de *Salmonella* Gallinarum sem e com o gene *spvC* durante a infecção experimental de embriões e neonatos de *Gallus gallus domesticus*, não se pode descartar completamente a importância do gene e/ou dos estudos relacionados a presença de genes específicos, sua importância na alteração da virulência dos sorovares e adaptação a novos hospedeiros.

#### 4. CONCLUSÃO

*Salmonella* Gallinarum é capaz de causar mortalidade embrionária em embriões inoculados com um e 14 dias na cavidade alantóide, mesmo com baixa concentração do patógeno no inóculo.

Em aves inoculadas na câmara de ar com 19 dias de incubação, a presença do gene *spvC* em *Salmonella* Gallinarum não é capaz de afetar a mortalidade embrionária, os parâmetros de incubação como a qualidade dos pintos ao nascimento e a biometria dos órgãos até os sete dias de vida.

A presença do gene *spvC* determina infecção entérica e sistêmica, enquanto o isolado sem o gene restringe-se ao ceco nas aves inoculadas por via oral com um dia de vida.



## 5. REFERÊNCIAS

1. OIE. World Organization for Animal Health. Terrestrial Manual 2018. Fowl Typhoid and Pullorum Disease. Chapter 2.3.11. 2018. [acesso 23 nov 2018]. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\_standards/tahm/2.03.11\_FOWL\_TYPHOID.pdf]
2. Hajam IA, Kim J, Lee JH. *Salmonella* Gallinarum delivering M2eCD40L in protein and DNA formats acts as a bivalent vaccine against fowl typhoid and H9N2 infection in chickens. Vet Res.2018;49(1):99.
3. Wigley P. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: addressing fundamental questions in bacteriology sixty years on from the 9R vaccine. Avian Pathol. 2017 Apr;46(2):119-124.
4. Xiong D, Song L, Pan Z, Jiao X. Identification and Discrimination of *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Biovars Pullorum and Gallinarum Based on a One-Step Multiplex PCR Assay. Front Microbiol. 2018;9:1718.
5. Celis-Estupiñan ALDP, Batista DFA, Cardozo MV, Secundo SAI, Rodrigues Alves LB, Almeida MA, Barrow PA, Berchieri A Jr, Freitas Neto CO. Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil. Avian Pathol. 2017;46(4):416-25.
6. Ishizuka MM. Do que aprendemos na graduação ao momento atual: o que mudou na epidemiologia da pulrose e do tifo aviário? Facta: Curso impacto da *Salmonella* na avicultura. 2013. CD-ROM
7. Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*, J. Vet. Microbiol. 2006;112:1-10.
8. Heithoff DM, Shimp WR., Lau PW, Badie G, Enioutina EY, Daynes RA, Byrne BA, House JK, Mahan M.J. Human *Salmonella* clinical isolates distinct from those of animal origin. Appl. Environ. Microbiol. 2008;10: 1757-1766.
9. Rodicio MR, Herrero A, Rodriguez I, Garcia P, Montero I, Beutlich Janine, Rodicio R, Guerra B, Mendoza MC. Acquisition of antimicrobial resistance determinants of virulence plasmids by specific serotypes of *Salmonella enterica* nontyphoid. Rev Med Microbiol. 2011;22(3):55-65.
10. Pal S, Dey S, Batabyal K, Banerjee A, Joardar SN, Samanta I, Isore DP. Characterization of *Salmonella* Gallinarum isolates from backyard poultry by polymerase chain reaction detection of invasion (invA) and *Salmonella* plasmid virulence (spvC) genes. Vet World. 2017;10(7):814-817.
11. Langridge GC, Fookes M, Connor TR, Feltwell T, Feasey N, Parsons BN, et al. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. Proc Natl Acad Sci. 2015;112:863-8.
12. Li X, Liu L, Li Q, Xu G, Zheng J. *Salmonella* Enteritidis in Layer Farms of Different Sizes Located in Northern China: On-Farm Sampling and Detection by the PCR Method. Braz J Poultry Sci. 2017;19(3):377-86.
13. Batista DFA, Freitas Neto OC, Almeida MA, Maboni G, Carvalho TF, Carvalho TP, Barrow PA, Berchieri AJr. Evaluation of pathogenicity of *Salmonella* Gallinarum strains

harbouring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*. PLoS One. 2018;20;13(7):e0200585.

14. Fernández A, Lara C, Loste A, Calvo S, Marca MC. Control of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. Comparative Immunology, Microb & Infecti Dis. 2001;24:207-16.

15. Patrício IS. Manejo do ovo incubável da granja ao incubatório. Manejo da incubação, 3ª edição, Ed. FACTA, Jaboticabal, 2013. Seção 3, cap. 3.3, p. 329-342.

16. Tona K, Bamelis F, De Ketelaere B, Bruggeman V, Moraes VM, Buyse J, Onagbesan O, Decuyper E. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. Poult Sci. 2003;82(5):736-41.

17. Georgia Poultry Laboratory. Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, p.293, 1997.

18. Prosdócimo F, Mauro J, Oliveto N, Miglioranza M, Barrios H, Franceschi MD. Infecção experimental de *Salmonella* Gallinarum em ovos embrionados de aves de postura. XXII Congresso Latino-Americano de Avicultura 2011. 2011. [acesso 20 jul 2018]. Disponível em: <https://pt.engormix.com/avicultura/artigos/salmonella-gallinarum-ovos-t37327.htm>

19. Tullett, S. Como Investigar as práticas de Incubação. Ross Tech. Aviagen. 2010. p48.

20. British United Turkeys (BUT). Breeder Performance Goals for Big9 Parent Female. Avigen Turkeys, 2008. p1-5.

21. Tanure CBGS, Café MB, Leandro NSM, Baião NC, Stringhini JH, Gomes NA. Efeitos da idade da matriz leve e do período de armazenamento de ovos incubáveis no rendimento de incubação. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2009;61(6):1391-6.

22. Cesario MD. Desenvolvimento embrionário pré e pós-postura – períodos críticos. Manejo da incubação, 3ª edição, Ed. FACTA, Jaboticabal, 2013. Seção 1, cap. 1.3, p. 48-62.

23. Addwebi TM, Call DR, Shah DH. Contribution of *Salmonella* Enteritidis virulence factors to intestinal colonization and systemic dissemination in 1-day-old chickens. Poult Sci. 2014;93 (4):871-81.

24. Castilla KS, Ferreira CSA, Moreno AM, Nunes IA; Piantino Ferreira AJ. Distribution of virulence genes sefC, pefA and spvC in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. Braz. J. Microbiol. 2006;37(2):135-9.

25. Hur J, Kim JH, Park JH, Lee YJ, Lee JH. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. Vet J. 2011;189(3):306-11.

26. Mazurkiewicz P, Thomas J, Thompson JA, Liu M, Arbibe L, Sansonetti P, Holden DW. SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. Mol Microbiol. 2008;67(6):1371-83.

27. Guiney DG, Fierer J. The Role of the *spv* Genes in *Salmonella* Pathogenesis. *Front Microbiol.* 2011;14;2:129.
28. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Bohez L, Boyen F, Haesebrouck F, Ducatelle R. Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. *Poult Sci.* 2004;83(11):1911-6.
29. Haneda T, Ishii Y, Shimizu H, Ohshima K, Iida N, Danbara H, Okada N. *Salmonella* type III effector SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. *Cell Microbiol.* 2012;14(4):485-99.
30. Chaudhary JH, Nayak JB, Brahmbhatt MN, Makwana PP. Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughter house environment in Ahmedabad, Gujarat. *Vet. World.* 2015; 8(1): 121-124.
31. Abd-Elghany SM, Sallam KI, Abd-Elkhalek A, Tamura T. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol Infect.* 2015;143(5):997-1003.
32. Astolfi-Ferreira CS, Pequini MRS, Nuñez LFN, Santander Parra SH, Chacon R., Torre DID, Pedroso AC, Ferreira AJP. A comparative survey between non-systemic *Salmonella* spp. (paratyphoid group) and systemic *Salmonella* Pullorum and *S. Gallinarum* with a focus on virulence genes. *Pesq. Vet. Bras.* 2017;37(10):1064-8.
33. Berchieri AJr, Murphy CK, Marston K, Barrow PA. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: Effect of bacterial and host genetic background, *Avian Patho.* 2001;30(3):221-31.
34. Freitas Neto OC, Arroyave W, Alessi AC, Fagliari JJ, Berchieri A. Infection of Commercial Laying Hens with *Salmonella* Gallinarum: Clinical, Anatomopathological and Haematological Studies. *Braz J Poultry Sci.* 2007;9.2):133 – 41.
35. Figueiredo R, Card R, Nunes C, AbuOun M, Bagnall MC, Nunez J, Mendonça N, Anjum MF, da Silva GJ. Virulence Characterization of *Salmonella enterica* by a New Microarray: Detection and Evaluation of the Cytolethal Distending Toxin Gene Activity in the Unusual Host *S. Typhimurium*. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135010.
36. Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA. Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J Bacteriol.* 2001;183(15):4652-8.
37. Mir IA, Wani SA, Hussain I, Qureshi SD, Bhat MA, Nishikawa Y. Molecular epidemiology and in vitro antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from poultry in Kashmir. *Rev Sci Tech.* 2010;29(3):677-86.
38. Oliveira GH, Berchieri AJr, Fernandes AC. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. *Braz J Microbio.* 2005;36:51-6.

39. Rubio MDS, Penha Filho RAC, Almeida AM, Berchieri A Junior. Development of a multiplex qPCR in real time for quantification and differential diagnosis of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum. Avian Pathol. 2017;46(6):644-651.

## CAPÍTULO 4. INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE *Salmonella* HEIDELBERG COM GENE *prot6E* EM POEDEIRAS COMERCIAIS

### RESUMO

O gene *prot6E* está associado a adaptação de *Salmonella* Enteritidis ao sistema reprodutor das poedeiras e contaminação dos ovos. Com a detecção deste gene em *Salmonella* Heidelberg foi desenvolvido este estudo para investigar a habilidade de *Salmonella* Heidelberg com o gene *prot6E* de causar infecções em poedeiras comerciais e contaminação dos ovos. Foi realizada inoculação experimental em 72 poedeiras, as quais foram distribuídas em quatro tratamentos com 18 aves cada. Um tratamento controle (T1) em que não houve inoculação e T2, T3 e T4 que receberam  $2,1 \times 10^7$  UFC de *Salmonella* Heidelberg pelas vias oral (T2), intravaginal (T3) e intravenosa (T4). As aves passaram por avaliação clínica diária e foi realizada a pesquisa de *Salmonella* Heidelberg com 12, 24, 48 horas, sete e 15 dias após a inoculação nas excretas e nas cascas, albúmens e gemas dos ovos. Foi observado que nas excretas houve o isolamento do patógeno apenas com 12 horas após a inoculação em 33% (3/9) das aves inoculadas via oral e 66% (6/9) das aves inoculadas via intravaginal. Nos ovos, o patógeno foi isolado com 24 e 48 horas, sete e 15 dias. Os ovos das aves inoculadas via intravaginal tiveram a maior contaminação, com 13,3%, seguido dos ovos via oral com 4,4% e via intravenosa com 2,2%. Conclui-se que *Salmonella* Heidelberg com gene *prot6E* não foi suficiente para causar salmonelose clínica em aves poedeiras, mas determinou contaminação dos ovos e do trato gastrointestinal de galinhas independente da via de inoculação, oral, intravaginal e intravenosa.

Palavras chaves: Genes de virulência, ovos, poedeira, salmonelose, sistema reprodutor.

### EXPERIMENTAL INOCULATION OF *Salmonella* HEIDELBERG WITH *prot6E* GENE IN LAYING HENS

### ABSTRACT

The *prot6E* gene is associated with the adaptation of *Salmonella* Enteritidis to the laying reproductive system and egg contamination. With the detection of this gene in *Salmonella* Heidelberg, this study was developed to investigate *Salmonella* Heidelberg's ability with the *prot6E* gene to cause infections in commercial layers and egg contamination. Experimental inoculation was performed in 72 layers, which were distributed in four treatments with 18 birds each. A control treatment (T1) in which there was no inoculation and T2, T3 and T4 that received  $2.1 \times 10^7$  CFU of *Salmonella* Heidelberg by oral (T2), intravaginal (T3) and intravenous (T4) routes. The birds underwent daily clinical evaluation and *Salmonella* Heidelberg was screened at 12, 24, 48 hours, 7 and 15 days after inoculation in excreta and eggshell, albumen and egg yolks. It was observed that in excreta there was isolation of the pathogen only 12 hours after inoculation in 33% (3/9) of birds inoculated orally and 66% (6/9) of birds inoculated intravaginally. In eggs, the pathogen was isolated at 24 and 48 hours, seven and 15 days. Eggs from birds inoculated intravaginally had the highest contamination, with 13.3%, followed by eggs orally with 4.4% and intravenously with 2.2%. It was concluded that *Salmonella* Heidelberg with *prot6E* gene was not sufficient to cause clinical salmonellosis in laying birds, but determined contamination of eggs and gastrointestinal tract of chickens regardless of oral, intravaginal and intravenous route of inoculation.

**Keywords:** eggs, laying hens, reproductive system, salmonellosis, virulence genes.

## 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella* se constitui em um dos agentes bacterianos mais incriminados em surtos de infecção alimentar em humanos no mundo, com alto número de hospitalizações e mortes<sup>1</sup>. No Brasil, foram relatados 12.503 surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVAs) no período de 2000 a 2017 e *Salmonella* foi responsável por mais de 30% destes. Os ovos e produtos a base de ovos foram responsabilizados por 7,36%<sup>2</sup>, sendo identificados como uma das principais fontes alimentares de salmonelose humana<sup>3</sup>.

*Salmonella* Enteritidis tem sido o patógeno mais identificado em ovos<sup>4</sup>, no entanto, outros sorovares são capazes de colonizar os tecidos reprodutivos das galinhas e contaminar os ovos durante seu desenvolvimento no sistema reprodutor<sup>5</sup>. Dentre estes, destaca-se o sorovar Heidelberg, que possui capacidade de colonizar ovário e oviduto das aves e tem sido relacionado com contaminação de ovos e surtos de doenças de origem alimentar, com os agravos de ser um sorovar capaz de causar doença invasiva em humanos<sup>6, 7</sup> e apresentar resistência a agentes antimicrobianos<sup>8</sup>.

A capacidade de *Salmonella* de colonizar e persistir no trato reprodutivo de galinhas e de resistir aos mecanismos de defesa dos ovos está atribuída a múltiplos fatores de virulência<sup>9, 10</sup>, sendo os genes de virulência os mais estudados<sup>11</sup> e modificações nestes genes podem alterar a expressão das propriedades bacterianas inclusive relacionadas à capacidade de causar infecção e contaminação dos ovos<sup>12, 13</sup>.

Além disso, isolados de *Salmonella* que apresentem diferentes genes podem surgir em diversos reservatórios e ambientes<sup>14</sup>, como ocorreu em relação ao gene *prot6E*, que foi detectado em *Salmonella* Heidelberg e Typhimurium (vide capítulo 2), sendo até então de detecção exclusiva no sorovar Enteritidis<sup>15</sup>.

O gene *prot6E* apresenta função associada à colonização dos órgãos do sistema reprodutor das aves e consequente contaminação de ovos. E tem sido apontado como um dos fatores de virulência relacionado com a maior capacidade do sorovar Enteritidis de colonizar os órgãos reprodutivos das aves e contaminar os ovos, em comparação com outros sorovares<sup>16, 17</sup>. A detecção desse gene em isolado de *Salmonella* Heidelberg aponta a necessidade de estudos experimentais em poedeiras comerciais.

Por essa razão, o presente trabalho foi desenvolvido para investigar a habilidade do isolado de *Salmonella* Heidelberg com o gene *prot6E*, de causar doença clínica, contaminar os ovos e permanecer no trato gastrointestinal de poedeiras comerciais inoculadas pelas vias oral, intravaginal e intravenosa.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Bacteriologia e de Biologia Molecular e no Núcleo Experimental de Doença de Aves do Setor de Medicina Veterinária Preventiva, do Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG com número de protocolo registro CEUA/UFG 045/2016.

### 2.2 Caracterização do isolado de *Salmonella*

Foi utilizado isolado de *Salmonella* Heidelberg proveniente de ovos líquidos congelados, tipificado pelo laboratório FIOCRUZ – RJ e estocado em ágar nutriente em refrigeração desde 2016, o qual compõe o acervo do Laboratório de Bacteriologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da EVZ/UFG.

Previamente, foi pesquisada a presença de genes plasmidiais de virulência, por meio da PCR em tempo real, e foi constatado a presença do gene *prot6E* e ausência do gene *spvC* em isolado de *Salmonella* Heidelberg continha o gene *prot6E*. As aves foram inoculadas aproximadamente dois meses após a detecção dos genes.

### 2.3 Delineamento experimental

Foram alojadas 72 aves poedeiras HyLine W 36, livres de *Salmonella*, com idade de 20 semanas, em fase de pré-postura, cedidas pelo Setor de Avicultura da EVZ/UFG. As 72 aves foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos, com 18 aves por tratamento e nove repetições e duas aves por repetição.

As aves do tratamento controle (T1) constituíram o grupo não submetido à inoculação.

As aves inoculadas via oral (T2) receberam diretamente no ingluvírio 1 mL de solução salina tamponada contendo  $2,1 \times 10^7$  UFC de *Salmonella* Heidelberg.

As aves inoculadas via intravaginal (T3) receberam a mesma concentração do inóculo via oviduto, por meio da introdução de uma cânula fina de silicone. Foi preconizada a introdução de 10 cm da cânula para deposição do inóculo na região do istmo.

As aves inoculadas via intravenosa (T4) receberam a mesma concentração do inóculo, com auxílio de agulha hipodérmica de medida 25 x 0,8mm e seringa, na veia ulnar.

## 2.4 Preparação do inóculo

Isolados da *Salmonella* Heidelberg foram repicados em ágar verde brilhante para avaliar a pureza e incubados em temperatura de 37°C por 24 horas. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram então suspensas em solução salina tamponada a 0,85% e armazenadas a 4°C. A concentração do inóculo foi ajustada com auxílio da escala Mac Farland, de acordo com Fernández et al. (2001)<sup>18</sup> e confirmada por plaqueamento em diluições seriadas em ágar verde brilhante, com as placas incubadas em temperatura de 37°C por 24 horas e contagem das UFCs.

## 2.5 Manejo das aves

As aves dos grupos controle e inoculados foram mantidas por 55 dias em baterias de aço galvanizado com três andares e três gaiolas cada bateria, com bandejas para recolhimento de excretas, comedouro e bebedouro, do tipo linear, feitos de chapas galvanizadas. As gaiolas tinham a dimensão de 100 cm x 45 cm x 40 cm e os bebedouros e comedouros tinham 49 cm. As aves dos quatro tratamentos eram alimentadas com ração e água fresca.

As aves não infectadas (tratamento controle) e infectadas com o patógeno (tratamentos inoculados) foram criadas em alojamentos separados, em baterias diferentes, porém com condições ambientais semelhantes, o qual era controlado duas vezes ao dia para assegurar conforto térmico. Os baldes com ração, as caixas de ovos, o material de limpeza e os equipamentos de proteção pessoal (EPIs) eram de uso exclusivo para cada tratamento.

As aves foram submetidas a programa de luz sugerido para a linhagem e idade de acordo com o Guia de Manejo da Hy-line, o tempo de luz era mantido por *timers* com a mesma programação para os quatro tratamentos.

## 2.6 Pesquisa de *Salmonella* Heidelberg

As amostras foram processadas de acordo com a metodologia descrita por Georgia Poultry Laboratory (1997)<sup>19</sup>, com modificações. Foram realizadas pesquisas do patógeno nas excretas e nos ovos com 12, 24, 48 horas, sete e 15 dias após a inoculação e também em cada primeiro ovo produzidos pela repetição, independente do tempo de inoculação. Cada tratamento continha nove repetições, nas quais foram pesquisados os ovos postos nos cinco intervalos de tempo após a inoculação (12, 24 e 48 horas, sete e 15 dias), totalizando 45 ovos analisadas para cada tratamento.



As excretas foram coletadas em papel esterilizado, 25g de cada repetição, colocadas em *stomacher* contendo 225 mL de água peptonada 1%. Para os ovos, a pesquisa foi realizada na casca, albúmen e gema individualmente. Inicialmente o albúmen foi retirado por meio de seringa, a gema então foi vertida em placa de Petri esterilizada e a casca foi macerada em outra placa esterilizada. Cada ovo então constituiu três amostras, que foram colocadas em tubos de ensaio contendo água peptonada 1% na proporção de 1:10.

As amostras de excretas e ovos em água peptonada foram incubadas a 37°C por 24h, depois foram transferidas 1,0 mL dessa solução para 9,0 mL de caldo selenito cistina (CS) e 0,1 mL para 10,0 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e incubadas a 37°C por 24h. Em seguida, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas foram plaqueadas por esgotamento em estrias, em duplicata para os ágar seletivos: Verde brilhante e Hektoen ou *Salmonella-Shigella* e incubados a 37°C por 24h.

Foram então selecionadas de três a cinco UFC com características morfológicas de *Salmonella* e transferidas para tubos contendo triplice açúcar ferro (TSI) e incubados a 37°C por 24h. As culturas em que os tubos de TSI apresentaram crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidas a produção de urease, indol, vermelho metila, motilidade, descarboxilase de lisina, malonato e citrato de Simmons. Isolados com bioquímica compatível de *Salmonella* foram confirmadas pelo teste sorológico com soro anti-O.

## 2.7 Avaliação clínica

As aves foram observadas diariamente, os sinais clínicos e a mortalidade foram anotados em ficha própria para cada grupo.

## 2.8 Análises estatísticas

Os dados foram avaliados utilizando o *software* R (Core Development Core Team, 2018). As frequências foram comparadas pelo Teste Exato de Fischer para cada intervalo de tempo separadamente. Foi adotado nível de 0,05 de significância em todos os testes.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Pesquisa de *Salmonella* Heidelberg nas excretas

As excretas, independente do tratamento foram negativas para *Salmonella* Heidelberg com 24, 48 horas, sete e 15 dias. Nos grupos inoculados, o patógeno foi isolado de excretas apenas com 12 horas após inoculação, conforme Tabela 1.

TABELA 1 - *Salmonella* Heidelberg recuperada das excretas com 12 horas após a inoculação por diferentes vias de infecção

| Tratamentos                     | Positivas |                   |
|---------------------------------|-----------|-------------------|
|                                 | n/N       | %                 |
| T1 (Controle sem inoculação)    | -         | 0 <sup>a</sup>    |
| T2 (Inoculado via oral)         | 3/9       | 33,3 <sup>b</sup> |
| T3 (Inoculado via intravaginal) | 6/9       | 66,6 <sup>b</sup> |
| T4 (Inoculado via intravenosa)  | -         | 0 <sup>a</sup>    |
| p                               | <0,001    |                   |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo Teste Exato de Fisher. (-) representa amostra negativa.

A colonização intestinal de *Salmonella*, principalmente do ceco, pode resultar na excreção do patógeno nas fezes. No entanto, normalmente, em organismos saudáveis com a microbiota intestinal estabelecida a bactéria rapidamente é eliminada do intestino por competição com a microbiota benéfica<sup>20</sup>

A presença do patógeno nas excretas, apenas com 12 horas após a inoculação, difere dos resultados obtidos em experimentos realizados com inoculação de *Salmonella* Heidelberg via oral em poedeiras por Gast et al. (2007)<sup>21</sup> e Gast et al. (2017a)<sup>5</sup>, que encontraram excretas positivas com cinco<sup>5</sup> e sete<sup>22</sup> dias após inoculação. Ainda, de acordo com Gast et al. (2004)<sup>22</sup>, a duração média de eliminação fecal em poedeiras adultas, para o sorovar Heidelberg, é de três semanas, mesmo com inoculação oral de doses muito altas.

Neste estudo, foi utilizada a dosagem de  $10^7$  UFC/mL, Gast et al. (2017a)<sup>5</sup> e Gast et al. (2017b)<sup>23</sup> utilizaram  $10^8$  UFC/mL e Gast et al. (2004)<sup>21</sup> utilizaram  $10^9$ . A excreção do patógeno pelas fezes pode variar com a dose infectante e a menor dose pode resultar em menor colonização e excreção. Contudo, mesmo que a persistência intestinal esteja associada com a dose do inóculo, a excreção de *Salmonella* ocorre de forma intermitente e varia de acordo com a categoria da amostra analisada e com a maturidade dos tecidos linfoides associados à mucosa intestinal (GALT) do indivíduo<sup>24</sup>, o que pode resultar em tempo de excreção diferenciando, ainda que se utilizem isolados do mesmo sorovar.

Além disso, sabe-se que o mesmo isolado pode apresentar diferentes parâmetros de infecção após passarem por pressão seletiva<sup>20</sup>, indicando que o meio pode alterar a expressão dos fatores de virulência. O isolado utilizado no estudo era oriundo de ovos líquidos e apresentava ausência do gene plasmidial *spvC*, o que provavelmente reduziu a sobrevivência e replicação da bactéria nas células do hospedeiro. Isso porque, o gene *spvC* está envolvido, principalmente, no crescimento da bactéria nas células infectadas e auxílio na disseminação sistêmica<sup>25, 26</sup>. Portanto, a ausência do gene *spvC* no isolado de *Salmonella*

Heidelberg utilizado pode ter contribuído com a baixa persistência do patógeno no ceco das aves e na baixa recuperação do patógeno nas excretas.

A recuperação de *Salmonella* inoculada por via oral e intravenosa, difere do observado por Gast et al. (2002)<sup>27</sup>, os quais obtiveram maior frequência de recuperação nas excretas das aves que foram inoculadas por estas mesmas vias com o sorovar Enteritidis. Segundo Gast et al. (2017a)<sup>5</sup>, a comparação entre isolados, mesmo que do mesmo sorovar, não permite a generalização das propriedades invasivas. Resultados diferentes entre os estudos também podem ser explicado pela presença de fatores de virulência expressos ou pela a maior capacidade invasiva do patógeno inoculado. Além disso, as aves podem apresentar uma microbiota menos competitiva com o patógeno, o que aumenta a concentração de bactérias e consequentemente uma maior eliminação fecal<sup>28</sup>.

Verificou-se, neste estudo, que a bactéria não foi isolada das excretas quando as aves foram inoculadas por via intravenosa. Provavelmente, ela não conseguiu burlar o sistema imune presente na corrente sanguínea, fato que pode ser relacionado à ausência do gene *spvC*, que atua na regulação da liberação de citocinas, bloqueia a função pró-inflamatória e suprime o sistema imunológico do hospedeiro<sup>26,29,30,31</sup>. Nas aves, os heterófilos são as primeiras células a migrarem para o local da inflamação e além de realizarem fagocitose, também são responsáveis pela produção de citocinas durante a resposta a *Salmonella enterica*, o que faz com que a imunidade celular seja direcionada contra patógenos intracelulares<sup>32</sup>.

A bactéria foi isolada das excretas quando inoculada pela via intravaginal, pois diferentemente da via intravenosa, a mesma conseguiu burlar o sistema de defesa presente no oviduto, fato que pode ser associado à presença do gene *prot6E*. No oviduto, especificamente no magno, é produzido o albúmen, que contém substâncias antimicrobianas que podem danificar o DNA e a parede celular das bactérias, o que dificulta ou até impede a sobrevivência e a disseminação de *Salmonella* no sistema reprodutor<sup>33</sup>. E o gene *prot6E* propicia maior interação da bactéria com os componentes da albumina e facilita a colonização dos tecidos do sistema reprodutivo<sup>16,34,35</sup>.

A maior e mais longa detecção de *Salmonella* Heidelberg nos ovos do que nas excretas sugere não haver relação entre a infecção intestinal e a contaminação de ovos, resultado que se respalda em Gast et al. (2005)<sup>20</sup>, os quais não observaram relação entre a duração média da excreção fecal de *Salmonella* Heidelberg com frequência de ovos contaminados. Assim, pode-se concluir que não existe uma relação entre a persistência da eliminação fecal e a produção de ovos contaminados com *Salmonella*.

### 3.2 Pesquisa de *Salmonella* Heidelberg nos ovos

Amostras dos ovos do tratamento controle mantiveram-se negativos durante todo o experimento, assim como todos os primeiros ovos postos após a inoculação, independentemente do tempo transcorrido e da via de inoculação do patógeno.

Os ovos oriundos das aves inoculadas com o patógeno via oral (T2) foram positivos apenas após sete dias de inoculação, em duas das nove parcelas pesquisadas (22,2%). Para inoculação via intravaginal (T3), uma parcela das nove (11,1%) foi positiva com 24 e 48 horas e duas das nove (22,2%) foram positivas com sete e 15 dias após a inoculação. Para o tratamento que recebeu o inóculo via intravenosa, apenas os ovos de uma parcela foram positivos (11,1%), com 48 horas após a inoculação (Tabela 2).

TABELA 2- *Salmonella* Heidelberg em ovos aos 12, 24 e 48 horas, sete e 15 dias após a inoculação experimental em poedeiras

| Intervalos/Tratamentos          | 12horas |   | 24horas |    | 48horas |    | 7 dias |    | 15 dias |    |
|---------------------------------|---------|---|---------|----|---------|----|--------|----|---------|----|
|                                 | n/N     | % | n/N     | %  | n/N     | %  | n/N    | %  | n/N     | %  |
| T1 (Controle sem inoculação)    | -       | - | -       | -  | -       | -  | -      | -  | -       | -  |
| T2 (Inoculado via oral)         | -       | - | -       | -  | -       | -  | 2/9    | 22 | -       | -  |
| T3 (Inoculado via intravaginal) | -       | - | 1/9     | 11 | 1/9     | 11 | 2/9    | 22 | 2/9     | 22 |
| T4 (Inoculado via intravenosa)  | -       | - | -       | -  | 1/9     | 11 | -      | -  | -       | -  |
| p                               | 1,00    |   | 1,00    |    | 1,00    |    | 0,29   |    | 0,59    |    |

Não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo Teste Exato de Fisher. (-) representa ausência da bactéria em nove das amostras testadas (0%).

No grupo inoculado via oral, duas parcelas foram positivas aos sete dias após a inoculação, o que está em acordo com Gast et al. (2004)<sup>22</sup>, os quais relataram que a maior contaminação dos ovos ocorre entre sete e 10 dias após inoculação oral. A capacidade do sorovar Heidelberg de causar contaminação em ovos não está totalmente esclarecida, acredita-se estar relacionada as características genotípicas dos isolados utilizados.

Para os ovos oriundos das aves inoculadas via oral e via intravenosa, observou-se com o decorrer do experimento que as aves foram capazes de controlar a infecção e não produziram mais ovos contaminados. O que pode ser atribuído a fatores relacionados à imunidade e resistência do hospedeiro como a mudanças na composição da microbiota<sup>36</sup> e também ao avanço da idade das aves<sup>37</sup>.

TABELA 3. *Salmonella* Heidelberg na casca, albúmen, gema e ovo inteiro após a inoculação experimental em poedeiras

| Intervalos/Tratamentos          | Casca |      | Albúmen |     | Gema |     | Ovo inteiro |                    |
|---------------------------------|-------|------|---------|-----|------|-----|-------------|--------------------|
|                                 | N     | %    | N       | %   | N    | %   | N           | %                  |
| T1 (Controle sem inoculação)    | -     | -    | -       | -   | -    | -   | 0/45        | 0 <sup>a</sup>     |
| T2 (Inoculado via oral)         | 1/45  | 2,2  | 1/45    | 2,2 | 2/45 | 4,4 | 2/45        | 4,4 <sup>a,b</sup> |
| T3 (Inoculado via intravaginal) | 5/45  | 11,1 | 4/45    | 8,9 | 2/45 | 4,4 | 6/45        | 13,3 <sup>b</sup>  |
| T4 (Inoculado via intravenosa)  | -     | -    | 1/45    | 2,2 | 1/45 | 2,2 | 1/45        | 2,2 <sup>a,b</sup> |
| p                               | 0,06  |      | 0,16    |     | 0,76 |     | 0,03        |                    |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo Teste Exato de Fisher. (-) representa ausência da bactéria em 45 das amostras testadas (0%). Ovo inteiro significa qualquer estrutura contaminada.

Verifica-se na Tabela 3, que houve diferença estatística apenas entre as aves inoculadas via intravaginal (T4) com o tratamento controle (T1). Este resultado corrobora com Gast et al. (2002)<sup>27</sup>, que também não encontraram diferença significativa entre as vias de inoculação oral e intravenosa para contaminação de albúmen e gema. Segundo os autores, estes dados podem indicar que a inoculação via intravenosa pode ter aplicabilidade limitada quando se refere à contaminação das estruturas dos ovos.

A inoculação direta no oviduto (T2 - via intravaginal) apresentou maior contaminação de albúmen e de casca dos ovos em relação aos tratamentos inoculados via oral e intravenosa. Sabe-se que o albúmen, que é formado no istmo e magno, possui elementos antimicrobianos que podem impedir o crescimento e sobrevivência da bactéria, tais como a lisozima e a ovotransferrina, que são as principais proteínas do albúmen com atividade antimicrobiana<sup>33</sup>. Para as bactérias driblarem as atividades antimicrobianas é necessário que haja a expressão de genes. Dentre estes destaca-se o *prot6E*, que apresenta a função relacionada à interação com a albumina, proteína mais abundante no albúmen do ovo<sup>38</sup>.

A presença da bactéria na casca de ovos oriundos das aves inoculadas via oral (T2) e via intravaginal (T3) pode ser explicada pelo patógeno nas excretas. As cascas podem ter sido contaminadas durante a ovoposição, pelas excretas presentes na cloaca, ou ainda durante sua formação no útero, que pode ter sido infectado pela via ascendente, quando as fezes presentes na cloaca migram para o sistema reprodutor por meio da vagina. Ainda, as excretas contaminadas também podem ter levado a contaminação das cascas após a postura, pelo contato direto no meio ambiente<sup>39,40</sup>. Provavelmente, a ausência de cascas contaminadas nos ovos das aves inoculadas via intravenosa (T4) está relacionada com a ausência de excretas contaminadas deste tratamento (Tabela 1).

A contaminação da gema foi menor do que a contaminação da casca e albúmen nas aves inoculadas via intravaginal (Tabela 3), o que está em desacordo com Gast et al.

(2002)<sup>27</sup> e Hervé-Grépinet et al. (2010)<sup>41</sup>. Os autores afirmaram que a gema pode sofrer maior contaminação, por não apresentar um sistema de defesa próprio. No entanto, para a inoculação por essa via era necessária que ocorresse a migração, por via ascendente, do patógeno até o ovário e infundíbulo, locais em que ocorrem a formação e captação da gema, respectivamente, e que estão na região cranial do sistema reprodutor. Por isso, o patógeno foi mais encontrado no albúmen e na casca, pela proximidade da formação dessas estruturas (magno e útero) com a região da inoculação (istmo).

Para os ovos oriundos das aves inoculadas via oral e intravenosa, a contaminação da gema possivelmente ocorreu em decorrência da infecção do ovário pela disseminação sistêmica da bactéria. Gast et al. (2007)<sup>21</sup> observaram maior frequência na contaminação do ovário do que do oviduto de galinhas inoculadas com *Salmonella* Heidelberg pela via oral, no entanto não houve diferença estatística significativa entre os órgãos do sistema reprodutor e também sem diferença entre a produção de gemas e albúmen contaminados. Os autores verificaram apenas cinco e seis amostras positivas, respectivamente, das 323 pesquisadas, indicando uma baixa contaminação dos ovos.

A baixa frequência de ovos positivos encontrada neste estudo também se sustenta em Humphrey et al. (1991)<sup>42</sup> e Gast & Holt (2000)<sup>43</sup>, que verificaram que a inoculação experimental em galinhas poedeiras pela via oral, mesmo que com doses muito altas da bactéria, pode determinar uma baixa frequência de ovos contaminados. Também Gast et al. (2002)<sup>27</sup> não observaram diferenças significativas no isolamento de *Salmonella* nos ovos entre as vias de inoculação oral, respiratória e intravenosa. Assim como observado por Myamoto et al. (1997)<sup>44</sup> que utilizaram as vias de inoculação intravaginal e intravenosa e não observaram diferença na recuperação da bactéria nos ovos.

Myamoto et al. (1997)<sup>44</sup> relataram contaminação de 9,6% dos ovos oriundos das aves inoculadas via intravaginal, achado semelhante ao encontrado neste trabalho para mesma via de 13,33%, mesmo que os autores tenham utilizado o sorovar Enteritidis. Esse fato se deve, provavelmente, à presença do gene *prot6E* no isolado de Heidelberg, que propiciou a colonização de ovos, inibindo os mecanismos de defesa do albúmen. Este fato é semelhante aos encontrados para *Salmonella* Enteritidis que de modo geral, apresenta maior incidência de contaminação de ovos<sup>6,21</sup> e melhor capacidade de invadir os órgãos reprodutores das aves do que o sorovar Heidelberg<sup>45</sup>.

O sorovar Heidelberg utilizado neste estudo também apresentou capacidade de colonização semelhante ao sorovar Enteritidis e maior que o sorovar Heidelberg relatado por Okamura et al. (2001)<sup>46</sup>. Os autores fizeram comparação do sorovar Heidelberg com o sorovar

Enteritidis e ressaltaram que o sorovar Enteritidis apresenta vantagens específicas na colonização dos tecidos vaginais das galinhas. Além disso, os autores também não encontraram ovos positivos para Heidelberg na inoculação via intravaginal, resultado diferente do encontrado neste estudo, no qual ocorreram ovos positivos para mesma via. Este resultado sugere que a presença do gene *prot6E* influenciou a habilidade do sorovar de aderir às células do sistema reprodutor das aves.

Para a via intravenosa, a baixa contaminação dos ovos obtidos também foi observada por Okamura et al. (2001)<sup>46</sup>, que não encontraram resultado positivo ao inocularem poedeiras com *Salmonella* Heidelberg pela mesma via. Este resultado sugere a incapacidade do sorovar de burlar o sistema de defesa presente na circulação sanguínea e que, provavelmente, o gene *prot6E* não esteja relacionado a esta atividade, pois ainda são limitadas as informações disponíveis sobre os mecanismos e funções precisas desse gene<sup>47</sup>.

A maior contaminação observada nos ovos das galinhas inoculadas via intravaginal pode estar associada a função do gene *prot6E*, o qual possibilita a fixação da bactéria no oviduto. De acordo com Clavijó et al. (2006)<sup>16</sup>, o gene *prot6E* é responsável por codificar uma fímbria de superfície que desempenha um papel de interação com a albumina e possibilita a adesão da bactéria à superfície da células glandulares do oviduto<sup>48</sup>.

A bactéria inoculada via oral precisa infectar inicialmente o intestino e depois se disseminar até os órgãos reprodutivos. Como a cepa de *Salmonella* Heidelberg testada não apresentava o gene *spvC*, importante fator de virulência que possui função de auxiliar na disseminação da bactéria<sup>49</sup>, era esperada menor capacidade em contaminar os ovos na inoculação via oral em comparação com via intravaginal. Pois, no caso da inoculação direta no oviduto, a presença do gene *prot6E* propiciou a sobrevivência da bactéria no sistema reprodutor e maior contaminação dos ovos sem a influência do gene *spvC*, pois o patógeno não precisou infectar as células intestinais e disseminar para o ovário e oviduto.

Ressalta-se que a eficiência de um isolado em colonizar sistemas não pode ser atribuída apenas à presença de um gene específico, necessitando da expressão coordenada de várias propriedades fenotípicas complementares, como destacaram Gast et al. (2002)<sup>27</sup>.

A propensão de invadir órgãos reprodutivos e contaminar ovos pode variar significativamente entre isolados, mas, de modo geral, os isolados não demonstram afinidades por locais específicos do trato reprodutivo das aves que poderiam culminar em contaminação das partes dos ovos relacionadas às regiões de deposição<sup>22</sup>. Tal conclusão foi observada para o sorovar Heidelberg utilizado neste estudo, que não demonstrou tropismo por região específica

do sistema reprodutor, pois as inoculações pelas três vias resultaram em contaminação de albúmen, gema e casca, mesmo que baixas.

A baixa contaminação não inviabiliza a importância da presença do patógeno em ovos, especialmente por suas implicações para os consumidores. Pois, segundo Robert & Scharff (2018)<sup>50</sup>, os consumidores não são capazes de avaliar os riscos relacionadas aos ovos contaminados, mas isso não quer dizer que os consumidores são completamente impotentes frente suas escolhas no mercado, uma vez que, os mesmos podem escolher produtos como ovos pasteurizados quando a necessidade de utiliza-los de forma cru ou mal cozido.

### 3.3 Avaliação clínica

Durante o experimento, nenhuma ave, independente da via de inoculação apresentaram alterações clínicas aparentes. Este resultado era esperado e está de acordo com os relatos em literatura, mesmo para a inoculação intravenosa, que é considerada a mais invasiva<sup>51</sup>.

As galinhas poedeiras em fase adulta possuem microbiota intestinal estabelecida e o sistema imune desenvolvido, o que as torna menos susceptíveis às infecções por *Salmonella* em condições naturais. Mesmo em infecções experimentais, que apresentam características diferentes das que ocorrem naturalmente, especialmente pela alta dosagem infectante utilizada, raramente se observa aparecimento de doença clínica ou mortalidade<sup>52</sup>.

Gast et al. (2005, 2007 e 2017a)<sup>5,20,22</sup> em seus estudos com inoculação experimental de *Salmonella* Heidelberg em poedeiras também não relataram alterações clínicas e mortalidade nas aves. Este fato pode ser indicativo, assim como o observado no presente trabalho, de que este sorovar não possui a capacidade de causar doença clínica e mortalidade em aves adultas, mesmo com inoculação de altas doses infectantes e em diferentes vias.

Outro fator a ser considerado é que o gene plasmidial *prot6E*, presente nesta *Salmonella* Heidelberg não aparenta ter função atribuída à infecção intestinal ou sistêmica que possa culminar no aparecimento de alterações clínicas, embora sua função não esteja totalmente esclarecida<sup>53</sup>. Além disso, o isolado de *Salmonella* Heidelberg utilizado apresentou ausência do gene *spvC*, que, segundo Haneda et al. (2012)<sup>49</sup>, é um importante fator de virulência que auxilia na disseminação sistêmica.

Acrescenta-se ainda que, o resultado da infecção por *Salmonella* depende de diversos fatores principalmente relacionados ao hospedeiro, como idade, estado imune, fatores genéticos e ambientais, e relacionados a bactéria, como a presença e expressão dos



fatores de virulência<sup>33</sup>. Considerando que o sorovar Heidelberg não é dito como espécie-específico para as aves e que o fator de virulência encontrado no isolado não está relacionado ao aparecimento de doença clínica, o seu não aparecimento era esperando.

A produção de excretas e ovos contaminados sem a apresentação de doença clínica pode ser um agravante e dificultar o diagnóstico de doença na cadeia avícola, levando a produção de ovos contaminados que podem chegar ao consumidor final e causar danos à saúde pública. O que, por certo, ressalta a importância da vigilância epidemiológica constante, mesmo em lotes que não apresentem sintomatologia.

#### 4. CONCLUSÃO

Inoculação experimental do isolado de *Salmonella* Heidelberg, com gene *prot6E*, não é suficiente para causar salmonelose clínica em aves poedeiras, mas determina contaminação dos ovos e colonização temporária do trato intestinal de galinhas, independente da via de inoculação, oral, intravaginal e intravenosa.

## 5. REFERÊNCIAS

1. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. 2018. [acesso em 30 dez 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>]
2. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, 2018. [acesso 28 jan 2019]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>
3. De Knecht LV, Pires SM, Hald T. Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. *Epidemiol Infect* (2015) 143:1175–86.
4. Wright A., Richardson L, Mahon B, Rothenberg R., Cole D. The rise and decline in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis outbreaks attributed to egg-containing foods in the United States, 1973-2009. *Epidemiol Infect*. 2016;144(4):810–9.
5. Gast RK, Guraya R, Jones DR, Guard J, Anderson KE, Karcher DM. Colonization of internal organs by *Salmonella* serovars Heidelberg and Typhimurium in experimentally infected laying hens housed in enriched colony cages at different stocking densities. *Poult Sci*. 2017;1;96(5):1402-9.
6. Gast RK, Guraya RG, Guard J, Holt PS. Frequency and magnitude of internal organ colonization following exposure of laying hens to different oral doses of *Salmonella* Enteritidis. *J. Poult. Sci*. 2011;10(4):325-31.
7. Pravin RK, Foley S, Ricke SC. Producing Safe Eggs Chapter 12-*Salmonella* Heidelberg in Layer Hens and Egg Production: Incidence and Potential Issues Microbial Ecology of Salmonella 2017, 235-56.
8. Nisar M, Kassem II, Rajashekara G, Goyal SM, Lauer D, Voss S, Nagaraja KV. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the midwestern United States. *J Vet Diagn Invest*. 2017;29(3):370-375.
9. Raspoet R, Appia-Ayme C, Shearer N, Martel A, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Thompson A, Van Immerseel F. Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis genes involved in chicken reproductive tract colonization. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(24):7710-6.
10. Coward C, Sait L, Cogan T, Humphrey TJ, Maskell DJ. O-antigen repeat number in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is important for egg contamination, colonisation of the chicken reproductive tract and survival in egg albumen. *FEMS Microbiol. Lett*. 2013;343:169–76.
11. Okamura M, Kamijima Y, Miyamoto T, Tani H, Sasai K., Baba E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis*. 2001;45(1):61-9.

12. Guard J, Morales CA, Fedorka-Cray P, Gast RK. Single nucleotide polymorphisms that differentiate two subpopulations of *Salmonella* enteritidis within phage type. BMC Res. Notes. 2011;4:369.
13. Kilroy S, Raspoet R, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Prevention of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis after oral vaccination of laying hens with *Salmonella* Enteritidis  $\Delta$ tolC and  $\Delta$ acrABacrEFmdtABC mutants. Vet Res. 2016;47(1):82.
14. Dewaele IH, Van Meirhaeghe G, Rasschaert M, Vanrobaeys E, Graef D, Herman L, Ducatelle R, Heyndrickx M, De Reu K. Persistent *Salmonella* Enteritidis environmental contamination on layer farms in the context of an implemented national control program with obligatory vaccination. Poult. Sci. 2012;91:282–91.
15. Li X, Liu L, Li Q, Xu G, Zheng J. *Salmonella* Enteritidis in Layer Farms of Different Sizes Located in Northern China: On-Farm Sampling and Detection by the PCR Method. Braz J Poultry Sci. 2017;19(3):377-86.
16. Clavijo RI, Loui C, Andersen GL, Riley LW, Lu S. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. Appl Environ Microbiol. 2006;72(2):1055-64.
17. Li S, Zhang Z, Pace L, Lillehoj H, Zhang S. Functions exerted by the virulence-associated type-three secretion systems during *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion into and survival within chicken oviduct epithelial cells and macrophages. Avian Pathol. 2009;38(2):97-106.
18. Fernández A, Lara C, Loste A, Calvo S, Marca MC. Control of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. Comparative Immunology, Microb & Infect Dis. 2001;24:207-16.
19. Georgia Poultry Laboratory. Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, p.293, 1997.
20. Gast RK, Guard-Bouldin J, Holt PS. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. Avian Dis. 2005;49:382–6.
21. Gast RK, Guraya R, Guard-Bouldin J, Holt PS, Moore RW. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. Avian Dis. 2007;51:40–4.
22. Gast RK, Guard-Bouldin J, Holt PS. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* heidelberg and *Salmonella* Enteritidis. Avian Dis. 2004;48(4):863-9.
23. Gast RK, Guraya R, Jones DR, Anderson KE, Karcher DM. Frequency and Duration of Fecal Shedding of *Salmonella* Enteritidis by Experimentally Infected Laying Hens Housed in Enriched Colony Cages at Different Stocking Densities. Front Vet Sci. 2017;10;4:47.
24. Andrade MA, Mesquita AJ, Stringhini JH, Pedroso AA, Leandro NSM, Café MB, Mattos MS. Infecção experimental de embriões de frango de corte com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 4. Arq Bras de M Vet e Zoo. 2008;60(5):1110-7.

25. Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol.* 1993;7(6):825-30.
26. Rodicio MR, Herrero A, Rodriguez I, Garcia P, Montero I, Beutlich Janine, Rodicio R, Guerra B, Mendoza MC. Acquisition of antimicrobial resistance determinants of virulence plasmids by specific serotypes of *Salmonella enterica* nontyphoid. *Rev Med Microbiol.* 2011;22(3):55-65.
27. Gast RK, Guard-Petter J, Holt PS. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Dis.* 2002;46:629-35.
28. Clavijo V, Flórez MJV. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poult Sci.* 2018;97(3):1006-1021.
29. Mazurkiewicz P, Thomas J, Thompson JA, Liu M, Arbibe L, Sansonetti P, Holden DW. *SpvC* is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol.* 2008;67(6):1371-83.
30. Guiney DG, Fierer J. The Role of the *spv* Genes in *Salmonella* Pathogenesis. *Front Microbiol.* 2011;14;2:129.
31. Neumann C, Fraiture M, Hernández-Reyes C, Akum FN, Virlogeux-Payant I, Chen Y, Pateyron S, Colcombet J, Kogel KH, Hirt H, Brunner F, Schikora A. The *Salmonella* effector protein *SpvC*, a phosphothreonine lyase is functional in plant cells. *Front Microbiol.* 2014;17;5:548.
32. Erf GF. Cell-mediated immunity in poultry. *Poult Sci.* 2008;84:220-5.
33. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(4):718-38.
34. González-Escalona N, Zhang G, Brown EW. Multiplex TaqMan real-time pcr (qPCR) assay targeting *prot6E* and *invA* genes for fast and accurate detection of *Salmonella* Enteritidis. *Salmonella-A diversified superbug*, InTech. 2012;27:41-62.
35. Marlony B, Bunge C, Helmuth R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *J Microbiol Methods.* 2007;70(2):245-51.
36. Simon K, Verwoolde MB, Zhang J, Smidt H, de Vries Reilingh G, Kemp B, Lammers A. Long-term effects of early life microbiota disturbance on adaptive immunity in laying hens. *Poult Sci.* 2016;95(7):1543-54.
37. Adhikari PA, Cosby DE, Cox NA, Lee JH, Kim WK.. Effect of dietary bacteriophage supplementation on internal organs, fecal excretion, and ileal immune response in laying hens challenged by *Salmonella* Enteritidis. *Poult Sci.* 2017;96(9):3264-3271.
38. Marie P, Labas V, Brionne A, Harichaux G, Hennequet-Antier C, Nys Y, Gautron J. Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization. *J Proteomics.* 2015;113:178-93.

39. Botey-Saló P, Anyogu A, Varnam AH, Sutherland JP. Survival of inoculated *Salmonella* on the shell of hens' eggs and its potential significance. *Food Control*. 2012;28(2):463-9.
40. Gole VC, Torok V, Sexton M, Caraguel CG, Chousalkar KK. Association between indoor environmental contamination by *Salmonella enterica* and contamination of eggs on layer farms. *J Clin Microbiol*. 2014;52(9):3250-8.
41. Hervé-Grépinet V, Réhault-Godbert S, Labas V, Magallon T, Derache C, Lavergne M, Gautron J, Lalmanach AC, Nys Y. Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4401-9.
42. Humphrey, T. J., A. Whitehead, A. H. L. Gawler, A. Henley, and B. Rowe. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidem. Inf.* 1991;106:489-496.
43. Gast RK, Holt PS. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella* Enteritidis strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. *Avian Dis*. 2000;44(3):706-10.
44. Miyamoto T, Baba E, Tanaka T, Sasai K, Fukata T, Arakawa A. *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. *Avian Dis*. 1997;41(2):296-303.
45. Gantois I, Eeckhaut V, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathol* 2008;37:399–406.
46. Okamura M, Kamijima Y, Miyamoto T, Tani H, Sasai K., Baba E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis*. 2001;45(1):61-9.
47. Hu L, Ma LM, Zheng S, He X, Hammack TS, Brown EW, Zhang G. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella* ser. Enteritidis from egg products. *Food control*. 2018;88:190-7.
48. De Buck J, Van Immerseel F, Meulemans G, Haesebrouck F, Ducatelle R. Adhesion of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates to chicken isthmal glandular secretions. *Vet Microbiol*. 2003;93: 223–33.
49. Haneda T, Ishii Y, Shimizu H, Ohshima K, Iida N, Danbara H, Okada N. *Salmonella* type III effector *SpvC*, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. *Cell Microbiol*. 2012;14(4):485-99.
50. Roberts T, Scharff LR. Pathogen Information is the basic problem for economic incentives. *Food Safety Economics*. 2018:13-28.
51. Zanella A. Poultry disease manual: characteristics and control of infections. Bologna: Tipoarte; 2007. 93p.

52. Schulz J, Van Hoorebeke S, Hald B, Hartung J, Van Immerseel F, Radtke I, Kabell S, Dewulf J. The dynamics of *Salmonella* occurrence in commercial laying hen flocks throughout a laying period. *Avian Pathol.* 2011;40(3):243-8.
53. Hu L, Ma LM, Zheng S, He X, Hammack TS, Brown EW, Zhang G. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella* ser. Enteritidis from egg products. *Food control.* 2018;88:190-7.

## CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de muitas vezes associados negativamente a surtos de infecções alimentares, principalmente por *Salmonella*, os ovos são amplamente utilizados na nutrição humana como uma importante fonte de proteínas de origem animal de baixo custo. Para evitar essa associação negativa e promover o crescimento do setor avícola de postura, são necessárias campanhas voltadas para conscientização das boas práticas dos consumidores e manipuladores de alimentos, além de pesquisas científicas voltadas para a compreensão profunda das características das infecções em galinhas poedeiras e dos mecanismos de contaminação dos ovos.

Em caso de *Salmonella*, é necessário identificar os sorovares mais envolvidos em surtos alimentares por consumo de ovos contaminados, suas características genéticas e evolutivas, estabelecendo assim, embasamento necessário para elucidar a patogênese e as relações específicas entre patógeno e hospedeiro.

A detecção de genes em diferentes sorovares, bem como o entendimento da sua real relevância na capacidade de alterar a virulência dos mesmos, pode colaborar para uma melhor compreensão da troca de fatores genéticos entre os sorovares e das possíveis relações entre patógeno e hospedeiro contribuindo para o desenvolvimento de vacinas com depleção de genes e novas abordagens para controle da bactéria. Em suma, estudos devem ser conduzidos para concluir se a presença de apenas um gene específico é suficiente para indicar infecção em aves e contaminação de ovos.

Observou-se que a presença do gene não alterou a mortalidade embrionária em ovos inoculados pela via alantoide com um 1 dia, com 14 dias de incubação, e pela via câmara de ar com 19 dias de incubação. Tampouco alterou a qualidade dos neonatos. Apesar disso, as aves que foram inoculadas com o isolado ainda durante a incubação, apresentaram maior mortalidade na primeira semana de vida. Além disso, a inoculação de *Salmonella* Gallinarum com o gene *spvC* em neonatos com um dia de vida levou a disseminação sistêmica, enquanto na inoculação com isolado sem o gene, o patógeno permaneceu apenas no sistema digestivo, apresentando infecção entérica. Portanto, a presença de genes específicos podem alterar as características de virulência dos isolados que os contenham.

Ademais, estudos de detecção de genes de virulência também colaboram para compreender a troca de fatores genéticos entre os sorovares e suas possíveis relações entre patógeno e hospedeiro. Como mostrou a pesquisa do gene *prot6E* em diferentes sorovares de *Salmonella* provenientes da cadeia avícola, este gene, atribuído até então, apenas ao sorovar

Enteritidis, foi detectado nos sorovares *Salmonella* Heidelberg e Typhimurium, podendo indicar a capacidade de troca dos elementos genéticos entre os sorovares de *Salmonella* e também das relações entre sorovares específicos, funções dos genes e maior frequência em determinados hospedeiros. Este fato pode ser exemplificado pela associação do sorovar Enteritidis com o gene *prot6E* em aves poedeiras e ovos, devido à função do gene em melhorar a capacidade de sobrevivência do patógeno em albúmen.

Portanto, são necessários estudos que possam elucidar se a presença de apenas um gene específico é suficiente para alterar a capacidade de causar infecção e contaminação pelos sorovares que contenham este gene. Como foi realizado o estudo de inoculação experimental de *Salmonella* Heidelberg com o gene *prot6E* em poedeiras para verificar sua capacidade de contaminar ovos e excretas. Os resultados indicaram que a maior contaminação pela inoculação via oviduto sugere que a presença do gene *prot6E* possa ser capaz de induzir o aumento na capacidade do sorovar Heidelberg de sobreviver no sistema reprodutor de aves, podendo ser um dos possíveis motivos para o aumento recente da frequência do sorovar em galinhas de postura. Em virtude disso, são necessárias mais pesquisas que comparem *Salmonella* Heidelberg com o gene *prot6E* e sem o gene *prot6E*, com o intuito de mensurar o real aumento da capacidade de contaminar ovos e causar infecção de aves poedeiras dos isolados que apresentem o gene *prot6E*.

O maior conhecimento sobre os genes de virulência tem permitido a compreensão de fatores, como o aparecimento de sorovares em diferentes nichos e as características de virulência específica de cada sorovar. O que pode resultar no desenvolvimento de medicamentos e vacinas mais eficientes, seguros e acessíveis, além da ampliação dos métodos de controle e monitoramento epidemiológico. Assim sendo, a busca por medidas protetivas ao risco de contaminação da criação avícola e seus produtos, é de fundamental importância para a consolidação da avicultura como uma das mais seguras cadeias de produção animal para o consumidor final.



## ANEXO Parecer de Aprovação no Comitê de Ética



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Goiânia, 22 de agosto de 2016.

**PARECER REFERENTE AO PROJETO PROTOCOLADO NESTA COMISSÃO SOB O N. 045/2016****I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino):** Pesquisa**II - Identificação:**

☐ **Título do projeto:** *AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE GENES DE VIRULÊNCIA DE Salmonella sp. E MECANISMOS DE TRANSMISSÃO EM POEDEIRAS.*

☐ **Pesquisadora Responsável/ Unidade:** Maria Auxiliadora Andrade  
Escola de veterinária e Zootecnia/EVZ-UFG

☐ **Pesquisadores Participantes:**

| Nome/Endereço do Currículo Lattes                                                                                             | Instituição | Formação Básica    | Titulação Mais Recente | Função na Pesquisa                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Maria Auxiliadora Andrade<br><a href="http://lattes.cnpq.br/9441751321255467">http://lattes.cnpq.br/9441751321255467</a>      | EVZ/UFG     | Médica Veterinária | Doutor                 | Coordenadora                                                                                                                     |
| Samantha Verdi Figueira<br><a href="http://lattes.cnpq.br/3212246712633622">http://lattes.cnpq.br/3212246712633622</a>        | EVZ/UFG     | Médica Veterinária | Mestra                 | Responsável pela execução do projeto.                                                                                            |
| Cintia Silva Menezes e Resende<br><a href="http://lattes.cnpq.br/5841210447886226">http://lattes.cnpq.br/5841210447886226</a> | EVZ/UFG     | Médica Veterinária | Doutora                | Co-orientadora:<br>Auxiliar na execução do projeto na etapa de obtenção das aves.                                                |
| Dunya Mara Cardoso de Moraes<br><a href="http://lattes.cnpq.br/9632713129112672">http://lattes.cnpq.br/9632713129112672</a>   | EVZ/UFG     | Médica Veterinária | Doutora                | Co-orientadora:<br>Auxiliar na execução do projeto na etapa de PCR e escolha das aves que apresentem características de postura. |
| Ana Maria Almeida<br><a href="http://lattes.cnpq.br/8462560870100009">http://lattes.cnpq.br/8462560870100009</a>              | EVZ/UFG     | Médica Veterinária | Mestra                 | Colaboradora: Auxiliar na execução do projeto na etapa de manejo e criação das aves.                                             |

☐ **Médico Veterinário Responsável:**

| Nome                      | Número do CRMV |
|---------------------------|----------------|
| Maria Auxiliadora Andrade | GO 0227        |

☐ **Unidade onde será realizado:** Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO.

☐ **Data de apresentação a CEUA:** 08/07/2016

**III - Objetivos e justificativa do projeto:**

Segundo a pesquisadora responsável, o objetivo deste estudo é investigar os genes de virulência e de resistência de *Salmonella* sp. isolados de diferentes amostras da cadeia avícola Goiana, bem como a capacidade de *Salmonella* expressar sua patogenicidade em aves de postura e se disseminar, via ovo comercial. Para tanto, será realizado um



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



experimento com três etapas experimentais no Núcleo Experimental de Doenças de Aves, no Laboratório de Bacteriologia e no Laboratório de Biologia Molecular do DVM-EVZ-UFV. Na primeira etapa, será realizada PCR, em tempo real, para detecção dos genes de virulência *rfbJ*, *spvC*, *prot6E* e dos genes de resistência as fluoroquinolonas *qnrA* e *qnrB* em seis sorovares diferentes de *Salmonella* sp., que também serão inoculados em ovos não embrionados para verificar a capacidade de contaminação do albúmen e gema. O sorovar de *Salmonella* que apresentar maior detecção dos genes de virulência e capacidade de contaminar ovos comerciais será utilizado na etapa 2 do experimento. Nesta segunda etapa, 96 poedeiras, com 20 semanas, serão divididas em quatro tratamentos de acordo com a via de inoculação. O Tratamento 1 (T1) as aves não serão inoculadas com o patógeno, caracterizando o tratamento controle. Os tratamentos dois a quatro (T2 a T4) serão os tratamentos contaminados, em que as aves receberão 0,1 mL de solução contendo 107 UFC/mL do patógeno nas seguintes vias: T2 via oviduto, T3 via oral e T4 via intravenosa. As aves serão criadas durante quatro meses e será verificada a capacidade da *Salmonella* - contendo os genes de virulência - de expressar sua patogenicidade nas aves ao causar mortalidade, alterações nos aspectos clínicos, patológicos e desempenho, colonização do sistema digestivo/reprodutor e causar septicemia de acordo com a via de inoculação. A terceira etapa será realizada com os ovos comerciais produzidos pelas poedeiras na etapa 2, com análise dos parâmetros de qualidade do ovo, pesquisa de *Salmonella* e nova detecção dos genes de virulência por PCR, em tempo real, para verificar a capacidade de permanecer com os mesmos genes detectados inicialmente após a passagem pelo organismo das aves. Serão realizadas análises estatísticas com teste de separação de média Tukey a 5% de probabilidade, e teste não paramétrico do qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

#### IV - Sumário do projeto:

☐ **Discussão sobre a não utilização de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**

A pesquisadora responsável diz não haver a possibilidade de utilização de métodos alternativos, embora haja uma etapa experimental com a inoculação *in vitro* de *Salmonella* em ovos comerciais para verificar a capacidade de sobrevivência, adaptação e multiplicação do patógeno no ovo. No entanto, é necessário a inoculação nas aves para verificar o comportamento da bactéria no organismo da mesma, como também a capacidade de contaminar os ovos na sua formação. Por isso, se faz necessária a utilização dos animais no experimento, uma vez que não existe, até o momento, método alternativo que se assemelhe ao estado *in vivo*.

☐ **Grav de Invasividade: GI I**

☐ **Animal utilizado e fonte de obtenção. Deixar explícita a espécie animal, o número total de animais utilizados e o número de animais para cada experimento.**

A pesquisadora responsável informa que os animais serão oriundos do Aviário da EVZ-UFV. Serão utilizadas 96 poedeiras com 20 semanas de vida, após o início da fase de postura que começa com 18 semanas, para garantir que todas as aves realmente são aptas a postura e para uniformizar peso e porcentagem de produção. As aves serão divididas em quatro tratamentos, com 24 aves subdivididas em 12 parcelas constituídas de 2 aves. Os tratamentos serão: A) Tratamento 1 (T1) – Controle: 24 aves não serão inoculadas com o patógeno, constituindo o tratamento controle e serão criadas separadamente; B) Tratamento 2 (T2) – Contaminado via oviduto: 24 aves serão inoculadas com 0,1 mL de solução salina a 0,85% tamponada, contendo 107 UFC/mL do patógeno diretamente no oviduto; C) Tratamento 3 (T3) – Contaminado via oral: 24 aves serão inoculadas com 0,1mL de solução salina a 0,85% tamponada, contendo 107 UFC/mL do patógeno via oral; D) Tratamento 4 (T4) - Inoculação via intravenosa : 24 aves serão inoculadas com 1 mL de solução salina a 0,85% tamponada, contendo 107 UFC/mL do patógeno via veia da asa. Os critérios para definição do delineamento experimental basearam-se em estudos anteriores e semelhantes, bem e o fato de cada ave produzir ovos que também serão pesquisados aumentando significativamente o n. Além disso, há pouco ou nenhuma necessidade de



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



fazer um tratamento controle para cada via de inoculação, considerando que a comparação entre os tratamentos contaminados e um controle já são suficientes e por isso será utilizado apenas um controle ao invés de três.

☐ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:**

O experimento será realizado no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Conforme a pesquisadora responsável, as aves serão alimentadas com ração e água *ad libitum*, a ração será a base de milho moído e farelo de soja, sendo formuladas de acordo com a composição e exigência nutricional específica para poedeiras em fase de produção segundo ROSTAGNO et al. 2011 e a água será limpa, fresca e de qualidade, com troca de ração e água diariamente. O projeto destaca que a ambiência irá seguir o protocolo de bem-estar para aves poedeiras, que indica a temperatura de 20 a 27 °C, umidade de 40 a 65%, intensidade luminosa de 5 a 15 lux, 14 horas de luz/dia e renovação do ar constante. Para manter esses padrões, os ambientes de criação contam com exaustor, ventilador e ar condicionado. Para monitoria das variáveis ambientais, as instalações possuem termohigrômetros para mensurar temperatura e umidade, que serão verificadas três vezes ao dia, e os ventiladores farão a renovação constante do ar, evitando assim o acúmulo de gases tóxicos, como amônia e também evita o acúmulo de poeira. A higiene será mantida com manejo diário de limpeza diária do chão, retirada de excretas e lavagem dos bebedouros. Em complemento, há descrição de que as aves serão alojadas em baterias comerciais de ferro próprias para criação de aves de postura, com as medidas de 100 cm x 45 cm x 40 cm por andar, equipadas com comedouros e bebedouros do tipo lineares de 49 cm e bandejas para retirada das excretas. Cada bateria possui três andares com uma gaiola por andar, a gaiola é dividida em quatro compartimentos com capacidade de alojar duas aves adultas. Por ser uma gaiola comercial, as medidas seguem a orientação dos padrões usados comercialmente para a espécie. Serão alojadas duas galinhas por compartimento, oito aves por gaiola/andar e 24 por bateria conforme sugerido pelo fabricante. Assim, as gaiolas permitem que as aves possam interagir com as aves das gaiolas vizinhas. Embora considerando que a intensão é simular ao máximo as condições a campo, o enriquecimento com objetos pendurados e ou uso de gaiolas enriquecidas com lixas estaria fora da condição pretendida.

☐ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa.**

A pesquisadora responsável expõe que não será realizado nenhum procedimento que infrinja dor ou desconforto as aves e que justificaria o uso de anestésicos, pois as inoculações serão feitas com uma quantidade pequena de inóculo (0,1mL) e as vias oral, intravenosa e oviduto, que são de fácil acesso.

1. *Contenção do Animal:* A contenção das aves durante a inoculação e coleta de amostras será realizada através da imobilização manual das pernas e asas. As aves poedeiras são leves e pequenas (1,25 Kg em média) e por isso sua contenção é facilitada, além disso a equipe possui experiência no manejo com essas aves.

2. *Condições alimentares:* a) Jejum: (X) Sim. Duração em horas: 4 horas, apenas no dia que precede a necropsia, a fim de garantir o esvaziamento do sistema digestivo, para diminuir a chance de ruptura do intestino, pois a ruptura iria contaminar os órgãos o que inviabilizaria a pesquisa de patógenos nestes.

3. *Inoculação / Administração de agentes infecciosos:* a) Inóculo a  $10^7$  de Salmonella. Potencial zoonótico: (X) Sim. Potencial zoonótico; b) Via utilizada para infecção: Tratamento 2 - via oviduto; Tratamento 3 - via intravenosa; Tratamento 4 - via oral; c) Frequência: Única.

4. *Extração de Materiais Biológicos:* a) Material biológico: Suabe de cloaca; Quantidade da amostra: 2 g; Frequência: A cada 15 dias, totalizando 8 amostragens; Método de coleta: Introdução de suabe na cloaca das aves para coleta de fezes frescas; b) Material biológico: Órgãos (Fígado, Baço, Ceco com tonsila cecal, Ovário e Oviduto). Quantidade da amostra: 2 g; Frequência: 1 vez no final do experimento; Método de coleta: Necropsia.

☐ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários.**

A fim de se assegurar o bem-estar das aves utilizadas no experimento, as dimensões das gaiolas utilizadas serão compatíveis para o seu desenvolvimento fisiológico normal, a ambiência também estará de acordo com os recomendados pelos protocolos de bem estar e criação de poedeiras, que serão mantidos com o auxílio de ventiladores, exaustores e ar condicionado para evitar desconforto por estresse térmico e observação do termohigrômetro três vezes ao dia para garantir o controle de temperatura e umidade. A alimentação das aves será formulada de acordo com as



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



exigências nutricionais requeridas para fase de postura, fornecida à vontade, assim como a água de bebida, que será limpa, fresca e de qualidade, com observação diária do consumo de ração e água estão de acordo com o esperado, pois queda no consumo de ração e aumento do consumo de água pode significar estresse térmico, a redução da postura e da qualidade dos ovos também pode ser consequência de problemas ambientais, mas considerando que as aves serão inoculadas com um patógeno essa observação, assim como o aparecimento de sinais clínicos e mortalidade não serão considerados inesperados, embora o sorovar de *Salmonella* inoculado geralmente não cause doença clínica e caracteriza mais problema clínico para a Saúde Pública do que para a Saúde Avícola. As aves serão manejadas, contidas, manuseadas e sofrerão eutanásia por pessoas capacitadas, com treinamento prévio e experiência com experimentação com avicultura e cuidado de aves de postura.

☐ **Riscos aos pesquisadores (físicos, biológicos, psicológicos e sociais) e métodos para preveni-los.**

A pesquisadora responsável destaca que, em razão do experimento ser realizado com um patógeno capaz de se adaptar e sobreviver no meio ambiente, e oferecer riscos de infectar várias espécies animais, incluindo o homem, serão adotadas medidas preventivas, como: treinar os alunos envolvidos no desenvolvimento do trabalho com recomendações rigorosas sob a utilização de equipamentos de proteção individual; impedir a entrada de pessoas não autorizadas e não paramentadas nos isolamentos e sala de necropsia. Além disso, ela menciona que o descarte dos resíduos produzidos (excretas e das carcaças das aves) serão devidamente embalados e encaminhados para incineração. Também serão adotados criteriosos procedimentos de limpeza e desinfecção dos materiais utilizados nos experimentos, nas salas de incubação dos ovos, nos isolamentos das aves e nos laboratórios, como autoclavagem dos materiais utilizados.

☐ **Descrição do método de eutanásia (caso se aplique) e destino dos animais após a aula prática.**

Para a eutanásia também não será necessário uso prévio de anestésicos, pois as aves sofrerão eutanásia com insensibilização prévia nas câmaras de ar controlado (CO<sub>2</sub>), seguido de deslocamento cervical. Método previsto na IN nº 3 de 2000 do MAPA, como abate humanitário e recomendado pelo protocolo de bem-estar de aves poedeiras.

**V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:**

☐ **Quanto a documentos:** O protocolo é composto pela Ficha de Protocolo do Projeto (p. 01-12), Termo de Responsabilidade assinado pelos pesquisadores (p. 13), Certidão de Ata (p. 14) e por um CD com os itens do protocolo físico gravados em mídia digital.

**VI - Parecer da CEUA:**

Após apreciação dos documentos apresentados para atendimento das pendências listadas pela CEUA-UFG, consideramos o projeto **APROVADO**.

**Informação aos pesquisadores:**

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o *Relatório Final* baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **30 de Março de 2017**.

**VII - Data da reunião: 22/08/2016**

  
**Dra. Marina Pacheco Miguel**  
 Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876. Email: ceua.ufg@gmail.com