

Diferenciação molecular de *Salmonella enterica* Gallinarum e *Salmonella enterica* Pullorum provenientes de isolados brasileiros pela técnica de RFLP do gene *fliC**

Jacqueline Boldrin Paiva¹, Juliana da Silva Cavallini¹, Mariana Dias da Silva¹, Adriana Maria de Almeida¹, Henrique Lopes da Angela¹, Angelo Berchieri Jr¹

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP de Jaboticabal-SP. Departamento de Patologia Veterinária, Laboratório de Ornitopatologia.

Introdução

Salmonella enterica Gallinarum (SG) e *Salmonella enterica* Pullorum (SP) são patógenos hospedeiro-específicos de aves. *Salmonella* Pullorum causa a pulorose, doença de aves jovens caracterizada principalmente por septicemia, quadro de diarreia branca e mortalidade. Aves adultas não demonstram a doença, mas podem transmitir SP para a progênie. *Salmonella* Gallinarum causa o tifo aviário, doença com aguda septicemia, alta mortalidade e morbidade que afeta principalmente aves adultas, mas que é muito virulenta para aves de qualquer idade. A diferenciação de SP e SG é muito importante do ponto de vista epidemiológico e preventivo. Elas são muito similares e não podem ser distinguidas por métodos sorológicos convencionais. A diferenciação é basicamente realizada mediante características bioquímicas, o que é caro e laborioso. Cepas intermediárias quanto as principais características bioquímicas empregadas na diferenciação (utilização de dulcitol e descarboxilação da ornitina) tem sido reportadas no mundo (Li et al., 1993) e também no Brasil (Ribeiro et al., 2009).

Recentemente, métodos moleculares têm sido empregados na sorotipagem, como complementares às técnicas básicas de diferenciação pela maior sensibilidade, especificidade e rapidez. Dentre esses métodos destaca-se a técnica de RFLP (polimorfismo de fragmento de restrição). Estudos têm elegido a parte I do gene que codifica a flagelina, *fliC*, para a diferenciação destes sorovares (Kwon et al., 2000). Cepas imóveis como SG e SP geralmente possuem o gene da flagelina, embora este não seja funcional.

A proposta deste estudo foi diferenciar isolados brasileiros de SG e SP, incluindo cepas com comportamento bioquímico atípico, pelo método de PCR associado à RFLP do gene *fliC* utilizando a enzima de restrição *Hinc* II.

Material e Métodos

Cepas Bacterianas. Foram utilizadas 14 cepas de SP, sendo duas com comportamento bioquímico atípico e 22 cepas de SG, sendo uma atípica. As cepas foram cedidas pelos laboratórios: LANAGRO, FIOCRUZ e Instituto Adolfo Lutz.

Extração de DNA. Seguiu-se a metodologia descrita por Soumet et al. (1994). As cepas de SP e SG foram inoculadas em caldo Luria Bertani (LB) e incubadas a 37°C por 24h em agitação (100rpm). Um mililitro de cada cultura foi centrifugado por 3 min, 13000xg (4°C) e os *pellets* foram lavados duas vezes em 500µL de 1X TAE (Tris, Acido acético e EDTA pH 8.0), centrifugado a 13000xg por 3 min (4°C). Os *pellets* foram ressuspensos em 200 µL de água estéril, as amostras fervidas por 8 min e estocadas a -20 °C.

Primers para PCR. Para a amplificação da fase I do gene da flagelina foram utilizados os primers CTGGTGATGACGGTAATGGT (*fliC*F: 866-885) e CAGAAAGTTTCGCACTCTCG (*fliC*R: 1063-1044) Kwon et al. (2000).

Amplificação do gene *fliC*. A reação de PCR continha 16,8 µL de água ultra pura, 2 µL de tampão de PCR (10X), 0,7 µL de d-NTP (2mM), 0,8 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de cada primer, 0,5 µL de Taq DNA polimerase e 3,2µL de DNA. O termociclador foi programado com: 1 ciclo de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de três passos: desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 58 °C por 10 s, extensão a 72 °C por 20 s e um último ciclo de 72 °C por 7 min. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 1 h a 80 V. O tamanho dos produtos foi comparado com o marcador molecular de 50 pb (Fermentas SM1211).

PCR-RFLP. A solução de digestão foi preparada com 5 µL de produto da PCR, 1 µL de tampão *Hinp* 1I (10x), 0,1 µL da enzima *Hinp* 1I e 3,9 µL de água ultra pura. Depois de incubar a 37°C por 1 h, o tamanho dos fragmentos digeridos foi determinado por eletroforese em gel de agarose a 4% por 4 h a 40 V. O tamanho dos fragmentos foi comparado ao marcador molecular de 50bp.

Resultados e Discussão

Salmonella Gallinarum e *Salmonella Pullorum* são patógenos imóveis que infectam aves. Eles não podem ser distinguidos por técnicas sorológicas convencionais porque seus fatores antigênicos somáticos são muito similares. Métodos bioquímicos têm sido complementados por técnicas moleculares. A maioria das cepas de *Salmonella* possuem dois genes estruturais (*fliC* e *fliB*) que codificam o flagelo. Cepas imóveis possuem ambos os genes, mas, são incapazes de construir flagelo funcional. Muitas seqüências codificantes da fase I do gene *fliC* estão disponíveis (Li et al., 1993; Kwon et al., 2000). A porção distal dos alelos *fliC* são conservadas o que permite a fácil amplificação do gene em diferentes sorovares, a partir do mesmo par de *primers*. A porção central do gene *fliC* é hiper-variável o que a torna alvo para a diferenciação entre os sorovares de *Salmonella* (Kilger & Grimont, 1993; Dauga et al., 1998; Li et al., 1993). Kwon et al (2000) demonstraram que a enzima *Hinp*1I reconhece um sítio de clivagem em SG (codon 316) mas não em SP.

PCR-RFLP tem sido comumente empregada como técnica de diferenciação por ser de baixo custo e fácil execução. Em nosso estudo o gene *fliC* de todas as 14 cepas de SP e 22 cepas de SG analisadas incluindo cepas intermediárias dulcitol e ornitina descarboxilase positivas e negativas provenientes de isolados de campo brasileiros foram amplificadas com sucesso. Nenhum pareamento inespecífico foi observado. Os amplicons de 197 pb são mostrados na Figura 1. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima *Hinp*1I. Dois fragmentos foram obtidos (82pb e 115pb) para todas as cepas de SG testadas incluindo a atípica (dulcitol e ornitina descarboxilase positiva) e nenhuma digestão foi observada nas 14 cepas de SP testadas, incluindo as duas cepas atípicas, permanecendo o fragmento inalterado (197pb) (Figura 2).

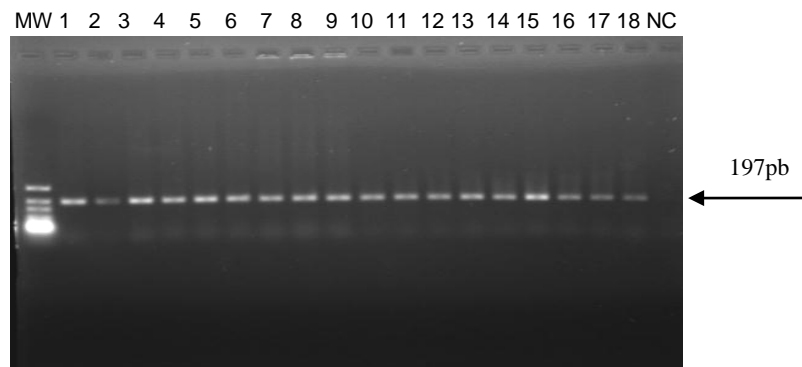


Figura 1 - Eletroforese dos amplicons do gene *fliC* a partir de amostras de SP e SG. MW Marcador molecular 50pb; de 1 a 9 amostras de SP; de 10 a 18 amostras de SG; NC controle negativo (água ultra pura).

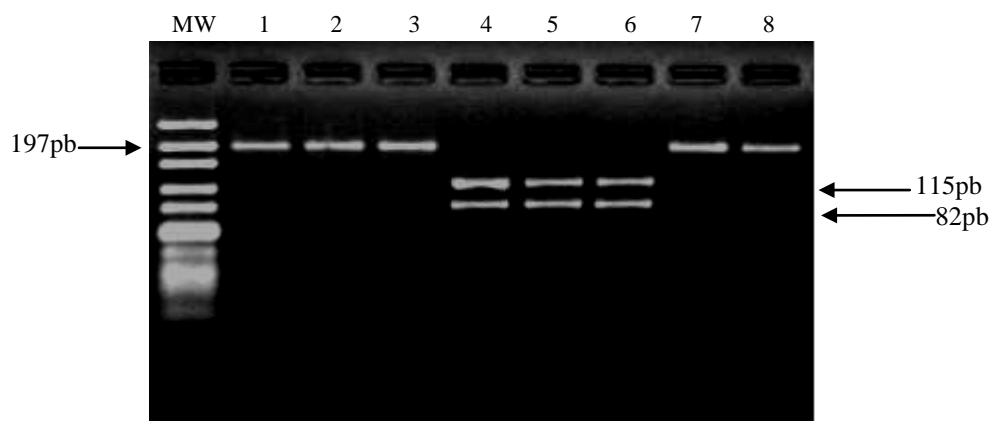


Figura 2 - Eletroforese do gene *fliC* após o tratamento com a enzima *HincII*.

MW Marcador molecular 50bp; 1, 2 e 3: produto da digestão dos amplicons de SP; 4, 5 e 6: fragmentos de restrição do gene *fliC* a partir dos amplicons de SG; 7: amplicon de SP não submetido a restrição enzimática (controle positivo de SP); 8: amplicon de SG não submetido a restrição enzimática (controle positivo de SG).

Conclusões

Em nosso trabalho nós demonstramos que a técnica de PCR associada à RFLP empregada para o gene *fliC* é útil para diferenciação de SG e SP incluindo cepas com comportamento bioquímico atípicos não passíveis de diferenciação segura até então.

Literatura citada

DAUGA C.A.; ZABROVSCALA, A.; GRIMONT P.A.D. Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p.2835-2843, 1998.

KILGER G.; GRIMONT, P.A.D. Differentiation of *Salmonella* phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified *fliC* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.31, p.1108-1110, 1993.

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

LI J, SMITH NH, NELSON K, CRICHTON PB, OLD DC, WHITTAM TS, SELANDER RK. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. **Journal of General Microbiology**, Vrijdag, v.38, p. 129-139, 1993.

SOUMET C, ERMEL G, FACH P, COLIN P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, Badford, v.19, p. 294-298, 1994.

RIBEIRO SAM, PAIVA JB, ZOTESO F, LEMOS M V F, BERCHIERI JR A. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v.40, p. 84-188, 2009.