

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS (ELISA) PARA DETECÇÃO
DA RESPOSTA SOROLÓGICA CONTRA *Salmonella*
Gallinarum, *Salmonella Pullorum*, *Salmonella Enteritidis* E
Salmonella Typhimurium EM AVES.**

Gláucia Helaine de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Berchieri Júnior

Co-Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA (Patologia Animal).

JABOTICABAL

ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

2004.

SUMÁRIO

	Páginas
1- INTRODUÇÃO _____	1
2-REVISÃO DE LITERATURA _____	3
2.1.- Salmonella e Salmoneloses Aviárias _____	3
2.2 – Ensaio Imunoenzimático – ELISA _____	7
3- OBJETIVOS _____	12
3.1-Objetivo Específico _____	12
3.2-Objetivos Gerais _____	12
4- MATERIAL E MÉTODOS _____	13
4.1.- Preparo do Antígeno _____	13
4.2-Obtenção de Soros Hiperimunes _____	15
4.3- Padronização da Dose de Reatividade do Antígeno _____	16
4.4- Ensaio com Soros Hiperimunes _____	16
4.5- Ensaio Complementares para Avaliação do ELISA _____	17
4.6- Ensaio Imunoenzimático – ELISA Indireto _____	18
4.7- Caracterização dos Antígenos _____	20
4.7.1- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) _____	20
4.7.2- Reação de Western Blotting _____	21
5-RESULTADOS _____	22
5.1 – Obtenção de Soros Hiperimunes _____	22
5.2- Padronização da Dose de Reatividade do Antígeno _____	22
5.3- Ensaio com Soros Hiperimunes _____	26
5.4- Ensaio Complementares para Avaliação do ELISA _____	32
5.5- Caracterização dos Antígenos _____	37
5.5.1- SDS PAGE _____	37
5.5.2- Western Blotting _____	38
6- DISCUSSÃO _____	40
7-CONCLUSÕES _____	45
8- REFERÊNCIAS _____	46

LISTA DE TABELAS

Páginas

<i>Tabela 1- Padronização da dose de reatividade do antígeno. ELISA/AgSG indireto com amostras de soros positivo e negativo para S. Gallinarum. _____</i>	23
<i>Tabela 2- Padronização da dose de reatividade do antígeno. ELISA/AgSE indireto com amostras de soros positivo e negativo para S. Enteritidis. _____</i>	24
<i>Tabela 3- Padronização da dose de reatividade do antígeno ELISA/AgTM indireto com amostras de soros de aves positivo e negativo para S. Typhimurium. _____</i>	25
<i>Tabela 4 ELISA/AgSG com amostras de soro hiperimune reagentes para diversas salmonelas para determinação da diluição da amostra de soro e da DO. _____</i>	28
<i>Tabela 5 – ELISA/AgSE com amostras de soro hiperimune reagentes para diversas salmonelas para determinação da diluição da amostra de soro e da DO. _____</i>	29
<i>Tabela 6 – ELISA/AgTM com amostras de soro hiperimune reagentes para diversas salmonelas para determinação da diluição da amostra de soro e da DO. _____</i>	30
<i>Tabela 7- ELISA/AgSG e ELISA/AgSE com amostra de soro hiperimune proveniente de ave imunizada com S. Gallinarum. _____</i>	31
<i>Tabela 8- ELISA indireto com amostras de soros hiperimunes para verificar interferência na reação antígeno-anticorpo. _____</i>	31
<i>Tabela 9- ELISA indireto com os conjugados peroxidase e fosfatase alcalina para verificar interferência na reação antígeno-anticorpo. _____</i>	32
<i>Tabela 10- ELISA competitivo usando o AgSE diluído a 1:5.000 (fosfatase alcalina) com amostras de soros de aves imunizadas com S. Gallinarum e S. Pullorum. _____</i>	32
<i>Tabela 11- ELISA/AgSG com amostras de soros (diluído 1:1.000) provenientes de aves com suspeita de tifo aviário. _____</i>	33
<i>Tabela 12- ELISA/AgSG com amostras de soros (diluído 1:1.000) provenientes de aves, variedade vermelha, experimentalmente infectadas com Salmonella Gallinarum. ____</i>	34
<i>Tabela 13- ELISA/AgSG com amostras de soros (diluído 1:1.000) provenientes de aves experimentalmente infectadas com Salmonella Pullorum . _____</i>	35
<i>Tabela 14- ELISA/AgSE com amostras de soros (diluído 1:1.000) provenientes de aves vacinadas contra Salmonella Enteritidis. _____</i>	36
<i>Tabela 15- ELISA indireto para análise da reatividade entre o grupo B e D com amostras de soros positivos para AgSG, AgSE e AgTM.. _____</i>	37

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<i>Figura 1- Protocolo de preparação do antígeno</i> _____	14
<i>Figura 2- Visualização da reação do ELISA indireto</i> _____	19
<i>Figura 3- Composição dos polipeptídeos dos antígenos de S. Enteritidis (AgSE), S. Gallinarum (AgSG) e S. Typhimurium (AgTM). As frações foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% contendo SDS, e as bandas de proteínas foram visualizadas pela coloração com Coomassie brilliant blue, utilizando amostras de 5µL. Padrão molecular em kilodaltons (kDa) indicado a esquerda.</i> _____	38
<i>Figura 4- Reconhecimento de polipeptídeos do antígeno de proteína solúvel de S. Enteritidis, S. Gallinarum e S. Typhimurium por anticorpos presentes no soro de aves imunizadas com S. Enteritidis (1), S. Typhimurium (2) e S. Gallinarum (3).</i> _____	39

**ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS (ELISA) PARA DETECÇÃO DA RESPOSTA
SOROLÓGICA CONTRA *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum*, *Salmonella*
Enteritidis E *Salmonella Typhimurium* EM AVES.**

RESUMO

Foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA indireto para a detecção de resposta sorológica de aves para *Salmonella* sorotipos Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium. Utilizou-se antígeno solúvel obtido por meio de sonicação de cultura de *Salmonella Gallinarum* (AgSG), *Salmonella Enteritidis* cepa aflagelar (AgSE) e *Salmonella Typhimurium* cepa aflagelar (AgTM), os conjugados peroxidase e fosfatase alcalina e amostras de soros positivos e negativos de vários sorotipos de salmonelas. Os resultados demonstraram que o AgSG pode ser utilizado diluído a 1:25.000 (peroxidase e fosfatase alcalina). Observou-se que o ELISA contendo *S. Gallinarum* como antígeno e fosfatase alcalina como enzima, propicia a separação de reações positivas para Gallinarum e Pullorum de Enteritidis. O AgSE pode ser utilizado diluído a 1:10.000 (peroxidase) ou 1:5.000 (fosfatase alcalina). Nestas condições, o ELISA/AgSE detectou resposta sorológica para os sorotipos Enteritidis, Gallinarum e Pullorum. O ELISA com o AgTM demonstrou que o antígeno pode ser diluído a 1:20.000 para ambos os conjugados. O ELISA/AgTM demonstrou reatividade entre salmonelas dos grupos B e D. Todas as amostras de soros testes devem ser analisadas diluídas a 1:1.000. Concluindo, o ELISA mostrou-se um teste útil para identificar aves com reação sorológica contra *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, podendo ainda identificar aves com sorologia positiva para *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* sem que haja reação cruzada com amostras de soro de aves vacinadas ou infectada por *S. Enteritidis*.

Palavras chaves: Aves, Conjugado, ELISA, *Salmonella* sp.

**ASSESSMENT OF SEROLOGIC RESPONSE OF CHICKENS AGAINST *Salmonella*
Gallinarum, *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Enteritidis AND *Salmonella*
Typhimurium BY ELISA**

SUMMARY

This study was done to assess the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for detection chicken serologic response against *Salmonella enterica* serotypes Gallinarum, Pullorum, Enteritidis and Typhimurium. The test was performed using soluble proteins from *Salmonella* Gallinarum strain 9 (AgSG), from non-flagellate *Salmonella* Enteritidis strain (AgSE) and from not flagellate *Salmonella* Typhimurium (AgTM) strain as detecting antigen and peroxidase and alkaline phosphatase enzymes, as conjugate. According to the results, the antigen has to be diluted at 1:25.000 (AgSG, peroxidase and alkaline phosphatase). In addition, using alkaline phosphatase enzyme, the assay was helpful to separate positive serological reaction to serotypes Gallinarum and Pullorum from Enteritidis. To the ELISA/AgSE, the antigen has to be diluted at 1:10.000 for peroxidase assay and at 1:5.000 for alkaline phosphatase assay. In this condition, the ELISA/AgSE can detect serological reaction to *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* and *S. Pullorum*. To the ELISA/AgTM the antigen has to be diluted at 1:20.000 to both enzymes. In this condition the ELISA/AgTM showed sensibility but was no possible to separate positive serological reaction to serotype concerning at the group B and group D. In all test, the sample of serum has to be diluted at 1:1.000. Therefore, the ELISA was able to identify reactors birds to *Salmonella* antigens and also to detect serological response to *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* antigen with no cross-reaction with serum samples taken from birds either challenged or vaccinated against *S. Enteritidis*.

Keywords: Conjugate, Chickens, ELISA, *Salmonella* sp.

1- INTRODUÇÃO

As primeiras bactérias do gênero *Salmonella* foram identificadas em fins do século XIX. *Salmonella* Typhi foi a primeira a ser reconhecida como patógeno sendo encontrada em baço e linfonodos de seres humanos. Em 1885, Salmon e Smith isolaram um bacilo de suínos doentes, o qual denominaram *Bacterium suispestifer*. Esta bactéria foi denominada posteriormente *Salmonella* Cholerasuis.

As salmonelas são de distribuição mundial e podem ser carregadas por ampla variedade de hospedeiros, incluindo animais silvestres, domésticos e o homem. Embora outros patógenos estejam envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar, as salmonelas continuam sendo os agentes mais freqüentes e, em conjunto com a *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum, causam prejuízos para a indústria avícola. Deste modo, devido a sua importância econômica em vários países, o controle é essencial para prevenir o aparecimento e/ou a re-infecção de lotes de aves comerciais. Assim como havia ocorrido em várias partes da Europa, Ásia e América do Norte, a partir da década de 90 surtos de salmoneloses humanas decorrentes da ingestão de alimentos de origem animal, a maioria associada com produtos avícolas, passaram a ocorrer com mais freqüência no Brasil. Este fato concorreu para a elaboração do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que visa o controle de enfermidades avícolas e estabelece normas a respeito da presença de *Salmonella* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Gallinarum e *S.* Pullorum em granjas reprodutoras, propondo sua prevenção ou eliminação e medidas de monitorização em estabelecimentos avícolas que procedam ao comércio nacional e internacional de seus produtos. O controle de salmonelas baseia-se no emprego de métodos bacteriológicos e no teste de pulorose. Sendo a excreção intermitente, nem sempre as salmonelas estão presentes nas fezes de aves contaminadas e o teste de pulorose pode ser prejudicado por práticas que estão sendo adotadas, como a vacinação contra *Salmonella* Enteritidis.

Estas salmonelas podem entrar no País por meio da importação de aves reprodutoras e depois se espalham com facilidade entre os animais. Desse modo, é desejável que se encontre um método de identificação de aves acometidas pelos sorotipos de importância em saúde pública e saúde animal (*Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*) como forma de controle, tanto para monitoração de infecções a campo e plantéis reprodutores, como de aves recém adquiridas, indicando se a mesma teve ou não contato, ou se é proveniente de plantel que foi acometido por uma das salmonelas em questão. Diante desse cenário, trabalhos com ensaios imunoenzimáticos visando a resposta sorológica contra *Salmonella* em aves, têm sido realizados baseados numa variedade de antígenos. Conforme o antígeno utilizado pode-se esperar maior ou menor reatividade cruzada para os diversos sorotipos de *Salmonella*.

Em vista da frequência de salmonelas em surtos de toxinfecção alimentar e da necessidade de uma via alternativa para monitoramento de plantéis avícolas, o propósito deste estudo foi elaborar e verificar a aplicabilidade de um ensaio imunoenzimático ELISA pelo método indireto, empregando-se sorotipos de importância em saúde pública e saúde animal, e estabelecendo as condições de emprego dos antígenos e as condições em que o ELISA possa ser utilizado.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1.- *Salmonella* e Salmoneloses Aviárias

As salmonelas são bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes curtos ($0,7-1,5\mu/2,0-5,0\mu$), Gram negativos, móveis com flagelos peritríquios, sendo alguns imóveis. São aeróbios e anaeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, fermentam açúcares com produção de gás e são produtores de H_2S . As salmonelas possuem uma complexa constituição antigênica (antígenos somático "O", flagelar "H", capsular "K") (HOLMES & GROSS, 1990; HOLT et al., 1994; GAST, 1997; BARROW, 2000). Alguns sorotipos são mais restritos ao trato intestinal, enquanto outros são capazes de invadir a corrente circulatória, podendo desencadear septicemia (COOPER, 1994; BERCHIERI Jr & BARROW, 1995).

A maioria dos sorotipos de salmonelas cresce em meio com citrato. Em meios comuns para enterobactérias podem ser confundidos com coliformes. O deoxicolato de sódio é usado na produção de meios seletivos para seu isolamento do intestino, por inibir o crescimento de coliformes. As colônias em ágar sangue medem de 1 a 3mm, variando muito em sua forma, podendo se apresentar lisas, circulares convexas ou achatadas, bordos denteados ou não (HOLT et al., 1994; GAST, 1997).

A pesquisa de *Salmonella* pode ser feita examinando-se fezes e órgãos de eleição, como fígado e baço. As amostras podem ser plaqueadas diretamente em meios sólidos, seletivos para enterobactérias, ou passar por processo de enriquecimento em caldos seletivos (selenito, tetracionato, Rappaport-Vassiliadis) (HOLT et al., 1994; GAST, 1997).

As salmonelas são mortas pelo calor à temperatura de $55^{\circ}C$ por 1 hora ou a $60^{\circ}C$ durante 15 a 20 minutos. Na classificação apresentada por HOLT et al. (1994), todos os sorotipos de *Salmonella* pertencem a duas espécies: *Salmonella bongori*, que contém menos que 10 sorotipos que são extremamente raros, e *Salmonella choleraesuis*, com cerca de 2.500 sorotipos que se dividem fenotípica e

genotipicamente em seis subespécies (HOLT et al., 1994; GAST, 1997). Atualmente, os sorotipos não têm sido mais escritos em itálicos e sim da forma proposta por POPOFF et al. (1996), onde o gênero *Salmonella* passaria a apresentar duas espécies: *Salmonella enterica* com seis subespécies e *Salmonella bongori*. Assim, a designação de *Salmonella typhimurium* passaria a ser *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium, ou de forma simplificada *Salmonella* Typhimurium.

Em aves podem ser considerados três tipos de infecção por *Salmonella*. A primeira refere-se a sorotipos invasivos que provocam infecção do sistema retículo endotelial, com pouco ou nenhum envolvimento intestinal; a segunda refere-se aos sorotipos invasivos com extensa colonização intestinal, como por exemplo *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, que colonizam o trato entérico com excreção fecal e provocam doença sistêmica envolvendo o sistema retículo endotelial e a terceira refere-se aos sorotipos não invasivos com extensa colonização intestinal (BARROW, 1995; ZHANG-BARBER et al., 1999). A variação entre as cepas pode afetar a resposta imune, quanto a infectividade e a invasão (GAST, 1998).

A patogenicidade das salmonelas depende de uma série de fatores associados à bactéria, à ave e às condições de criação. A associação e penetração da bactéria na mucosa digestiva é um pré-requisito para a infecção sistêmica, onde outras células são invadidas (BARROW, 1995; RYCHLIK et al., 1998). Segundo SILVA et al. (1981) e BARROW (2000) os sorotipos Gallinarum e Pullorum não colonizam o trato digestório, exceto como conseqüência de doença.

O mecanismo pelo qual *Salmonella* migra da submucosa para tecidos linfáticos e é ingerida por células fagocíticas do sistema imune é desconhecido. A seguir, alcançam a corrente sangüínea e residem no fígado, baço e medula óssea. Nesse estágio ocorre a multiplicação, que dependerá da cepa de *Salmonella* e da resistência genética do hospedeiro (HORMAECHE et al., 1993).

Durante a infecção sistêmica as salmonelas interagem com macrófagos e fagócitos polimorfonucleares, sendo a habilidade para se multiplicar dentro destas células um pré-requisito para virulência (MASTROENI et al., 1995). CHADFIELD et al. (2003) demonstraram em estudos experimentais com *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S.*

Abortus-ovis, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e macrófagos de aves e de camundongos, que a interação entre ambos é fundamental para causar doença sistêmica no animal. Segundo KAISER et al. (2000), *S. Gallinarum*, em comparação com outros sorotipos, não induz a resposta inflamatória, limitando a ação do sistema imune e podendo desencadear uma severa doença sistêmica. Isto pode ocorrer devido ao fato de *S. Gallinarum* ser aflagelar e a flagelina ser um potente indutor de citocinas (WYANT et al., 1999).

A invasão do epitélio intestinal ocorre via superfície apical onde a *Salmonella* induz à ruptura e o afastamento das microvilosidades, provocando a endocitose e migrando através da célula. Acredita-se que a invasão ocorra por um receptor mediador de endocitose, embora esses receptores não tenham sido identificados. A complexidade do mecanismo de invasão da *Salmonella* mostra sua alta capacidade de invadir diferentes tipos de células (FINLAY & FALKOW, 1989; LAX et al., 1995; CHADFIELD et al., 2003).

Aves infectadas com sorotipos invasivos, como *S. Enteritidis*, desenvolvem uma resposta imune com presença de IgG persistente (BARROW, 1994b). WITHANAGE et al. (1999) utilizando antígeno de proteína solúvel de *S. Enteritidis* observaram que o nível de anticorpos segue um padrão idêntico no soro e no oviduto, com predominância do isotipo IgG. Todas as subclasses de imunoglobulinas (Ig) em aves infectadas foram maiores que em aves do grupo controle, sendo que a produção de IgG e IgM chegou ao máximo 14 dias pós-infecção. HASSAN et al. (1991) demonstraram a presença de IgG em infecção experimental e em reinfecção com *S. Typhimurium*. No caso de *S. Pullorum* a produção máxima de anticorpos foi observada 100 dias pós-infecção (BARROW & LOVELL, 1991; HASSAN et al., 1991; BARROW, 1992b).

Algumas salmonelas apresentam predileção por determinados hospedeiros, como é o caso de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, agentes da pulorose e do tifo aviário, respectivamente. A grande maioria das salmonelas não possui hospedeiro específico, podendo infectar indistintamente seres humanos e animais. Esses sorotipos podem ser responsáveis pelo paratifo aviário. Cerca de uma centena deles têm sido isolados de

aves, causando ou não a enfermidade (GAST, 1997; BERCHIERI Jr, 2000) e acarretando problemas econômicos para a indústria avícola (BARROW, 1998).

Os sorotipos mais invasivos podem infectar o trato reprodutor e provocar infecção no ovário da ave, onde *S. Pullorum* pode persistir durante meses, levando à contaminação do ovo. *Salmonella* Enteritidis, em função da contaminação do aparelho reprodutor e da cloaca, poderá contaminar o ovo, originando a transmissão vertical (BARROW, 1999). A pulorose é uma enfermidade que pode acometer aves de qualquer idade, sendo mais comum nas três primeiras semanas de vida. Nesse período, a mortalidade pode ser alta e as aves que sobrevivem à doença podem se tornar portadoras, crescer dentro dos parâmetros zootécnicos esperados e produzir ovos contaminados (BARROW et al., 1992; BERCHIERI Jr, 2000).

A *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* apresentam semelhanças quanto às suas características antigênicas e bioquímicas. Não possuem flagelos, apresentam os antígenos somáticos 1, 9 e 12, crescimento mais lento em meios de cultivo e produzem pouco H₂S no ágar TSI inclinado, ao contrário das demais salmonelas. A epidemiologia do tifo aviário tem sido muito relacionada com a epidemiologia da pulorose (SHIVAPRASAD, 1997). No entanto, quanto à relação parasita-hospedeiro, a *S. Gallinarum* pode ser encontrada nas aves desde a infecção até a manifestação clínica, sendo eventual em aves sobreviventes (BUMSTEAD & BARROW, 1993; BARROW, 2000; BERCHIERI Jr. et al., 2001). O tifo aviário é uma enfermidade agressiva para aves de qualquer idade, no entanto sua ocorrência é mais comum entre aves adultas (BARROW et al., 1992; BUMSTEAD & BARROW, 1993; BERCHIERI Jr, 2000). Entre as décadas de 70 e 90 a incidência da doença no Brasil afetou aves reprodutoras e poedeiras comerciais, acarretando redução da produção de ovos e aumento da mortalidade (BERCHIERI Jr et al., 1995). O tifo aviário continua a ser observado em plantéis de aves poedeiras comerciais (BERCHIERI Jr, dados não publicados).

O paratifo aviário não tem agente específico. Excetuando-se os agentes do tifo aviário e da pulorose, os demais sorotipos de *Salmonella* podem causar o paratifo. *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* causam salmoneloses em aves com maior frequência que outros sorotipos (SNOEYENBOS, 1991). Embora aves adultas sejam relativamente

resistentes à multiplicação sistêmica, ocorre a colonização do trato digestivo na ausência de doença. A doença clínica é normalmente observada em pintinhos quando esses são infectados logo após o nascimento (BARROW, 2000). Experimentalmente, BARROW (1991) observou que cepas de *S. Enteritidis* variam consideravelmente na capacidade de causar doença sistêmica em aves recém-nascidas, com mortalidade de 0% a 100%. Independente da presença de manifestações clínicas, os sorotipos relacionados com o paratifo aviário estão associados a casos de toxinfecção alimentar no homem (BARROW, 1999, 2000).

Em face da associação de salmoneloses humanas a alimentos preparados com produtos de origem avícola, esse setor necessita melhorar os mecanismos de controle de *Salmonella* em granjas. É importante a identificação de granjas que possuem aves infectadas para poder prevenir a contaminação de produtos aviários destinados ao consumidor (GAST, 1998).

2.2 – Ensaio Imunoenzimático – ELISA

O ELISA tem sido usado para a detecção de resposta sorológica a parasitas (SINCLAIR, 1982), bactérias (TALKINGTON et al., 1985) e vírus (ISLAM & JONES, 1988), sendo aceito por sua alta sensibilidade, segurança e desempenho favorável, quando comparado com outros métodos diagnósticos (KIM et al., 1991). NAGARAJA et al. (1984) e NAGARAJA et al. (1986) iniciaram os estudos com ELISA em perus com infecção por *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*. A seguir, vários trabalhos demonstraram o significado do ELISA indireto para detecção de anticorpo circulante para dois dos mais importantes sorotipos de *Salmonella* em aves, Typhimurium (BARROW et al., 1989; DADRASST et al., 1990) e Enteritidis (COOPER et al., 1989; DADRASST et al., 1990; NICHOLAS & CULLEN, 1991). Trabalhos realizados por BARROW (1991, 1992b) demonstraram a ausência de reação cruzada em testes com soros de aves experimentalmente inoculadas, via oral ou parenteral, com outras enterobactérias, incluindo *E. coli* patogênica para aves, *Citrobacter* spp, *Klebsiella* spp e *Proteus* spp.

O ELISA tem sido empregado para detectar resposta sorológica contra microrganismos do gênero *Salmonella*, embora o monitoramento bacteriológico seja tradicionalmente o suporte principal para determinar uma infecção no plantel (BARROW, 1998). Segundo BARROW et al. (1989), IBA et al. (1991), NICHOLAS & CULLEN (1991), BARROW et al. (1992), van ZIJDERVELD et al. (1993), BERCHIERI Jr. et al. (1995) nem todas as aves sorologicamente positivas apresentam excreção fecal durante os exames bacteriológicos, mas todas as aves positivas em exame microbiológico apresentam soropositividade no ELISA.

A técnica do ELISA pode detectar resposta sorológica em aves portadoras quando não for possível a identificação por meio de exames bacteriológicos mediante cultura de suabe cloacal, amostras de cama e amostras de órgãos de aves velhas (DADRASST et al., 1990). Este teste baseia-se na detecção primária de IgG, no soro ou na gema do ovo, podendo também ser adaptado para detectar IgM (HASSAN et al., 1990). Diferente de outros testes sorológicos como fixação de complemento e soroaglutinação, para a realização do ELISA as amostras de soros não necessitam de cuidados especiais. Títulos de anticorpos não decaem se as amostras de soros ou as de sangue são secas em papel absorvente (HASSAN et al., 1990; MINGA & WRAY, 1990). Além disso, soro seco pode ser estocado em temperatura ambiente por várias semanas e tratados com desinfetantes (vapor de fenol ou clorofórmio) ou pelo calor à 56°C por 30 minutos sem nenhum efeito sobre o título (HASSAN et al., 1990). Segundo esses autores, o tratamento prejudica a amostra se for feito com óxido de etileno, vapor de formol e irradiação gama. Trabalhos realizados com amostras de soros de animais que sofreram tratamento com antibioticoterapia mostraram resultados contraditórios com relação ao título de anticorpos (DESMIDT et al., 1992; GOREN, 1992).

Os antígenos utilizados em testes sorológicos podem ser extracelulares, intracelulares ou estruturais, de natureza protéica, glicoprotéica, polissacarídica, lipopolissacarídica ou lipídica. A escolha do antígeno para provas sorológicas depende de suas propriedades e do teste a ser utilizado. Os antígenos somáticos normalmente funcionam melhor para testes de imunofluorescência e aglutinação direta, enquanto os

antígenos solúveis são melhores em testes de precipitação, ELISA e imunodifusão (DE BOER & SCHAAD, 1990).

O lipolissacarídeo (LPS) é um componente antigênico importante situado na parede celular de bactérias Gram negativas (JAUHO et al., 2000), sendo considerado muito bom para o uso em ensaios cujo princípio é a detecção de anticorpos (BARROW et al., 1996). Em ELISA são utilizados LPS provenientes de um ou de vários sorotipos de *Salmonella* (DADRASST et al., 1990; HASSAN et al., 1990; KIM et al., 1991; NICHOLAS & CULLEN, 1991). De acordo com CHART et al. (1990), quando o teste utiliza LPS como antígeno, pode haver reatividade cruzada no caso de infecções por salmonelas dos grupos B e D devido a presença do antígeno comum O12. Trabalhos realizados por NICHOLAS & CULLEN (1991) com antígeno de *S. Enteritidis*, e por BARROW et al. (1992) com antígeno de *S. Gallinarum* em soro de aves infectadas por *S. Typhimurium*, e ainda por NICHOLAS & CULLEN (1991) com antígeno de *S. Typhimurium* com soro positivo para *S. Enteritidis*, demonstraram a presença de reatividade entre os grupos B e D.

Antígenos flagelares também podem ser usados, porém a IgG antíflagelo é menos persistente que IgG anti-LPS, não sendo detectável no soro após quatro meses (HASSAN et al., 1990; TIMONEY et al., 1990; BAAY & HUIS in't VELD, 1993). Além disso, nem todas as aves experimentalmente infectadas com *S. Enteritidis* desenvolvem títulos de anticorpos específicos antíflagelo (TIMONEY et al., 1990).

Outros antígenos com maior especificidade têm sido amplamente produzidos, incluindo os antígenos de proteínas de superfície, antígenos de proteína bacteriana solúvel (sonicado) e antígenos extraídos pelo método do calor. O uso desses antígenos resulta numa melhor indicação de aves afetadas do que nos testes onde se utiliza antígeno LPS (DADRASST et al., 1990; HASSAN et al., 1990; KIM et al., 1991; NICHOLAS & CULLEN, 1991). A eficiência desse antígeno foi comprovada em ensaios usados para analisar amostras de soros de aves infectadas por *S. Gallinarum* e não infectadas (BERCHIERI Jr et al., 1995).

Uma variedade de conjugados como *acetyl cholinestrace*, *cytochrome c*, *B-D-galactosidase*, *glucoamylase*, *glucose oxidase*, *B-D-gluconidase* e *ribonuclease* têm

sido usados na reação de antígeno-anticorpo. Contudo, a fosfatase alcalina e a peroxidase são os mais utilizados em trabalhos de pesquisa, porque são de fácil conjugação e baixo custo, além de haver uma ampla variedade de substratos que podem ser usados. Os conjugados devem ser estáveis, possuir alta reatividade e ser seguro. São melhores estocados na forma concentrada e devem ser diluídos antes do uso. A diluição é determinada de acordo com o tempo de incubação e/ou o tempo de reação com o substrato. Assim sendo, quando o conjugado é mais diluído são necessários tempos mais longos de incubação e vice-versa (VOLLER et al., 1979).

Testes sorológicos para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e outros sorotipos invasivos têm sido indicados para monitoria de granjas (BARROW et al., 1989; HASSAN et al., 1990; MINGA & WRAY, 1990; BARROW & LOVELL, 1991; NICHOLAS & CULLEN, 1991), e também como indicativo do perfil de infecção no plantel, que persiste por vários meses depois de seguidas infecções com salmonelas (BARROW, 1992a), uma vez que a infecção oral normalmente leva a produção de anticorpos circulantes, principalmente da classe IgG (BARROW, 1991, 1994b; DESMIDT et al., 1993).

Títulos de IgG são detectados duas semanas após infecção, alcançam o pico máximo entre quatro e cinco semanas e podem ser detectados até nove meses depois, enquanto títulos detectáveis de IgM aparecem antes e junto com os de IgA, e decrescem para títulos não detectáveis em nove semanas pós-infecção (BARROW & LOVELL, 1991; HASSAN et al., 1991; BARROW, 1992b; DESMIDT et al., 1998).

Altos títulos de IgG persistem por até 16 semanas após a infecção por *S. Enteritidis* (COOPER et al., 1989; BARROW & LOVELL, 1991; KIM et al., 1991) e por até 30 semanas após infecção por *S. Gallinarum* (BARROW et al., 1992). Em aves inoculadas com *S. Typhimurium* títulos elevados de anticorpos persistem por 45 semanas (BARROW, 1992b) ou por até quatro meses (HASSAN et al., 1990) após a infecção. A reinfecção das aves com o mesmo organismo não parece aumentar o título sérico de IgG consideravelmente (HASSAN et al., 1991; BARROW et al., 1992). O título de IgG obtido é, de alguma forma, dependente do período de excreção fecal, mas não necessariamente para todos os indivíduos do plantel (HUMPHREY et al., 1991;

BARROW, 1992b). Isto enfatiza o valor do ELISA e presumivelmente de outros testes sorológicos que podem ser aplicados para avaliação de um grupo de animais (HASSAN et al., 1990; BARROW, 1992b).

A multiplicação da bactéria no tecido, a idade e o estado geral da ave, a prática de manejo e o início da postura podem influenciar a resposta imune do hospedeiro e, portanto, os resultados de testes sorológicos (BUMSTEAD & BARROW, 1988; BARROW, 1992a; BARROW et al., 1992; HOLT, 1992). Provas sorológicas para detecção de anticorpos contra *S. Enteritidis* em aves usando antígenos feitos a partir de *S. Pullorum* têm sido usadas em procedimentos convencionais de avaliação, porém os resultados apresentados não são confiáveis (KIM et al., 1991).

Segundo CHART & ROWE (1993) e BARROW (1994b), a técnica do ELISA indireto é simples e reagentes disponíveis são aplicáveis a todos os sorotipos de *Salmonella* para exame sorológico de aves, perus e patos. Devido a fácil operação, sensibilidade e especificidade, pode ser adaptado para monitoramento de plantéis de aves reprodutoras e comerciais. A maior parte dos imunoenaios enzimáticos pode ser completada em algumas horas e o monitoramento sorológico para *Salmonella* é compatível com testes para outros agentes infecciosos, pois uma simples amostra pode prover material para diversos ensaios sorológicos (GAST, 1998). Além disso, o número de amostras colhidas para detectar aves sororeagentes dentro de um aviário pode ser reduzido (BARROW, 1992a, 1994b; THORNS et al., 1993).

O surgimento de novos ensaios experimentais para *Salmonella* é importante para o entendimento dos parâmetros que podem afetar a capacidade do ELISA empregado na detecção de animais com resposta sorológica a um agente infeccioso (BARROW, 1992b).

Trabalhos anteriores realizados por IBA et al. (1991), BARROW et al. (1992) e BERCHIERI Jr et al. (1995) demonstraram a utilidade do ELISA, empregando proteína solúvel como antígeno, para a detecção de resposta sorológica a *Salmonella* por aves pertencentes a plantéis que foram contaminados, estando ou não infectados. Segundo esses autores, o ELISA pode ser mais específico que outros métodos sorológicos, eliminando-se as reações falsas positivas.

3- OBJETIVOS

3.1-Objetivo Específico

- Elaborar ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISAs) para detectar resposta sorológica contra *Salmonella* sorotipos Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium em aves de exploração comercial.

3.2-Objetivos Gerais

- Determinar a concentração desejável dos componentes da reação do ensaio imunoenzimático.
- Determinar a diluição desejável da amostra de soro a ser testada e a densidade óptica correspondente ao valor positivo para os três tipos antígenos.
- Desenvolver um teste aplicável na monitoria sorológica de plantéis avícolas visando detecção de resposta sorológica para os quatro sorotipos em questão.
- Avaliar o teste frente a amostras de soros provenientes de aves naturalmente ou experimentalmente infectadas.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1.- Preparo do Antígeno

Culturas de *Salmonella* Gallinarum cepa 9 resistente ao ácido nalidíxico (AgSG), *Salmonella* Enteritidis sem flagelo (AgSE) resistente à kanamicina, e *Salmonella* Typhimurium sem flagelo (AgTM) foram utilizadas no preparo dos antígenos. Cada antígeno foi preparado separadamente em 10mL de caldo de infusão cérebro e coração (BHI – Difco 0003-17), incubado à temperatura de 37°C por 24 horas sob agitação. Da cultura, retirou-se 5mL que foi inoculado em 500mL de caldo BHI, com incubação similar à anterior. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 1912Xg (centrífuga refrigerada Sorvall Instrument-Dupont) à temperatura de 4°C por 30 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e os sedimentos ressuspensos em 10mL de salina fosfatada tamponada (PBS) pH 7,4 realizando-se um total de quatro lavagens. Posteriormente, as culturas foram sonicadas (Sonicador Branson Sonifer 250 – Avoid direct contact with TIP), sendo submetidas a oito ciclos de \pm 85watts de potência, com intervalo de 30 segundos entre os ciclos. Os materiais sonicados foram centrifugados a 5000Xg (centrífuga refrigerada Spin VI) por 20 minutos numa temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram armazenados à temperatura de -20°C até o momento de uso como antígenos durante o ELISA indireto (Figura 1).

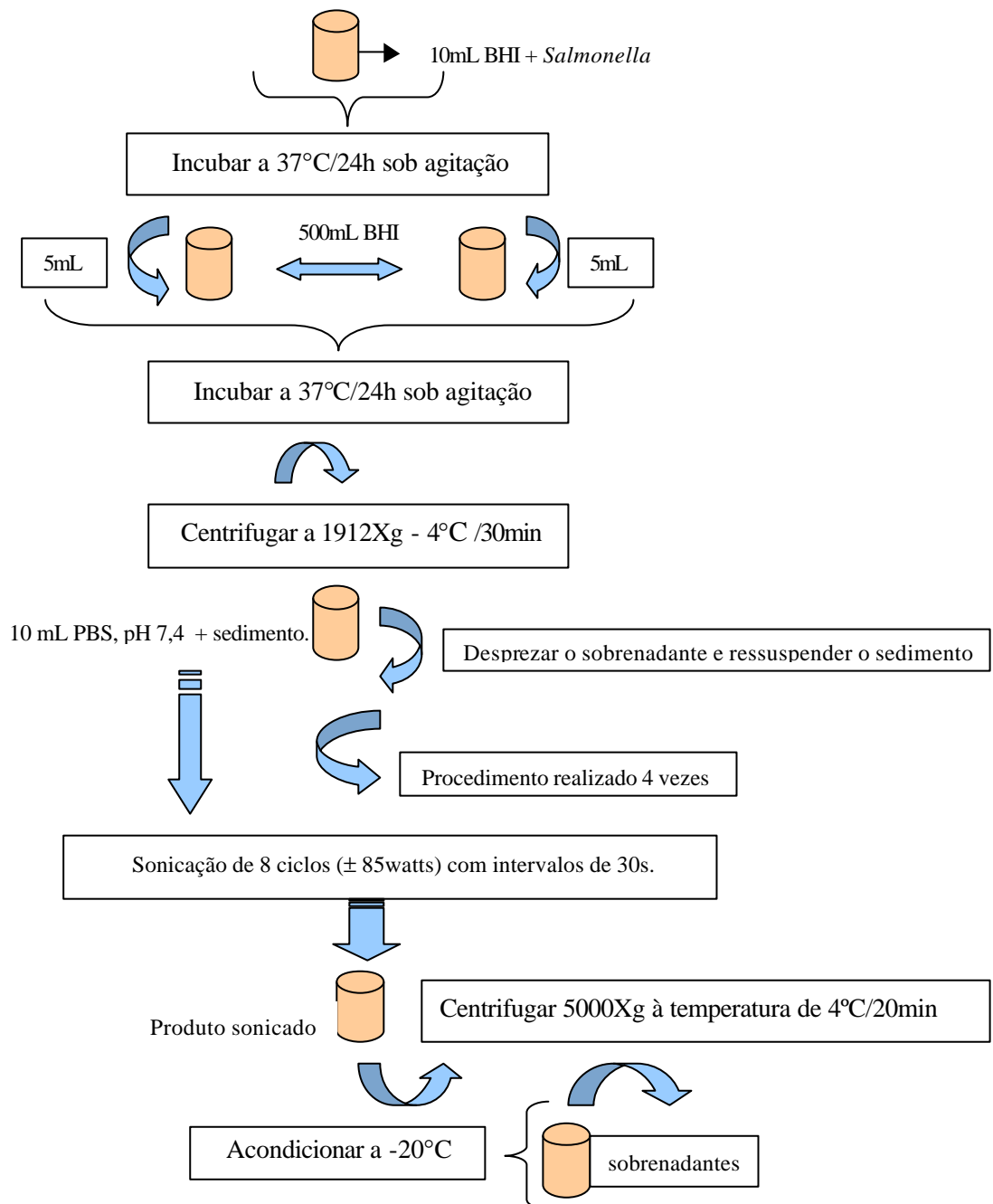


Figura 1- Protocolo de preparação do antígeno

4.2-Obtenção de Soros Hiperimunes

Cento e trinta aves adultas da linhagem Isa Brown, sem sinais clínicos de salmonelose foram utilizadas para obtenção de amostras de soros hiperimunes reagentes a 13 sorotipos de *Salmonella*, sendo dez aves para cada sorotipo. As aves foram colocadas em gaiolas de postura, duas a duas, recebendo ração de acordo com programa da linhagem, sem componentes de origem animal e água à vontade. As aves foram avaliadas antes de iniciar as inoculações com as suspensões bacterianas inativadas, colhendo-se material de cloaca por meio de suabe cloacal, que foi semeado em ágar verde brilhante (Oxoid CM263), incubado à temperatura de 37°C por 24 horas. Os soros das aves foram submetidos a exame sorológico através do teste de aglutinação em lâmina, antes da inoculação. O mesmo teste foi utilizado posteriormente para avaliar os soros hiperimunes antes da utilização no ELISA.

Foram preparadas suspensões bacterianas com os sorotipos Enteritidis, Typhimurium, Gallinarum, Pullorum, Infantis, Montevideo, Binza, Livingstone, Anatum, Stanley, Eimsbuettel, Ealing e Virchow em caldo BHI, com incubação à temperatura de 37°C por 24 horas. As suspensões foram inativadas pela adição de 0,2mL de formalina a 40% em 10mL de cultura. As suspensões permaneceram por aproximadamente 10 horas à temperatura ambiente e mais 18 horas a 4°C. Após esse procedimento, a cultura foi centrifugada a 250Xg (centrifuga refrigerada Spin VI) por 30 minutos à temperatura de 4°C. Os sedimentos foram ressuspensos em PBS pH 7,4 repetindo-se o tratamento com a formalina a 40%. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram semeadas em ágar verde brilhante e em caldo BHI, com incubação à 37°C por 24 horas para confirmação da inativação das culturas. As suspensões bacterianas foram armazenadas a -20°C.

As aves receberam 0,5mL da suspensão bacteriana inativada, pela via intramuscular (músculo peitoral). Foram realizadas cinco inoculações com intervalo de sete dias entre elas. A colheita de sangue (\pm 3mL) foi realizada em intervalos semanais, a partir da terceira aplicação, pelo período de seis semanas, quando então passou a ser

mensal. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000rpm durante 3 minutos (centrifuga clínica Excelsa 2) para obtenção de soro, sendo cada amostra submetida ao teste de aglutinação em lâmina de vidro, utilizando-se os crescimentos bacterianos dos sorotipos correspondentes, preparados em ágar nutriente (Difco 0001-17) incubado a 37°C por 24 horas. As amostras de soros foram armazenadas a -20°C e foram utilizadas no ELISA indireto.

4.3- Padronização da Dose de Reatividade do Antígeno

As diluições dos antígenos foram determinadas por meio de titulação em bloco e consistiram em avaliar a concentração dos antígenos de *S. Gallinarum* (AgSG), *S. Typhimurium* (AgTM) e *S. Enteritidis* (AgSE) a serem empregadas nos testes, frente a diluições de amostras de soros positivo e negativo para cada um dos sorotipos de *Salmonella* (HASSAN et al., 1990).

Para o ELISA/AgSG o antígeno sonificado foi diluído nas proporções de 1:6.250, 1:12.500, 1:25.000 e 1:50.000. Essas diluições foram utilizadas nos ensaios com os conjugados peroxidase e fosfatase alcalina. No ELISA/AgSE o antígeno foi diluído na proporção de 1:2.500; 1:5.000; 1:10.000 e 1:20.000, para ambos os conjugados, e no ELISA/AgTM o antígeno foi diluído na razão 2, sendo de 1:2.500 a 1:20.000 para a peroxidase e de 1:5.000 a 1:40.000 para a fosfatase alcalina. Em todos os testes realizados as amostras de soros positivo e negativo foram diluídas na razão 2 de 1:250 a 1:8.000.

4.4- Ensaios com Soros Hiperimunes

Os ensaios com os soros hiperimunes foram realizados para definir a diluição da amostra do soro a ser analisada pelo ELISA após a padronização do antígeno (item 4.3) e a densidade óptica (DO) que determina a reação positiva. As amostras de soros de

aves imunizadas com *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, e aves imunizadas com sorotipos pertencentes ou não ao mesmo grupo do antígeno utilizado (Ealing, Livingstone, Anatum, Stanley, Infantis, Eimsbuettel, Virchow, Binza e Montevideo) foram diluídas na razão 2 de 1:500 a 1:64.000 para os ensaios com ambos os conjugados.

4.5- Ensaios Complementares para Avaliação do ELISA

Os ensaios complementares foram realizados para a avaliação do ELISA com amostras de soro de aves, naturalmente ou experimentalmente, infectadas por *S. Gallinarum*, experimentalmente infectadas por *S. Pullorum* e experimentalmente infectadas ou vacinadas contra *S. Enteritidis*.

Foram analisadas 162 amostras de soros provenientes de plantéis acometidos pelo tifo aviário e de dois ensaios experimentais. O primeiro ensaio experimental continha 62 aves adultas, variedade vermelha, que foram infectadas por *S. Gallinarum* 9NaI contendo 10^9 UFC/mL. As amostras de soro foram colhidas para exame sorológico aos três dias pós-infecção (pi), e semanalmente até 35 dias pi. No segundo ensaio experimental havia 92 aves de postura, sendo 46 aves de variedade vermelha e 46 aves de variedade branca leve, infectadas com *S. Pullorum*, contendo 10^7 UFC/mL, aos cinco dias de idade. As amostras de soro foram colhidas de quatro a cinco aves, na primeira semana pi, e mensalmente até nove meses de idade.

O ELISA/AgSE foi empregado para analisar 24 amostras de soros provenientes de aves (matriz pesada) com 8, 19 e 42 semanas de idade, submetidas à vacinação contra *S. Enteritidis* às 17 semanas de idade. Foram analisadas sete amostras de soros de aves experimentalmente infectadas com *S. Enteritidis*, apenas com o conjugado fosfatase alcalina, contendo 10^8 UFC/mL, aos 17 dias de idade.

4.6- Ensaio Imunoenzimático – ELISA Indireto

O ELISA indireto incluiu cinco estágios, utilizando-se em quatro deles 50µL do reagente apropriado. Após cada estágio, os reagentes foram removidos e as cavidades lavadas com PBS + 0,1% de Tween-20 (PBST).

Inicialmente, o antígeno foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, 0,3mM NaN₃) pH 9,6 e adicionado às cavidades da microplaca (Cliniplate – Labsystems – Finland ref. 9502227), que foi incubada à temperatura de 4°C por 18 horas. Na etapa seguinte, adicionou-se o tampão carbonato-bicarbonato juntamente com leite em pó desnatado (LPD - Mólico, Nestlé, São Paulo, Brasil) a 10% (100µL), incubando-se a microplaca a 37°C por 45 minutos para o bloqueio de ligações inespecíficas. A seguir, adicionaram-se as amostras de soros (em duplicata) homólogos (item 4.3) e heterólogos (itens 4.3 e 4.4) diluídas em PBST + LPD 10% com incubação a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, foi adicionado o conjugado (soro de coelho anti IgG de galinha associado à peroxidase ou à fosfatase alcalina) diluído em PBST + LPD 10% a 1:2.000 para peroxidase (Sigma A-9046) ou 1:1.000 para fosfatase alcalina (Sigma A-9171), com incubação a 37°C por 60 minutos. Por fim, foi adicionado o substrato ortofenilamina (OPD - Sigma P-8287) diluído em tampão citrato fosfato (0,1M C₆H₈O₇, 0,2M NaHPO) pH 4,9-5,2 (peroxidase) acrescentado de água oxigenada (H₂O₂) ou para nitrofenil fosfato (pNPP - Sigma N-9389) diluído em tampão dietanolamina pH 9,8 (100mM dietanolamina, 500nM MgCl₂) (fosfatase alcalina) com incubação de 15 minutos e 30 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente. A leitura final da reação foi feita em leitor de placa de ELISA (*Microplate Reader* modelo 550 Bio Rad), em comprimento de onda de 490nm (peroxidase) ou 405nm (fosfatase alcalina). As reações foram paralisadas pela adição de ácido clorídrico (HCl) 2N (peroxidase) ou hidróxido de sódio (NaOH) 3M (fosfatase alcalina) (Figura 2).

Em teste adicional com AgSE utilizou-se o ELISA competitivo de fase líquida. Amostras positivas de soro de aves para os sorotipos Gallinarum, Pullorum e Enteritidis foram colocadas em contato, em uma microplaca, com AgSG, AgSE e solução tampão

(PBS pH 7,4). Esta microplaca foi incubada à temperatura de 4°C por 18 horas e a 37°C por mais 2 horas. Prosseguindo, o conteúdo dessa microplaca foi transferido para outra contendo AgSE (1:5.000; conjugado fosfatase alcalina) previamente incubada a 4°C por 18 horas. Nesse ensaio os AgSG, AgSE e a solução tampão foram diluídas na proporção de 1:1.000 a 1:32.000, e os soros 1:500 com concentração final de 1:1.000. Nas etapas seguintes, o procedimento foi o mesmo adotado anteriormente.

ELISA INDIRETO

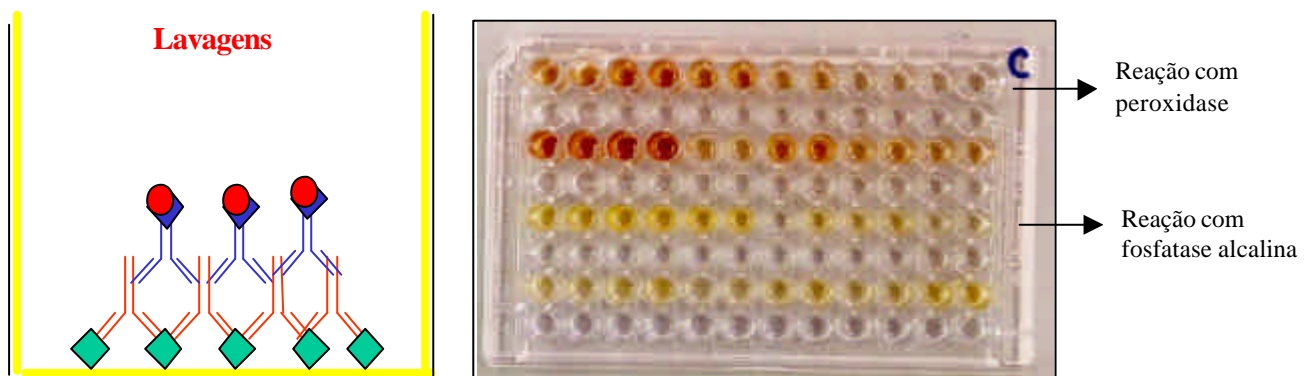
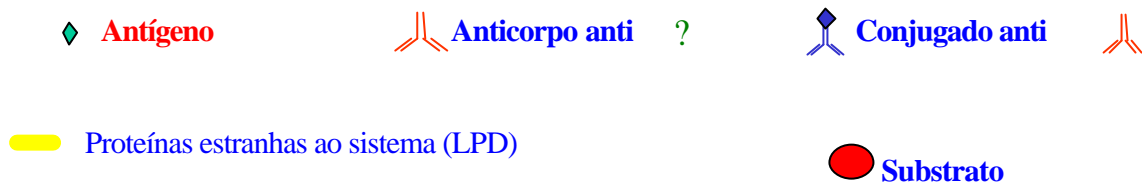


Figura 2- Visualização da reação do ELISA indireto

4.7- Caracterização dos Antígenos

4.7.1- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os antígenos foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) pelo método de LAEMMLI (1970), com algumas modificações. Alíquotas de 12,5µL das amostras dos antígenos foram diluídas inicialmente em 12,5µL de tampão tris pH 6,8, em seguida 25µL dessas amostras foram diluídas em 6,25µL de tampão de amostra de eletroforese (tris HCl 0,025%M, duodecil sulfato de sódio 10% (SDS), glicerol 15% e 2-mercaptoetanol 12,5%), sendo mantidas em fervuras por cinco minutos e resfriadas em temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a eletroforese SDS-PAGE a 12% aplicando 5µL da amostra (AgSE- 7.589,75µg/mL; AgSG- 5.674,75µg/mL e AgTM- 5.489,75µg/mL) nas canaletas do gel. A corrida eletroforética em tampão de corrida (glicina 192mM, tris base 25mM, SDS 0,1%) foi realizada à temperatura ambiente, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos (200V e 35mA), segundo técnica descrita por TACKACS (1979). O padrão de proteínas usado para comparação de pesos moleculares (BenchManktm Protein Ladder-Life Technologies) consistiu de 15 proteínas variando de 10 a 220kDa. Após a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas e colocado em solução fixadora (Metanol 50%, Ácido acético glacial 10%) por cinco minutos, sob agitação constante. O gel, após fixação, foi lavado em uma solução contendo metanol a 5% e ácido acético a 7% com várias trocas de água deionizada. A seguir, o gel foi corado com a solução azul brilhante de Coomassie 0,1% (Coomassie Brilliant Blue R₂₅₀) por 3 horas, sob agitação. Após a coloração o gel foi transferido para um recipiente contendo solução descolorante (Etanol 300mL, Ácido acético glacial 100mL) por 10 minutos e mantido em solução de ácido acético 7% até ser analisado.

4.7.2- Reação de Western Blotting

O *western blotting* foi realizado segundo a técnica padronizada por TOWBIN et al. (1979). As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando-se o padrão de proteínas na comparação de pesos moleculares ("Rainbow", Amersham Life Science RPN 756), o qual consistiu em: miosina (220kDa), fosforilase-b (97,4kDa), soroalbumina bovina (66kDa), ovoalbumina (46kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (21,5kDa) e lisosima (14,3kDa). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45 μ) em tampão tris-glicina pH 8,3 (tris base 25mM, glicina 196mM, metanol 20%), por aproximadamente 18 horas (4°C, 30V). Após o término da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau-S a 0,1% em ácido acético a 10% por cinco minutos e descorada com água deionizada para visualizar a transferência, em seguida a membrana foi cortada em tiras, as quais foram colocadas em tubos de ensaio e bloqueadas com solução TBS-Tween (0,05% de Tween 20, tris HCl 10mM pH8,0, NaCl 150mM) contendo e leite em pó desnatado 5% sob agitação constante, à temperatura ambiente por 3 horas, para o bloqueio de ligações inespecíficas. Posteriormente, as tiras de membrana foram incubadas com os soros positivos anti-SE, anti-SG e anti-TM diluídos a 1:150 em solução TBS-Tween durante 3 horas, sob agitação constante, em temperatura ambiente. Seguiu-se uma lavagem com solução TBS-Tween + LPD por 10 minutos, e duas lavagens com TBS-Tween sem LPD por cinco minutos. Foi adicionado a cada tira IgG de coelho anti-IgG de galinha conjugado à fosfatase alcalina (Sigma A9171) diluído a 1:1.000 em TBS-Tween e incubado por 1 hora e 30 minutos, sob agitação constante, em temperatura ambiente. Posteriormente, as tiras foram lavadas três vezes em TBS-Tween por cinco minutos cada lavagem. A seguir foi utilizado como substrato o 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfatase azul de nitro tetrazolium (BCIP/NBT – Sigma B5655) por um período de dois a cinco

minutos em temperatura ambiente e, para cessar a reação foi realizada a lavagem das tiras em água destilada por 10 minutos.

5-RESULTADOS

5.1 – Obtenção de Soros Hiperimunes

As culturas de suspensões bacterianas, inativadas pela formalina a 40%, utilizadas para obtenção dos soros hiperimunes não apresentaram crescimento em caldo nutriente após incubação a 37°C por 24 horas, sob agitação, e plaqueamento em ágar verde brilhante incubado a 37°C por 24 horas.

As amostras de soros submetidas ao teste de aglutinação em lâmina de vidro, utilizando-se os crescimentos bacterianos dos sorotipos correspondentes, que apresentaram reação de aglutinação foram selecionados para a utilização no ELISA.

5.2- Padronização da Dose de Reatividade do Antígeno

De acordo com os resultados, observou-se que para o ELISA indireto com antígeno de *S. Gallinarum* mais peroxidase, o valor de absorvância das amostras de soros positivos diminuiu, com pequenas variações, à medida que se aumentou a diluição do antígeno e da amostra de soro. As diluições adotadas foram para o antígeno 1:25.000 e para a amostra de soro a ser testada 1:1.000, com as reações positivas apresentando densidade óptica (DO) em torno de 1,000. Quanto ao teste utilizando-se a fosfatase alcalina, as diluições tanto para o antígeno como para a amostra de soro foram às mesmas, com as reações positivas apresentando DO em torno de 0,900 (Tabela 1).

Tabela 1- Padronização da dose de reatividade do antígeno. ELISA/AgSG indireto com amostras de soros positivo e negativo para *S. Gallinarum*.

Conjugado Peroxidase							
Recíproca da diluição do antígeno	Amostra de soro	Recíproca da diluição da amostra de soro					
		250	500	1000	2000	4000	8000
6250	Positiva ¹	1,602*	1,586	1,590	1,583	1,479	1,282
	Negativa ²	0,129	0,108	0,097	0,086	0,075	0,069
12500	Positiva	1,424	1,396	1,407	1,367	1,291	1,086
	Negativa	0,105	0,094	0,088	0,081	0,077	0,069
25000	Positiva	1,140	1,025	1,169	1,069	1,052	0,868
	Negativa	0,126	0,114	0,111	0,101	0,094	0,088
50000	Positiva	1,031	0,986	0,914	0,923	0,798	0,623
	Negativa	0,060	0,079	0,079	0,079	0,072	0,065
Conjugado Fosfatase alcalina							
6250	Positiva	2,679	2,598	2,573	2,632	2,297	1,882
	Negativa	0,091	0,092	0,089	0,090	0,081	0,077
12500	Positiva	2,056	1,856	1,395	1,582	1,107	1,078
	Negativa	0,083	0,083	0,085	0,080	0,074	0,085
25000	Positiva	1,165	1,167	0,948	1,034	0,626	0,546
	Negativa	0,089	0,103	0,101	0,094	0,087	0,083
50000	Positiva	0,548	0,624	0,622	0,621	0,491	0,343
	Negativa	0,061	0,061	0,066	0,077	0,081	0,078

¹ Soro proveniente de ave adulta inoculada com suspensão inativada de *S. Gallinarum*, ² Soro proveniente de ave adulta livre de *Salmonella*, * Valores de absorvância: Leitura em comprimento de onda de 490nm (peroxidase) e 405nm (fosfatase alcalina).

Para o teste com *S. Enteritidis* os resultados demonstraram que no ELISA Indireto utilizando a peroxidase, como no teste anterior, o valor de absorvância dos soros positivos diminuiu à medida que se aumentou a diluição do antígeno e do soro, concluindo-se que o antígeno deveria ser diluído a 1:10.000 e 1:5.000 para peroxidase e fosfatase alcalina respectivamente, e a amostra de soro a ser testada a 1:1.000 com as reações positivas apresentando DO em torno de 1,000 para ambos conjugado (Tabela 2).

Tabela 2- Padronização da dose de reatividade do antígeno. ELISA/AgSE indireto com amostras de soros positivo e negativo para S. Enteritidis.

Conjugado Peroxidase							
Recíproca da diluição do antígeno	Amostra de soro	Recíproca da diluição da amostra de soro					
		250	500	1000	2000	4000	8000
2500	Positiva ¹	2,724*	2,377	1,972	1,478	0,902	0,412
	Negativa ²	0,124	0,094	0,075	0,074	0,070	0,091
5000	Positiva	2,366	1,887	1,320	1,178	0,655	0,374
	Negativa	0,086	0,081	0,062	0,070	0,054	0,070
10000	Positiva	1,781	1,411	1,299	1,082	0,532	0,375
	Negativa	0,075	0,063	0,073	0,057	0,050	0,179
20000	Positiva	1,414	1,184	1,019	0,866	0,478	0,254
	Negativa	0,061	0,058	0,056	0,059	0,075	0,051
Conjugado Fosfatase alcalina							
2500	Positiva	2,072	1,900	1,802	1,408	0,856	0,528
	Negativa	0,104	0,100	0,095	0,086	0,081	0,075
5000	Positiva	1,681	1,481	1,155	1,089	0,598	0,345
	Negativa	0,088	0,086	0,081	0,080	0,074	0,075
10000	Positiva	1,143	0,997	0,821	0,726	0,437	0,277
	Negativa	0,085	0,087	0,089	0,096	0,084	0,079
20000	Positiva	0,494	0,523	0,423	0,369	0,298	0,243
	Negativa	0,077	0,081	0,080	0,082	0,078	0,079

¹ Soro proveniente de ave adulta inoculada por suspensão inativada de S. Enteritidis, ² Soro proveniente de ave adulta livre de *Salmonella*, *Valores de absorvância: Leitura em comprimento de onda de 490nm (peroxidase) e 405nm (fosfatase alcalina).

No teste para S. Typhimurium a utilização do antígeno diluído inicialmente a 1:5.000 para a fosfatase alcalina foi baseado em testes com diluição inicial de 1:2.500, onde se visualizou a possibilidade de se obter uma maior diluição para o antígeno com a fosfatase alcalina. Os resultados foram, para ambos os conjugados, similares aos observados nos testes com os sorotipos Gallinarum e Enteritidis, onde os valores da absorvância dos soros positivos diminuam à medida que o antígeno e o soro

encontravam-se mais diluídos. Assim, as diluições adotadas como ótimas para os testes com peroxidase ou fosfatase alcalina foram para o antígeno 1:20.000 e 1:1.000 para a amostra de soro a ser testada, com as reações positivas apresentando DO em torno de 1,000 (Tabela 3). Em todos os ensaios realizados, resultados adequados para reatividade também foram observados para amostras de soros diluídas na proporção de 1:2.000 (tabelas 1,2 e 3).

Tabela 3- Padronização da dose de reatividade do antígeno **ELISA/AgTM** indireto com amostras de soros de aves positivo e negativo para *S. Typhimurium*.

Conjugado Peroxidase							
Recíproca da diluição do antígeno	Amostra de soro	Recíproca da diluição da amostra de soro					
		250	500	1000	2000	4000	8000
2500	Positiva ¹	1,808*	1,776	1,750	1,592	1,160	0,716
	Negativa ²	0,049	0,041	0,041	0,038	0,034	0,033
5000	Positiva	1,850	1,780	1,747	1,512	1,177	0,810
	Negativa	0,055	0,063	0,036	0,038	0,034	0,033
10000	Positiva	1,525	1,462	1,406	1,333	0,911	0,655
	Negativa	0,044	0,042	0,039	0,041	0,036	0,042
20000	Positiva	1,093	1,336	1,265	1,183	0,708	0,554
	Negativa	0,047	0,039	0,043	0,044	0,041	0,040
Conjugado Fosfatase alcalina							
5000	Positiva	2,693	2,277	1,990	1,665	1,013	0,599
	Negativa	0,072	0,073	0,079	0,073	0,066	0,063
10000	Positiva	2,007	1,413	1,162	1,181	0,616	0,487
	Negativa	0,069	0,071	0,071	0,073	0,068	0,066
20000	Positiva	1,733	1,199	1,068	0,867	0,525	0,329
	Negativa	0,078	0,081	0,082	0,080	0,077	0,074
40000	Positiva	1,094	0,831	0,735	0,620	0,416	0,242
	Negativa	0,071	0,077	0,077	0,075	0,069	0,069

¹ Soro proveniente de ave adulta inocularada com suspensão inativada *S. Typhimurium*, ² Soro proveniente de ave adulta livre de *Salmonella*, * Valores de absorvância: Leitura em comprimento de onda de 490nm (peroxidase) e 405nm (fosfatase alcalina).

5.3- Ensaio com Soros Hiperimunes

Nos testes com soros hiperimunes utilizando-se o AgSG, para ambos os conjugados, as amostras de soros provenientes de aves imunizadas contra *Salmonella* sorotipos Gallinarum e Pullorum apresentaram reação com $DO \geq 0,800$, enquanto que as amostras de soro provenientes de aves imunizadas contra as salmonelas pertencentes ou não ao mesmo grupo do antígeno utilizado apresentaram $DO \leq 0,400$. O soro positivo para *S. Enteritidis* apresentou uma $DO = 0,496$ no ensaio com o conjugado peroxidase (Tabela 4).

Quanto aos ensaios com AgSE, as amostras de soros provenientes de aves imunizadas contra *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* apresentaram reações com $DO \geq 1,000$ para ambos os conjugados. Além disso, pode-se observar que as amostras de soros positivos para os sorotipos Anatum, Infantis, Stanley e Typhimurium apresentaram uma $0,400 \leq DO \leq 1,000$ determinando uma faixa de soros suspeitos no ensaio com o conjugado peroxidase. Analisando-se esses mesmos soros no teste com a fosfatase alcalina, os soros positivos para os sorotipos Anatum e Stanley produziram reações com $DO \leq 0,400$, e os soros positivos para os sorotipos Typhimurium e Infantis uma $DO = 0,401$ e $0,840$, respectivamente (Tabela 5). Notou-se também que as amostras positivas para os sorotipos Gallinarum e Pullorum apresentaram valores de absorvância maiores que o valor apresentado para o sorotipo Enteritidis. O AgSE quando diluído em concentrações semelhantes a do AgSG apresentou valor de absorvância similar (Tabela 7).

O ensaio utilizando AgTM e amostra de soro positivo proveniente de ave imunizada por *S. Typhimurium* apresentou reação com $DO \geq 1,000$ tanto para o teste com o conjugado peroxidase como fosfatase alcalina. Para os soros procedentes de aves imunizadas com os sorotipos Gallinarum e Pullorum os valores das DO(s) foram positivos, em ambos os conjugados. O soro proveniente de aves imunizadas com *S. Enteritidis*, no ensaio com a peroxidase, o valor de absorvância foi igual a $0,422$, dentro da faixa de valores considerados suspeitos (Tabela 6).

No ELISA/AgSE algumas amostras de soros positivos não puderam ser diferenciadas (Gallinarum, Pullorum) ou encontraram-se dentro de uma faixa de valor de absorvância considerado suspeito (Typhimurium, Infantis, Stanley e Anatum). O mesmo aconteceu no ELISA/AgTM para as amostras de soros positivos para Gallinarum, Pullorum e Enteritidis. Alguns ensaios complementares foram realizados para verificar interferência na reação antígeno e anticorpo.

O primeiro ensaio teve como objetivo verificar se as amostras de soros estariam aderindo a microplaca de ELISA, ao invés de estarem reagindo com o antígeno da microplaca. Esses soros apresentaram reações com $DO(s) \geq 0,400$ na presença do antígeno e $DO(s) \leq 0,200$ na ausência do antígeno demonstrando não ocorrer aderência dos mesmos na microplaca (Tabela 8). O segundo ensaio foi realizado para averiguar se as $DO(s) \geq 1,000$ e $DO(s)$ intermediárias estariam ocorrendo por uma ligação do antígeno com o conjugado. Os resultados apresentados na Tabela 9 demonstraram que não ocorreu ligação entre o antígeno e o conjugado.

Foi desenvolvido um ELISA competitivo de fase líquida, com a finalidade de tentar neutralizar a presença de reatividade entre sorotipos pertencentes a diferentes sorogrupos nos ensaios com AgSE e AgTM. A diminuição da DO devido à competição não foi suficiente para inibir a reatividade observada (Tabela 10).

Tabela 4- ELISA/AgSG com amostras de soro hiperimune reagentes para diversas salmonelas para determinação da diluição da amostra de soro e da densidade óptica.

Amostras de soros de aves reagentes aos sorotipos de <i>Salmonella</i>	Recíproca da diluição da amostra de soro nos testes com o conjugado															
	Peroxidase								Fosfatase alcalina							
	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000
Gallinarum (D ₁)**	0,273	0,855	0,742	0,738	0,607	0,455	0,338	0,205	1,440	1,285	1,237	0,871	0,732	0,496	0,329	0,254
Ealing (O)	0,066	0,077	0,069	0,062	0,071	0,069	0,076	0,080	0,126	0,093	0,083	0,079	0,082	0,086	0,084	0,075
Livingstone (C ₁)	0,064	0,082	0,069	0,061	0,067	0,067	0,069	0,082	0,184	0,114	0,092	0,083	0,087	0,085	0,091	0,082
Anatum (E ₁)	0,140	0,230	0,138	0,107	0,094	0,207	0,077	0,091	0,272	0,148	0,128	0,099	0,098	0,091	0,086	0,081
Stanley (B)	0,059	0,122	0,084	0,070	0,070	0,053	0,064	0,076	0,206	0,132	0,095	0,091	0,086	0,086	0,082	0,079
Infantis (C ₁)	0,259	0,182	0,117	0,080	0,074	0,067	0,066	0,071	0,448	0,286	0,201	0,131	0,110	0,099	0,086	0,076
Eimbuettel (C ₄)	0,172	0,091	0,069	0,059	0,056	0,061	0,067	0,071	0,263	0,166	0,112	0,097	0,095	0,147	0,084	0,081
Virchow (C ₁)	0,147	0,093	0,063	0,054	0,067	0,063	0,065	0,075	0,214	0,137	0,102	0,091	0,090	0,086	0,093	0,082
Binza (E ₂)	0,173	0,084	0,059	0,053	0,055	0,059	0,067	0,074	0,204	0,123	0,103	0,086	0,092	0,090	0,082	0,079
Typhimurium (B)	0,304	0,114	0,084	0,073	0,073	0,081	0,067	0,080	0,462	0,259	0,160	0,127	0,101	0,092	0,089	0,085
Enteritidis (D ₁)	0,809	0,496	0,514	0,317	0,209	0,141	0,106	0,093	0,292	0,238	0,196	0,158	0,120	0,112	0,090	0,089
Pullorum (D ₁)	1,077	1,152	1,055	1,222	1,113	1,127	0,969	0,784	1,524	1,552	1,425	1,362	1,431	1,228	1,078	0,844
Montevideo (C ₁)	0,105	0,073	0,067	0,055	0,064	0,065	0,068	0,073	0,177	0,114	0,097	0,083	0,083	0,084	0,083	0,078
Soro negativo	0,043	0,045	0,043	0,045	0,051	0,051	0,058	0,054	0,067	0,069	0,070	0,073	0,076	0,076	0,071	0,073

AgSG diluído a 1:25.000; ** = sorogrupos

Tabela 5 – ELISA/AgSE com amostras de soro hiperimmune reagentes para diversas salmonelas para determinação da diluição da amostra de soro e da densidade óptica.

Amostras de soros de aves reagentes aos sorotipos de <i>Salmonella</i>	Recíproca da diluição da amostra de soro nos testes com o conjugado															
	Peroxidase								Fosfatase alcalina							
	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000
Gallinarum (D ₁)**	1,605	1,629	1,488	1,509	1,258	0,975	0,504	0,411	2,699	2,534	2,503	2,077	1,765	1,327	0,932	0,628
Ealing (O)	0,212	0,153	0,083	0,070	0,064	0,057	0,037	0,037	0,233	0,133	0,099	0,080	0,076	0,084	0,083	0,083
Livingstone (C ₁)	0,292	0,145	0,117	0,087	0,068	0,068	0,043	0,041	0,309	0,171	0,118	0,091	0,084	0,084	0,095	0,081
Anatum (E ₁)	0,978	0,627	0,340	0,223	0,147	0,116	0,069	0,053	0,682	0,349	0,248	0,135	0,114	0,108	0,101	0,094
Stanley (B)	0,719	0,413	0,237	0,161	0,115	0,087	0,061	0,042	0,653	0,397	0,235	0,163	0,126	0,110	0,094	0,090
Infantis (C ₁)	1,057	0,653	0,429	0,245	0,144	0,105	0,067	0,035	1,348	0,840	0,559	0,365	0,229	0,163	0,119	0,100
Eimsbuettel (C ₄)	0,558	0,276	0,181	0,131	0,092	0,079	0,064	0,041	0,597	0,353	0,204	0,140	0,117	0,102	0,088	0,086
Virchow (C ₁)	0,513	0,261	0,178	0,114	0,089	0,076	0,066	0,046	0,623	0,279	0,185	0,129	0,113	0,103	0,091	0,086
Binza (E ₂)	0,445	0,239	0,138	0,098	0,081	0,073	0,064	0,045	0,400	0,196	0,136	0,099	0,091	0,087	0,075	0,078
Typhimurium (B)	0,884	0,559	0,363	0,238	0,145	0,113	0,078	0,047	0,935	0,401	0,214	0,153	0,122	0,106	0,085	0,085
Enteritidis (D ₁)	1,289	1,113	0,699	0,503	0,298	0,187	0,112	0,056	1,598	1,250	0,784	0,550	0,338	0,234	0,154	0,124
Pullorum (D ₁)	1,815	1,865	1,774	1,770	1,774	1,612	1,443	1,141	2,890	2,815	2,843	2,624	2,312	2,004	1,602	1,175
Montevideo (C ₁)	0,317	0,170	0,122	0,089	0,077	0,067	0,059	0,042	0,486	0,257	0,169	0,129	0,104	0,098	0,088	0,086
Soro negativo	0,046	0,045	0,046	0,050	0,049	0,047	0,039	0,025	0,077	0,069	0,068	0,065	0,069	0,071	0,067	0,040

AgSE diluído a 1:10.000 (peroxidase) e 1:5.000 (fosfatase alcalina); ** = sorogrupos

Tabela 6 – ELISA/AgTM com amostras de soro hiperimune reagentes para diversas salmonelas para determinação da diluição da amostra de soro e da densidade óptica.

Amostras de soros de aves reagentes aos sorotipos de <i>Salmonella</i>	Recíproca da diluição da amostra de soro nos testes com o conjugado															
	Peroxidase								Fosfatase alcalina							
	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000
Gallinarum (D₁)**	1,136	1,035	0,527	0,428	0,284	0,236	0,156	0,099	1,148	1,124	0,782	0,529	0,432	0,319	0,186	0,136
Ealing (O)	0,092	0,068	0,056	0,051	0,054	0,058	0,067	0,065	0,119	0,084	0,070	0,063	0,070	0,078	0,068	0,061
Livingstone (C ₁)	0,141	0,085	0,065	0,054	0,055	0,056	0,062	0,063	0,144	0,088	0,074	0,057	0,086	0,074	0,074	0,059
Anatum (E ₁)	0,354	0,199	0,112	0,077	0,065	0,058	0,060	0,062	0,229	0,132	0,098	0,065	0,071	0,068	0,060	0,062
Stanley (B)	0,350	0,195	0,119	0,086	0,069	0,059	0,057	0,061	0,328	0,213	0,142	0,112	0,088	0,076	0,068	0,052
Infantis (C ₁)	0,263	0,138	0,086	0,076	0,056	0,053	0,065	0,062	0,246	0,173	0,135	0,100	0,083	0,077	0,063	0,061
Eimsbuettel (C ₄)	0,165	0,080	0,061	0,051	0,050	0,048	0,057	0,064	0,191	0,124	0,104	0,083	0,074	0,075	0,061	0,059
Virchow (C ₁)	0,189	0,102	0,066	0,054	0,051	0,048	0,056	0,065	0,129	0,095	0,090	0,076	0,076	0,073	0,059	0,057
Binza (E ₂)	0,401	0,194	0,112	0,081	0,060	0,052	0,052	0,056	0,257	0,173	0,128	0,099	0,086	0,073	0,061	0,059
Typhimurium (B)	1,231	1,183	0,575	0,356	0,284	0,205	0,130	0,092	1,298	1,018	0,630	0,424	0,268	0,172	0,116	0,085
Enteritidis (D₁)	0,627	0,422	0,290	0,234	0,195	0,080	0,064	0,061	0,285	0,231	0,231	0,167	0,114	0,096	0,085	0,061
Pullorum (D₁)	1,197	1,155	0,490	0,371	0,332	0,218	0,198	0,132	1,927	1,184	0,725	0,498	0,481	0,338	0,234	0,146
Montevideo (C ₁)	0,110	0,078	0,055	0,049	0,047	0,052	0,069	0,060	0,154	0,123	0,098	0,083	0,090	0,075	0,062	0,059
Soro negativo	0,038	0,035	0,035	0,035	0,038	0,037	0,040	0,041	0,056	0,054	0,059	0,054	0,062	0,060	0,055	0,055

AgTM diluído a 1:20.000; **= sorogrupos

Tabela 7- **ELISA/AgSG** e **ELISA/AgSE** com amostra de soro hiperimune proveniente de ave imunizada com *S. Gallinarum*.

Conjugados	Antígenos		
	SG	SE	
Peroxidase	1,169 ^a	1,176 ^a	1,629 ^b
Fosfatase alcalina	0,948 ^a	1,360 ^a	2,534 ^c

a= DO do soro hiperimune com antígeno diluído 1:25.000; b= DO do soro hiperimune com antígeno diluído 1:10.000; c= DO do soro hiperimune com antígeno diluído 1:5.000; Soro diluído 1:1.000.

Tabela 8- **ELISA indireto** com amostras de soros hiperimunes para verificar interferência na reação antígeno e anticorpo.

Antígenos	Conjugados	Amostras de soros diluídas a 1:1000							Neg
		SG ¹	SP ²	TM ³	SE ⁴	INF ⁵	ANA ⁶	STA ⁷	
TM (1:20000)	PE ⁸	1,282	2,038	1,354	0,400	-	-	-	0,036
	PE ⁹	0,044	0,039	0,038	0,035	-	-	-	0,036
TM (1:20000)	FA ¹⁰	1,567	2,092	1,559	0,320	-	-	-	0,036
	FA ¹¹	0,104	0,106	0,116	0,057	-	-	-	0,036
SE (1:10000)	PE ⁸	2,619	2,765	0,572	1,748	0,671	0,630	0,425	0,036
	PE ⁹	0,057	0,057	0,043	0,054	0,041	0,038	0,040	0,036
SE (1:5000)	FA ¹⁰	2,971	3,062	0,429	1,824	0,857	-	-	0,036
	FA ¹¹	0,101	0,105	0,042	0,069	0,066	-	-	0,036

1= *Salmonella* Gallinarum; 2= *Salmonella* Pullorum; 3= *Salmonella* Typhimurium; 4= *Salmonella* Enteritidis; 5= *Salmonella* Infantis; 6= *Salmonella* Anatum; 7= *Salmonella* Stanley; 8=peroxidase + Ag; 9= Peroxidase + tampão; 10= fosfatase alcalina + Ag; 11= fosfatase alcalina + tampão.

Tabela 9- **ELISA indireto** com os conjugados peroxidase e fosfatase alcalina para verificar interferência na reação antígeno e anticorpo.

Conjugados	Antígenos			
	SG (1:25000)	TM (1:20000)	SE (1:10000)	SE (1:5000)
Peroxidase ^a	0,041	0,036	0,034	-
Fosfatase alcalina ^b	0,059	0,056	-	0,055

Leitura da DO em: a= 490nm; b= 405nm.

Tabela 10- **ELISA competitivo** usando o AgSE diluído a 1:5.000 (fosfatase alcalina) com amostras de soros de aves imunizadas com *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*.

Soros 1:500	Antígenos	Recíproca da diluição dos antígenos					
		1000	2000	4000	8000	16000	32000
SG ¹	SE	1,960	2,773	2,920	3,100	3,104	2,981
SP ²	SE	2,962	3,121	3,114	3,139	3,119	3,124
SG	SG	2,084	2,429	2,549	2,825	2,949	2,853
SP	SG	2,894	3,102	3,097	3,181	3,198	3,144
SG	Tampão ⁴	2,836	2,908	2,963	3,016	2,889	2,903
SP	Tampão	3,040	3,106	3,064	3,082	3,083	2,990
SE ³	SE	0,141	0,185	0,267	0,341	0,350	-
SE	Tampão	1,113	0,699	0,503	0,531	0,477	-

1- soro positivo de *Salmonella* Gallinarum; 2- soro positivo de *Salmonella* Pullorum; 3 soro positivo de *Salmonella* Enteritidis; 4- PBS Tween20 + 10% leite em pó desnatado.

5.4- Ensaios Complementares para Avaliação do ELISA

Os resultados apresentados nas tabelas 11 a 15 são referentes ao estudo de amostras de soros provenientes de aves de granjas comerciais com suspeitas de tifo

aviário, de aves vacinadas contra *S. Enteritidis* e aves infectadas experimentalmente com *Salmonella* sorotipos Gallinarum e Pullorum e, *S. Enteritidis*.

A Tabela 11 apresenta os resultados referentes às amostras de soros de aves comerciais com suspeita de tifo aviário. Em 162 amostras examinadas pelo ELISA/AgSG indireto, 34 (20,99%) foram positivas no ensaio com peroxidase e 37 (22,83%) foram positivas com o conjugado fosfatase alcalina.

Tabela 11- ELISA/AgSG com amostras de soros provenientes de aves com suspeita de tifo aviário.

Conjugados	Amostras de soros*		
	P	S	N
Peroxidase	34/162	10/162	118/162
Fosfatase Alcalina	37/162	06/162	119/162

*= diluição 1:1.000; P= soros positivos ($DO \geq 0,800$); S= soros suspeitos ($0,400 \leq DO \leq 0,800$); N= soros negativos ($DO \leq 0,400$).

A Tabela 12 apresenta os resultados do ELISA/AgSG indireto com soros de aves experimentalmente infectadas com *S. Gallinarum*. Os resultados apresentaram-se positivos a partir de sete dias pós-infecção com maior número de amostras positivas aos 21 dias pós-infecção no ensaio com o conjugado peroxidase, e aos 14 e 21 dias pós-infecção no ensaio com o conjugado fosfatase alcalina.

Tabela 12- ELISA/AgSG com amostras de soros (diluído 1:1.000) provenientes de aves, variedade vermelha, experimentalmente infectadas com *Salmonella Gallinarum*.

Ppi ¹ (dias)	Conjugados					
	Peroxidase			Fosfatase Alcalina		
	P	S	N	P	S-	N
3	0/8	0/8	8/8	0/8	2/8	6/8
7	1/8	2/8	5/8	3/8	2/8	3/8
14	1/8	0/8	7/8	5/8	0/8	3/8
21	4/6	0/6	2/6	4/6	0/6	2/6
28	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	3/3
35	1/3	0/3	2/3	1/3	0/3	2/3

1= período pós-infecção; P= soros positivos ($DO \geq 0,800$); S= soros suspeitos ($0,400 \leq DO \leq 0,800$); N= soros negativos ($DO \leq 0,400$).

A Tabela 13 apresenta os resultados do ELISA/AgSG indireto examinando soros de aves experimentalmente infectadas com *S. Pullorum*. As aves de variedade vermelha apresentaram as primeiras amostras positivas a partir do 1º mês (30 dias pi) para o ensaio com o conjugado fosfatase alcalina e 2º mês (60 dias pi) para o ensaio com o conjugado peroxidase. As aves de variedade branca apresentaram amostras positivas somente no 4º e 5º mês no ensaio com peroxidase, e do início ao fim do experimento no ensaio com o conjugado fosfatase alcalina.

Tabela 13- ELISA/AgSG com amostras de soros (diluído 1:1.000) provenientes de aves experimentalmente infectadas com *Salmonella Pullorum*.

Ppi ¹	Conjugados											
	Peroxidase						Fosfatase Alcalina					
	V ²			B ³			V			B		
	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N
1 ^o semana	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	4/4
1 ^o mês	0/4	3/4	1/4	0/4	1/4	3/4	3/4	1/4	0/4	1/4	0/4	3/4
2 ^o mês	2/4	1/4	1/4	0/4	2/4	2/4	4/4	0/4	0/4	3/4	1/4	0/4
3 ^o mês	3/4	0/4	1/4	0/4	1/4	3/4	3/4	0/4	1/4	1/4	3/4	0/4
4 ^o mês	4/5	0/5	1/5	1/5	0/5	4/5	3/5	2/5	0/5	1/5	3/5	1/5
5 ^o mês	4/5	0/5	1/5	1/5	0/5	4/5	4/5	0/5	1/5	0/5	1/5	4/5
6 ^o mês	3/5	1/5	1/5	0/5	0/5	5/5	4/5	0/5	1/5	1/5	3/5	1/5
7 ^o mês	4/5	0/5	1/5	0/5	1/5	4/5	3/5	0/5	2/5	1/5	1/5	3/5
8 ^o mês	3/5	0/5	2/5	0/5	0/5	5/5	3/5	0/5	2/5	0/5	4/5	1/5
9 ^o mês	3/5	1/5	1/5	0/5	0/5	5/5	4/5	0/5	1/5	2/5	1/5	2/5

1= período pós-infecção; 2= ave adulta variedade vermelha; 3= ave adulta variedade branca; P= soros positivos ($DO \geq 0,800$); S= soros suspeitos ($0,400 \leq DO \leq 0,800$); N= soros negativos ($DO \leq 0,400$).

Os resultados do ELISA/AgSE indireto com amostras provenientes de aves vacinadas contra *S. Enteritidis* estão na Tabela 14. Com as amostras de soros procedentes do grupo controle (oito semanas de idade) não houve resposta sorológica nos ensaios com os dois conjugados. No lote com 19 semanas de idade para o ensaio com o conjugado peroxidase 58,33% das amostras apresentaram $0,400 \leq DO \leq 1,000$, enquanto que no ensaio com a fosfatase alcalina 75% das amostras foram positivas. No lote de 42 semanas de idade observou-se que 58,33% das amostras foram negativas no ensaio com o conjugado peroxidase, o mesmo não pode ser observado no ensaio com o conjugado fosfatase alcalina, onde o número de amostras negativas foi menor (25%). Quanto às aves experimentalmente infectadas, todos os sete soros analisados

apresentaram uma $DO=1,000$. É relevante citar que esses mesmos soros quando analisados no ELISA/AgSG apresentaram reatividade com $DO=0,400$.

Tabela 14- ELISA/AgSE com amostras de soros (diluído 1:1.000) provenientes de aves vacinadas contra *Salmonella* Enteritidis.

Idade da ave	Conjugados					
	Peroxidase			Fosfatase Alcalina		
	P	S	N	P	S	N
8 semanas	0/24	0/24	24/24	0/24	0/24	24/24
19 semanas	6/24	14/24	4/24	18/24	6/24	0/24
42 semanas	8/24	2/24	14/24	9/24	9/24	6/24

P= soros positivos ($DO \geq 1,000$); S= soros suspeitos ($0,400 \leq DO \leq 1,000$); N= soros negativos ($DO \leq 0,400$).

A Tabela 15 contém resultados referentes às amostras de soros analisadas com AgSG, AgSE e AgTM e ambos os conjugados. As amostras de soros provenientes de aves vacinadas contra *S. Enteritidis* não apresentaram reatividade aos AgSG e AgTM, enquanto que as amostras de soros oriundas de aves naturalmente ou experimentalmente infectadas por *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* apresentaram reatividade frente aos três antígenos. As amostras de soros provenientes de aves experimentalmente infectadas com *S. Enteritidis* não apresentaram reatividade no ELISA/AgSG com o conjugado fosfatase alcalina, os soros não foram testados frente ao AgTM.

Tabela 15- **ELISA indireto** para análise de reatividade entre o grupo B e D com amostras de soros positivos para AgSG, AgSE e AgTM.

Soros (conjugado Peroxidase)							
	SG ¹	SP		SE ²			SE ³
		V ⁴	B ⁵	8	19	42	
AgSG	7/7	26/26	2/2	C ⁶	N ⁷	N	-
AgSE	14/14	34/34	18/18	C	6/6	8/8	-
AgTM	10/10	21/21	2/2	C	N	N	-

Soros (conjugado Fosfatase alcalina)							
	SG	SP		SE			SE
		V	B	8	19	42	
AgSG	13/13	31/31	10/10	C	N	N	N
AgSE	14/14	38/38	25/25	C	18/18	9/9	7/7
AgTM	11/11	28/28	4/4	C	N	N	-

1= Soros positivos de aves experimentalmente infectadas com *S. Gallinarum* NaI9; 2= soros positivos de aves vacinadas contra *S. Enteritidis*; 3= soros positivos de aves experimentalmente infectadas com *S. Enteritidis* 4= soros positivos de aves, variedade vermelha, experimentalmente infectada com *S. Pullorum*; 5= soros positivos de aves, variedade branca, experimentalmente infectada com *S. Pullorum*; 6= soros controle; 7=ausência de soros positivos.

5.5-*Caracterização dos Antígenos*

5.5.1- SDS PAGE

As frações dos antígenos submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida mostraram que os três antígenos possuem várias bandas comigrantes com pesos moleculares semelhantes. Observa-se a presença de algumas bandas que não foram comuns aos três antígenos e bandas similares entre dois antígenos como uma banda de 56kDa para os AgSE e AgSG, uma banda de 25kDa para os AgSE e AgTM, uma banda de 47kDa e 50kDa para os AgSG e AgTM (Figura 3).

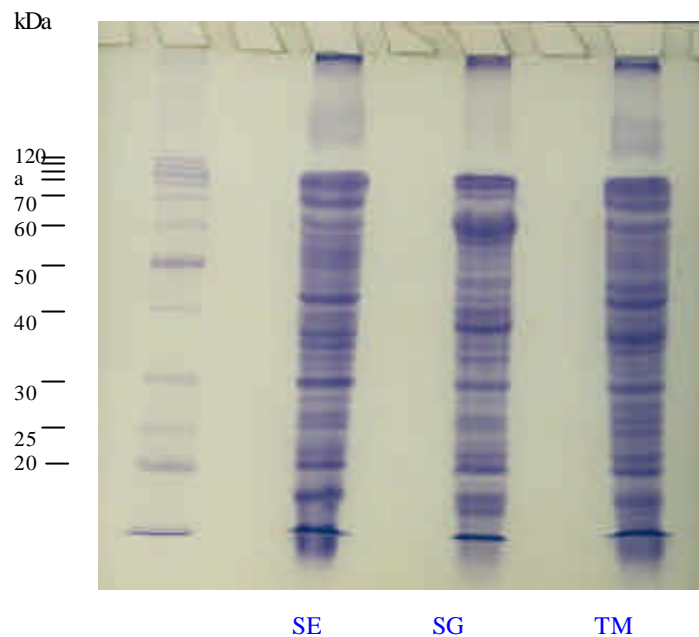


Figura 3- Composição dos polipeptídeos dos antígenos de *S. Enteritidis* (AgSE), *S. Gallinarum* (AgSG) e *S. Typhimurium* (AgTM). As frações foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% contendo SDS, e as bandas de proteínas foram visualizadas pela coloração com *Coomassie brilliant blue*, utilizando amostras de 5 μ L. Padrão molecular em kilodaltons (kDa) indicado a esquerda.

6.5.2- Western Blotting

A Figura 4 apresenta os resultados da reação de *Western Blotting* para os AgSE, AgSG e AgTM com soros de *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Typhimurium*. Observa-se na corrida com o AgSE que cinco bandas variando de 22kDa a 76kDa foram comuns entre os três soros testados. Para o AgTM seis bandas (41kDa a 125kDa) foram encontradas sendo compartilhadas pelos três soros utilizados. O maior número de bandas comuns foi observada na corrida com o AgSG, onde sete bandas variaram entre 23kDa e 78kDa.

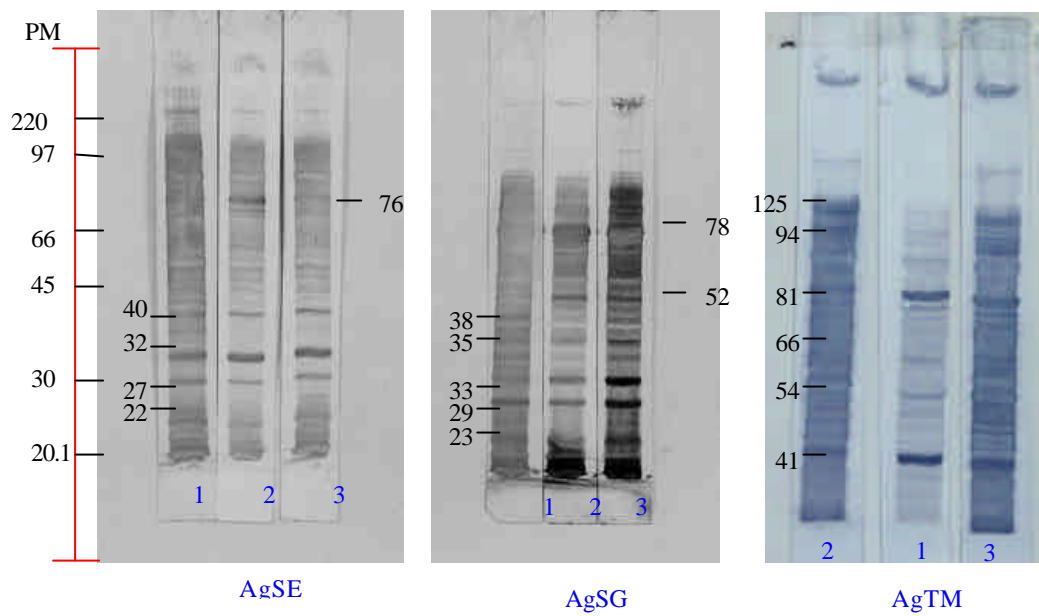


Figura 4- Reconhecimento de polipeptídeos do antígeno de proteína solúvel de *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Typhimurium* por anticorpos presentes no soro de aves imunizadas com *S. Enteritidis* (1), *S. Typhimurium* (2) e *S. Gallinarum* (3).

6- DISCUSSÃO

As salmoneloses são importantes para a avicultura em função das enfermidades causadas e da implicação da presença desses microrganismos em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano. Para o sucesso da avicultura industrial, é preciso controlar agentes infecciosos que possam causar enfermidades em aves ou que sejam transmitidos pelas aves aos seres humanos. Desde o início da avicultura industrial foi preciso desenvolver métodos de controle das salmoneloses para viabilizar a incubação artificial. O teste de eleição foi o teste de pulorose, desenvolvido por RUNNELLS et al. (1927), e adaptado por SCHAFFER et al. (1931), o qual é usado ainda hoje com sucesso e consiste em prova de aglutinação rápida com sangue total. Com o desenvolvimento e expansão da avicultura industrial, a partir da década de 80, e com a constatação de inúmeros casos de salmonelose humanas relacionados à presença de *S. Enteritidis* em alimentos de origem aviária, passou a ter importância também o controle das salmonelas paratíficas (BARROW, 1999). Os programas de controle podem ser realizados por meio da associação de métodos sorológicos com métodos bacteriológicos. A excreção fecal de *Salmonella* é intermitente e por pouco tempo, e a resposta sorológica à infecção persiste por vários meses. Assim, os testes se complementam, no sentido de mostrar que, mesmo na ausência de isolamento o lote de aves teve contato com a bactéria (BARROW, 1992a; DAVIES et al., 1997).

O ELISA é um teste sorológico simples que envolve a detecção de IgG. No que concerne ao estudo de *Salmonella* em aves, seu valor para estudo da resposta humoral de aves experimentalmente infectadas por sorotipos invasivos ou para monitoramento de infecções a campo foi demonstrado nos trabalhos realizados por HASSAN et al. (1990), NICHOLAS & CULLEN (1991) e BARROW et al. (1992). Diversos componentes bacterianos têm sido empregados como antígeno, incluindo LPS, flagelo, fímbria, célula total (COOPER et al., 1989; MINGA & WRAY, 1990; TIMONEY et al., 1990; NICHOLAS & CULLEN, 1991; BARROW, 1991; BARROW, 1992b; THORNS et al., 1993; GAST & HOLT, 2001) e antígeno de proteína solúvel (HASSAN et al., 1990; BARROW et al.,

1992). Apesar do teste apresentar reação cruzada ao se examinar amostras de soros de aves infectadas com sorotipos pertencentes aos grupos B e D (CHART et al., 1990), um certo grau de discriminação pode ser observado entre soros de aves infectadas com diferentes sorogrupos como B, C1, C4, D, E1 e E4 (CHART et al., 1990; HASSAN et al., 1990).

Aves infectadas com *Salmonella* sorotipos Gallinarum e Pullorum tendem a produzir resposta humoral persistente e duradoura. Esses sorotipos, ao contrário dos envolvidos nas infecções paratíficas, não são freqüentemente excretados nas fezes das aves (BARROW et al., 1992). Os aviários comerciais devem ser livres de *Salmonella* sorotipos Gallinarum e Pullorum. Detectá-los o mais rapidamente possível é muito importante para prevenir a doença e sua disseminação. Entre outras medidas, o teste de pulorose tem sido o método de escolha para detectar resposta sorológica para os dois sorotipos (SHIVAPRASAD, 1997). O estudo da pulorose e do tifo aviário é essencial para diferenciar estas doenças sorologicamente, de infecções causadas por outros sorotipos invasivos, incluindo Typhimurium e Enteritidis (HASSAN et al., 1990; BARROW et al., 1992). O ELISA realizado com antígeno composto por proteína solúvel de célula total de *S. Gallinarum* com os conjugados peroxidase e fosfatase alcalina foi capaz de detectar resposta humoral em aves infectadas pelos sorotipos Gallinarum e Pullorum, porém, quando o ELISA com peroxidase foi efetuado em amostras de soro provenientes de aves infectadas com *S. Enteritidis* a DO esteve por volta de 0,450. Em se tratando de amostras de campo, isso poderia significar que a ave foi acometida por outra salmonela ou que tivesse sido infectada recentemente. A dúvida seria desfeita refazendo-se o teste uma a duas semanas mais tarde. Por outro lado, o teste com a peroxidase exibe uma forte coloração, deixando entrever a possibilidade do seu uso sem a necessidade do aparelho de leitura. Já o ELISA preparado com a fosfatase alcalina possibilitou a diferenciação entre sorotipos, sem reação suspeita para *S. Enteritidis*, corroborando com os resultados apresentados por IBA et al. (1991) e BARROW et al. (1992). Resultado esse, de interesse para a avicultura brasileira, tendo-se em vista que a vacinação de plantéis contra *S. Enteritidis* já está aprovada para aves comerciais e que está em vias de aprovação para granjas de reprodução. A vacinação

inviabiliza o teste de pulorose, o qual pode apresentar reação positiva quando realizado com soro de aves infectadas por salmonelas dos grupos B e D. Os resultados referentes à análise de amostras de soros de aves naturalmente e experimentalmente infectadas por *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* confirmaram as pesquisas anteriores no qual o ELISA foi utilizado para detectar resposta sorológica aos agentes do tifo aviário e pulorose (IBA et al., 1991; BARROW et al., 1992; BERCHIERI Jr. et al., 1995). Segundo esses autores, as respostas sorológicas são intensas, facilitando a identificação de aves positivas e, no caso de *S. Pullorum*, aves infectadas na primeira semana de vida, expressam a imunidade humoral durante toda o período de vida útil.

A excreção fecal da bactéria *Salmonella* pelas aves é intermitente, enquanto a resposta sorológica persiste por vários meses (BARROW & LOVELL, 1991), sendo a IgG a imunoglobulina mais duradoura. Segundo WITHANAGE et al. (1999), a infecção por *S. Enteritidis* induz a produção de quantidades significativas de anticorpos de todas as subclasses. No ensaio realizado com antígeno de *S. Enteritidis* e com os conjugados peroxidase e fosfatase alcalina detectou-se resposta sorológica em amostras de soros de aves inoculadas com os sorotipos *Enteritidis*, *Gallinarum* e *Pullorum*. Nesses testes não foi observado reação cruzada com amostras de soros contendo IgG contra *Salmonella* do grupo B, diferente dos trabalhos realizados por MINGA & WRAY (1990), NICHOLAS & CULLEN (1991) e BARROW et al. (1992). Algumas reações apresentaram-se na faixa de DO de 0,400 a 1,000. Em se tratando de amostras de soros de aves comerciais esses resultados podem ser considerados suspeitos e sugerem a presença de algum outro sorotipo que também seria de interesse para a saúde pública e saúde animal (BARROW, 1994b). Convém ressaltar que salmonelas têm sido encontradas em investigações de plantéis avícolas para reprodução e para produção de carne ou ovos (ZANCAN et al., 2000; GAMA, 2001). Diante dos resultados alcançados, verifica-se que o ELISA constitui-se em um teste adequado para monitoramento de plantéis avícolas como método de triagem conforme tem sido sugerido (BARROW, 1995, 2000). Testes adicionais realizados com 24 amostras de soros provenientes de aves vacinadas contra *S. Enteritidis* contribuem com a indicação do ELISA/AgSE para monitoramento de plantéis avícolas. As 24 amostras de soros

obtidas antes da vacinação foram negativas e aquelas colhidas duas semanas após a vacinação apresentaram reação positiva em 25% (6/24) das amostras examinadas no ELISA com o conjugado peroxidase, e 75% (18/24) no ensaio com o conjugado fosfatase alcalina. Destaca-se aqui que essas amostras de soro foram negativas ao serem analisadas pelo ELISA/AgSG, assim como amostras de soros provenientes de aves experimentalmente infectadas por *S. Enteritidis*. Portanto, confirmou-se que o ELISA/AgSG não produz reação cruzada com amostra de soro proveniente de ave vacinadas e infectadas por *S. Enteritidis*.

Muitos dos conhecimentos relativos à salmonelose animal e sua implicação na saúde pública foram adquiridos estudando-se *S. Typhimurium*. Este era o sorotipo mais comum antes do desencadeamento dos inúmeros casos originados por *S. Enteritidis*. HASSAN et al. (1990) em trabalho experimental com *S. Typhimurium* observaram que cepas com diferentes habilidades de invasão estimulavam a produção variada de anticorpos. Segundo BARROW (1991), a variação da resposta sorológica de aves experimentalmente infectada com *S. Typhimurium* depende ainda da diferença entre o tempo de exposição à infecção e a amostragem, esta diferença deve ocorrer no campo e pode ser um dos fatores envolvidos na oscilação da concentração de IgG sérica. GAST & HOLT (2001) trabalhando com antígeno flagelar sugerem que para a aplicação do teste e a interpretação dos resultados, deve-se levar em consideração uma possível variação na resposta imune entre grupos, baseado na diferença genética, estresse e exposição a outros patógenos.

O ELISA utilizando como antígeno proteína solúvel de célula total de *S. Typhimurium* produziu resultado similar ao ensaio realizado com AgSE. Amostras de soros de aves infectadas com os sorotipos Gallinarum e Pullorum apresentaram reações onde o valor da DO esteve próximo ao valor considerado positivo, independente do conjugado utilizado. Todavia, a proximidade de reações observadas entre sorotipos dos grupos B e D, no ELISA/AgTM, não é um problema significativo uma vez que infecções com qualquer sorotipo é relevante (BARROW, 1994a).

Corroborando com os trabalhos de BARROW et al. (1989) e BERCHIERI Jr et al. (1995), os dados do presente estudo mostraram que o antígeno solúvel pode ser

empregado para a realização do ELISA. A variação nas concentrações dos antígenos pode estar relacionada com a patogenicidade de cada sorotipo, que por diversos fatores influencia na resposta sorológica do organismo hospedeiro, conforme ressaltam FINLAY & FALKOW (1989), BARROW & LOVELL (1991), LAX et al. (1995), MASTROENI et al. (1995), WITHANAGE et al. (1999), BARROW (2000), KAISER et al. (2000), CHADFIELD et al. (2003), em estudos sobre a patogenicidade e a capacidade de invasão da *Salmonella*.

Os antígenos foram analisados pelo método de SDS PAGE e *Western-Blotting* na presença ou não das amostras de soros provenientes de aves infectadas com *Salmonella* sorotipos Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium. A presença de bandas comigrantes indica a presença de componentes contendo pesos moleculares semelhantes. Entretanto, a semelhança encontrada entre os antígenos não prejudicou a utilização do ELISA, haja visto que observou-se a produção de reações que possibilitou a discriminação dos três sorotipos em questão.

Tendo-se em vista que o ELISA não sofre interferência de resposta a infecções causadas por outras bactérias, ser conveniente por sua facilidade, baixo custo e sensibilidade, conforme descreveu BARROW (1991, 1992b), e baseado nos resultados obtidos com os três antígenos utilizados, o ELISA como teste para detectar resposta sorológica a *Salmonella* com ambos os conjugados mostrou-se adequado. Contudo, o ELISA com o conjugado fosfatase alcalina pareceu ser mais eficiente em algumas ocasiões e novos testes devem ser realizados para comprovar sua eficácia e adaptá-lo como teste de escolha em programa de monitoramento em planteis avícolas.

7-CONCLUSÕES

Nas condições experimentais estabelecidas no presente trabalho, concluiu-se que o ELISA indireto:

1. Detectou resposta humoral contra sorotipos Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium em amostras de soros de aves comerciais;
2. Por meio da determinação das concentrações dos antígenos, da diluição das amostras de soros testes e da DO observou-se que o ELISA/AgSG separou reação positiva para *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium;
3. Detectou resposta humoral contra os sorotipos Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium em amostras de soros de aves comerciais naturalmente ou experimentalmente infectadas;
4. Pode ser efetuado com os conjugados peroxidase e fosfatase alcalina. Contudo, o uso de fosfatase alcalina apresentou resultados visuais mais satisfatórios. O teste realizado com ambos os conjugados é passível de aplicação para monitoria sorológica.

8- REFERÊNCIAS

BAAY, M.F.D.; HUIS in'tVELD, J.H.J. Alternative antigens reduce cross – reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, p.243-247, 1993.

BARROW, P.A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathology**, v.20, p.145-153, 1991.

BARROW, P.A. ELISAs and the serological analysis of *Salmonella* infections in poultry: a review. **Epidemiology and Infection**, v.109, p.361-369, 1992a.

BARROW, P.A. Further observations on the serological response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. **Epidemiology and Infection**, v.108, p.231-241, 1992b.

BARROW, P.A. Use of ELISAs for monitoring *Salmonella* in poultry. **The Veterinary Record**, v.22, p.99, 1994a.

BARROW, P.A. Serological diagnosis of *Salmonella* serotype *enteritidis* infections in poultry by ELISA and other tests. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.55-68, 1994b.

BARROW, P.A. Immunity to *Salmonella* and other bacteria. In: DAVISON, T.F.; MORRIS, T.R.; PAYNE, L.N. **Poultry Immunology**. Berkshire:Carfax Publishing Company, 1995. p.243-263. (Poultry Science Symposium Series, v.24).

BARROW, P.A. Monitorias e controle das salmonelas em reprodutoras na Europa. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas:FACTA, 1998, p. 1-7.

BARROW, P.A. *Salmonella* em avicultura – Problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, p.9-16, 1999.

BARROW, P.A. The paratyphoid salmonellae. **Revue Scientifique et Technique Officef International des Epizooties**. v.19; p.351-375, 2000.

BARROW, P.A.; LOVELL, M.A. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. **Avian Pathology**, v.20, p.335-348, 1991.

BARROW, P.A.; BERCHIERI Jr., A.; AI-HADDAD, O. The serological response of chickens to *Salmonella gallinarum* - *Salmonella pullorum* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Diseases**, v.36, p.227-236, 1992.

BARROW, P.A.; HASSAN, J.O.; MOCKETT, A.P.A.; McLEOD, S. Detection of *Salmonella* infection by ELISA. **The Veterinary Record**, v.125, p.586, 1989.

BARROW, P.A.; DESMIDT, M; DUCATELLE, R; GUITTET, M; van der Heijden, H.M.; HOLT, P.S.; HUIS in't VELT, J.H.; Mc DONOUGH, R.; NAGARAJA, K.V.; PORTER, R.E.; PROUX, K.; SISAk, F.; STAAK, C.; STEINBACH, G.; THORNS, C.J.; WRAY, C.; van ZIJDERVELD, F. World Health Organization-supervised inter – laboratory comparison of ELISAs for the serological detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in chickens. **Epidemiology Infection**, v.117, p.69, 1996.

BERCHIERI Jr, A. Enfermidade das Aves. In: BERCHIERI Jr, A; MACARI, M. **Doenças das Aves**.Campinas: Facta, 2000. p.183-252.

BERCHIERI Jr, A; BARROW, P.A. Patologia e métodos de diagnóstico de *Salmonella enteritidis*. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FACTA, 1995. p.14-19.

BERCHIERI Jr, A.; IBA, A.M.; BARROW, P.A. Examination by ELISA of sera obtained from chickens breeder and layer flocks showing evidence of fowl typhoid or pullorum disease. **Avian Pathology**, v.24, p.411-420, 1995.

BERCHIERI Jr, A.; MURPHY, C.K.; MARSTON, K.; BARROW, P.A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, v.30, p.229-239, 2001.

BUMSTEAD, N.; BARROW, P.A. Genetics of resistance to *Salmonella typhimurium* in newly hatched chicks. **British Poultry Science**, v.29, p.521-529, 1988.

BUMSTEAD, N.; BARROW, P.A. Resistance to *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum* and *Salmonella enteritidis* in inbred lines of chickens. **Avian Diseases**, v.37, p.189-193, 1993.

CHART, H.; ROWE, B. Serology for providing evidence of infection with *Salmonella enteritidis* in chickens. In: ELISA FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF SALMONELLA INFECTIONS IN POULTRY, 1993, United Kingdom. **Proceedings...** United Kingdom:European Commission, 1993. p.77-80.

CHART, H.; ROWE, B.; BASKERVILLE, A.; HUMPHREY, T.J. Serological response of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. **Epidemiology and Infection**, v.104, p.63-71, 1990.

CHADFIELD, M.S.; BROWN, D.J.; AABO, S.; CHRISTENSEN, J.P.; OLSEN, J.E. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella Gallinarum* and other host-adapted *Salmonella enterica* serovars in the avian host. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.49-64, 2003.

COOPER, G. L. Salmonellosis infections in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines - a review. **Veterinary Bulletin**, v. 64, p.123-43, 1994.

COOPER, G.L.; NICHOLAS, R.A.; RACEWELL, C.D. Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis*. **The Veterinary Record**, v.125, p.567-572, 1989.

DADRAST, H.; HESKETH, R.; TAYLOR, D.J. Egg yolk antibody detection in identification of *Salmonella* infected poultry. **The Veterinary Record**, v.126, p.219, 1990.

DAVIES, R.H.; NICHOLAS, R.A.J.; McLAREN, I.M.; CORKISH, J.D.; LANNING, D.G.; WRAY, C. Bacteriological and serological investigation of persistent *Salmonella enteritidis* infection in an integrated poultry organization. **Veterinary Microbiology**, v.58, p.277-293, 1997.

DEBOER, S.H.; SCHAAD, N.W. Preparation of antigens, bacteria, In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S.H. (Ed). **Serological: methodological pathogens**. St Paul: APS Press, 1990. p. 27-31.

DESMIDT, M.; UYTTEBROEK, E.; De GROOT, P.A.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Lipopolysaccharide versus whole germ ELISA and possible consequences of antibiotic treatment on seroconversion to *Salmonella enteritidis*. In: HINTON, M.H.; MULDER, R.W.A.W. **The role of antibiotics in the control of food-borne pathogens**. 1992. p.103-110.

DESMIDT, M.; De GROOT, P.A.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F.; BALE, J.; ALLEN, V.; HINTON, M. Determination of a workable cut-off value in a lipopolysaccharide based Elisa for the detection of antibodies against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in chicken sera and eggs. In: ELISA FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF SALMONELLA INFECTIONS IN POULTRY, 1993, United Kingdom. **Proceedings...** United Kingdom:European Commission, 1993. p,141-150.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; MAST, J.; GODDEERIS, B.M.; KASPERS, B.; HALSEBROUCK, F. Role of the humoral immune system in *Salmonella enteritidis* phage type four infection in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 63, p,355-367, 1998.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v.53, p.210-30, 1989.

GAMA, N.M.S.Q. ***Salmonella* spp em aves de postura comercial**. 2001. 58f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária- Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

GAST, R.K. *Salmonella* infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; McDOUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. 10ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p.81-121.

GAST, R.K. Serology and *Salmonella*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD-BORNE SALMONELLA IN POULTRY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore:R.K. Gast & C.L.Hofacre, 1998. p.154-160.

GAST, R.K.; HOLT, P.S. The relationship between the magnitude of the specific antibody response to experimental *Salmonella enteritidis* infection in laying hens and their production of contaminated egg. **Avian Diseases**, v.45, p.25-431, 2001.

GOREN, E. Untitled letter in word health organization on national and local schemes of *Salmonella* control in poultry, In: SALMONELLA AND SALMONELLOSIS, 1992, Ploufragan. **Proceedings...** Ploufragan: Ispaia, 1992. p.92-110.

HASSAN, J.O.; BARROW, P.A.; MOCKETT, A.P.A.; McLEOD, S. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. **The Veterinary Record**, v.126, p.519-522, 1990.

HASSAN, J.O.; MOCKETT, A.P.A.; CATTY, D.; BARROW, P.A. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium* bacteriology and immune responses. **Avian Diseases**, v.35, p.809-819, 1991.

HOLMES, B.; GROSS, R.J. Coliform bacteria: various other members of the Enterobacteriaceo. In: PARKER, M.T.; COLLIER, L.H. (Ed). **Topley & Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity**. 8ed. London: Eduard Arnold, 1990. v.2, p.415-441.

HOLT, P.S. Effects of induced moulting on immune responses of hens. **British Poultry Science**, v.33, p.165-175, 1992.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's: manual of determinative bacteriology**. 9ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p.186-7.

HORMAECHE, C.; VILLAREAL, B.; MASTROENI, P.; DOUGAN, G.; CHADFIELD, S.N. Immunity mechanisms in experimental salmonellosis. In: CABELLO, F.; HORMAECHE, C.; MASTROENI, P.; BORINA, L. **The Biology of Salmonella**. 1993. p.223-235 NATO ASI Series, Serie A, Life Sciences, 2445).

HUMPHREY, T.J.; BASKERVILLE, A.; CHART, H.; ROWE, B.; WHITEHEAD, A. *Salmonella enteritidis* PT4 infection in specific pathogen free hens: influence of infecting dose. **Veterinary Record**, v.129, p.482-485, 1991.

IBA, A.M.; MONTASSIER, M.F.S; GAMA, N.M.S.Q.; KANETO, C.N.; BERCHIERI Jr, A. Utilização do ELISA (Teste Imunoenzimático) na detecção de portadores de *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum*. **Ars Veterinária**, v.7, p.126-134, 1991.

ISLAM, M.R.; JONES, R.C. An enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody titre against avian reovirus using a single dilution of serum. **Avian Pathology**, v.17, p.411-425, 1988.

JAUHO, E.S.; BOAS, U.; WIUFF, C.; WREDSTRØM, K.; PEDERSEN, B.; ANDRESEN, L.O.; HEEGAARD, P.M.H.; JAKOBSEN, M.H. New technology for regiospecific covalent coupling of polysaccharide antigens in ELISA for serological detection. **Journal of Immunological Methods**, v.22, p.133-143, 2000.

KAISER, P.; ROTHWELL, L; GALYOV, E.E.; BARROW, P.A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. **Microbiology**, v.12, p.3217-3226, 2000.

KIM, C.J.; NAGARAJA, K.V.; POMEROY, B.S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.1069-1074, 1991.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAX, A.J.; BARROW, P.A.; JONES, P.W.; WALLIS, T.S., Current perspectives in salmonellosis. **British Veterinary Journal**, v.151, p.351-377, 1995.

MASTROENI, P.; SKEPPER, J.N.; HORMAECHE, C.E. Effect of anti-tumor necrosis factor α antibodies on histopathology of primary *Salmonella* infections. **Infection and Immunity**, v.63, p.3674-3682, 1995.

MINGA, U.; WRAY, C. Serological tests for *Salmonella enteritidis* in chickens. **The Veterinary Record**, v.21, p.20-21, 1990.

NAGARAJA, K.V.; EMERY, D.A.; SHERLOCK, L.F.; NEWMAN, J.S.; POMEROY, B.S. Detection of *Salmonella arizonae* in turkey flocks by ELISA. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS, 27, 1984, New York. **Proceedings...** New York:Arnold Printing Corporation, 1984. p.185-204.

NAGARAJA, K.V.; AUSHERMAN, L.T.; EMERY, D.A.; POMEROY, B.S. Update on enzyme linked immunosorbent assay for its field application in the detection of *Salmonella arizonae* infection in breeder flocks of turkeys. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS, 29, 1986, New York. **Proceedings...** New York:Arnold Printing Corporation, 1986. p.347-356.

NICHOLAS, R.A.J.; CULLEN, G.A. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. **The Veterinary Record**, v.128, p.74-76, 1991.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F.W. Kauffmann-White scheme. **Research Microbiology**, v.147, n.39, p.765-769, 1996. Supplement.

RUNNELLS, R.A.; COON, C.J.; FARLEY, H.; THORP, F. An application of the rapid-method agglutination test to the diagnosis of bacillary white diarrhea infection. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.70, p.660-667, 1927.

RYCHLIK, I.; LOVELL, M.A.; BARROW, P.A. The presence of genes homologous to the K88 genes *faeH* on the virulence plasmid of *Salmonella gallinarum*. **Microbiology Letters**, v.159, p.255-260, 1998.

SCHAFFER, J.M.; MACDONALD, A.D.; HALL, W.J.; BUNYEA, H. A stained antigen for the rapid whole blood test for pullorum disease. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.79, p.236-240, 1931.

SHIVAPRASAD, H.L. Pullorum disease and fowl typhoid, In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; McDOUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. 10ed. Ames:Iowa State University Press, 1997. p.82-96.

SILVA, E.N.; SNOEYENBOS, G.H.; WEINACK, O.M.; SMYSER, C.F. The influence of native gut microflora on the colonization and infection of *Salmonella gallinarum* in chickens. **Avian Diseases**, v.25, p.68-73, 1981.

SINCLAIR, I.J. Review of application of ELISA in helminthology. In: WARDLEY, R.C.; CROWTHER, J.R. **The ELISA enzyme-linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis**. London: Martinus Nijhoff, 1982. p.35-46.

SNOEYENBOS, G.H. Pullorum disease. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M.; YODER Jr, H.W. **Diseases of Poultry**. 9ed. Ames:Iowa State University Press, 1991. p. 73-86.

TACKACS, B. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide slab gels. In: LEFKOVITS, T.; PRESIN, B. **Immunological methods**. New York:Academic Press, 1979. p.81-105.

TALKINGTON, F.D.; KLEVEN, S.H.; BROWN J.; An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in experimentally infected chickens. **Avian Diseases**, v.29, p.53-70, 1985.

THORNS, C.J.; NICHOLAS, R.A.; BELL, M.M.; CHISNALL, S.C. Preliminary results on the use of SEF14 fimbrial antigen in an Elisa for the serodiagnosis of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. In: ELISA FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF *SALMONELLA* INFECTIONS IN POULTRY, 1993, United Kingdom. **Proceedings...** United Kingdom:Commission European, 1993. p.119-123.

TIMONEY, J.F.; SIKORA, N.; SHIVAPRASAD, H.L.; OPITZ, M. Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* by a gm flagellin – based ELISA. **The Veterinary Record**, v.127, p.168-169, 1990.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.76, p.4350-4354, 1979.

van ZIJDERVELD, F.G.; van ZIJDERVELD-van BEMMEL, A.M.; BROUWERS, R.A.M.; de VRIES, T.S.; LANDMAN, W.J.M.; GOREN, E.; MEKKES, D.R.; de JONG, W.A. Serological detection of chicken flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis*, using an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against the flagellar antigen. In: ELISA FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF *SALMONELLA* INFECTIONS IN POULTRY, 1993, United Kingdom. **Proceedings...** United Kingdom:Commission European, 1993. p.71-76.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. **The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA):** A guide with abstracts of microplate applications. London: Dynstech Europe Borough House, 1979. p.118.

WITHANAGE, G.S.K.; SASAI, K.; FUKATA, T.; MIYAMOTO, T.; BABA, E. Secretion of *Salmonella* – specific antibodies in the oviducts of hens experimentally infected with *Salmonella enteritidis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.67, p.85-193, 1999.

WYANT, T.L.; TANNER, M.K.; SZTEIN, M.B. *Salmonella typhi* flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes. **Infection and Immunity**, v.67, p.3619-3624, 1999.

ZANCAN, F.T.; BERCHIERI Jr, A.; FERNANDES, S.A.; GAMA, N.M.S.Q. *Salmonella* spp investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.230-232, 2000.

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