

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI1000173-5 A2**



(22) Data de Depósito: 04/01/2010
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)

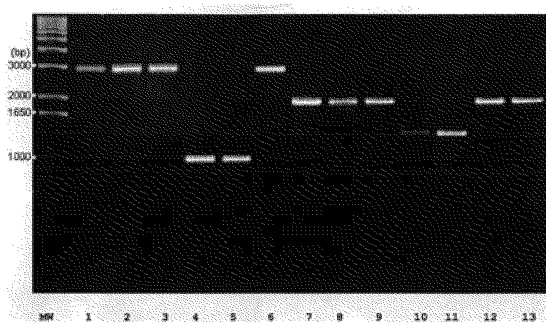
(51) *Int.Cl.:*
C12N 1/21 2006.01
A61K 39/112 2006.01
C12R 1/42 2006.01
A61P 33/02 2006.01

(54) Título: **CEPA BACTERIANA MODIFICADA E USO DA MESMA**

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

(72) Inventor(es): ANGELO BERCHIERI JUNIOR

(57) Resumo: CEPA BACTERIANA MODIFICADA E USO DA MESMA A presente invenção refere-se a um mutante de *Salmonella Gallinarum* defeitivo quanto aos genes *CobS* e *CbiA* (SGCobSCbiA), associados à produção de cobalamina pela bactéria em condições anaeróbicas para uso como vacinas. A presente invenção refere-se, ainda, ao uso da referida cepamutante de *Salmonella Gallinarum* para induzir proteção em aves contra a infecção pela cepa homóloga natural e cepa de *Salmonella Enteritidis* através de uma vacina.



**CEPA BACTERIANA MODIFICADA E USO DA MESMA**CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um mutante de *Salmonella Gallinarum* defeitivo quanto aos genes *CobS* e *CbiA* (SGCobSCbiA), associados à produção de cobalamina pela bactéria em condições anaeróbicas para uso como vacinas. A ausência desses genes tornou a cepa atenuada. Esta cepa foi utilizada para induzir proteção em aves contra a infecção pela cepa homóloga natural e cepa de *Salmonella enteritidis*. Os resultados foram motivadores, havendo queda de ação patogênica das cepas de campo em questão.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

As salmoneloses são enfermidades provocadas por bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, gênero *Salmonella*, espécies *S. bongori* e *S. enterica*. Esta última divide-se nas subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. São bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, catalase-positivos, oxidase-negativos, redutores de nitratos e nitritos, não formadores de esporos *Salmonella Gallinarum* é imóvel.

Salmonella Gallinarum (SG) é um parasita intracelular, anaeróbico facultativo que provoca uma enfermidade característica em aves, o Tifo Aviário. Este sorotipo está fortemente associado ao sistema fagocítico-mononuclear e o desencadeamento da doença dependem da capacidade bacteriana de sobreviver e replicar-se dentro de macrófagos do fígado e do baço (BARROW et al., 1994; WIGLEY et al., 2002). Ao invadir e colonizar os macrófagos do hospedeiro, *Salmonella* spp. utiliza vários fatores de virulência para superar os obstáculos, que são ativados com a internalização da

bactéria (FIELDS et al., 1986; RICHTER-DAHLFORS et al., 1997; VAN IMMERSEEL et al., 2004).

Após a invasão do organismo animal e das células fagocitárias, SG causa doença severa, caracterizada pela alta morbidade e mortalidade em aves (SHIVAPRASAD, 1997). Este comportamento não foi observado com a cepa mutante SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ da presente invenção que tornou-se atenuada e não causou a doença.

SMITH (1956) verificou que uma cepa rugosa de SG (SG9R) havia perdido a capacidade de provocar o Tifo Aviário em aves e que poderia ser empregada como vacina.

WIGLEY et al. (2005) observaram que a atenuação residia na diminuição do período de vida da bactéria no fígado e no baço das aves. Embora por processos distintos, mas em virtude de comportamento semelhante, pesquisou-se o emprego de SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ como candidata a cepa vacinal, visando o controle da infecção de aves por SG e SE.

As vacinas vivas contra *Salmonella* spp. disponíveis atualmente, são preparadas à partir de cepas atenuadas. Embora se considere que estas vacinas sejam capazes de gerar uma forte resposta imune celular, algumas estimulando também a produção de anticorpos, a proteção conferida contra o sorotipo SE, é limitada (MASTROENI et al., 2000).

Outros estudos foram realizados com relação a esta matéria como pode ser observado nos diferentes documentos abaixo:

O documento WO 00/68261 é relacionado aos micro-organismos atenuados que podem ser usados em composições de vacina para a prevenção ou tratamento de infecções bacterianas ou virais. Os inventores utilizaram uma cepa de

Salmonella Typhimurium e provocaram mutação alterando genes relacionados com ilha de patogenicidade.

O documento US 6,399,074 refere-se, em geral, à vacinas para aves domésticas e outras aves e, mais particularmente, à vacinas para proteger aves domésticas e outras aves contra infecção por bactéria gram-negativa patogênica para aves. São utilizadas cepas com alterações relacionadas aos antígenos somáticos.

O documento PI 0410355-6 refere-se a uma composição de vacina compreendendo uma combinação de um microorganismo *S. Typhimurium* mutante de deleção genética e um microorganismo *E. coli* mutante de deleção genética adequada para aplicação em massa a aves. É também provido um método seguro e eficaz para proteger aves contra as destruições de infecção e doença por *E. coli* e *Salmonella*.

O documento PI 0211151-9 se refere a uma salmonela diferente da presente invenção e está direcionado ao componente do adjuvante, sendo ainda proposto usar a vacina com antígenos heterólogo de outro agente patogênico para seres humanos.

O documento PI 0507588-2 refere-se às culturas de *Salmonella* vivas atenuadas para uso como vacinas. As culturas de *Salmonella* do presente documento têm uma capacidade substancialmente reduzida de crescer e replicar na presença de biliar. A capacidade reduzida de crescimento é devida à mutação de desvio metabólico induzida por exposição a uma combinação de ácido nalidíxico e rifampicina por um tempo e sob condições suficientes para induzir a mutação.

O documento PI 0109322-3 refere-se a uma bactéria

Salmonella mutante atenuada que contém genes de virulência inativada que é proporcionada para uso em vacinas eficazes e seguras. Esta invenção utiliza sorotipos diferentes daqueles utilizados na presente invenção e as mutações
5 foram realizadas em genes da ilha de patogenicidade.

O documento PI 0604997 refere-se a uma vacina contra enfermidade provocada por estreptococo, em cavalos. Salmonella seria apenas o vetor, carreando proteína do estreptococo.

10 O documento US 6,890,538 refere-se a uma vacina contra vírus simples da herpes (HSV) compreendendo uma bactéria não patogênica ou atenuada.

Em alguns dos documentos acima, a cepa de Salmonella foi usada como vetor de antígenos de outros agentes
15 patogênicos (antígenos heterólogos). Entretanto, nenhum deles descreve alterações nos genes CobS e CbiA (SGCobSCbiA) nem modifica alguma cepa de Salmonella Gallinarum. Portanto, não existe coincidência de produtos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

20 A presente invenção refere-se uma cepa mutante de Salmonella Gallinarum (SEQ. ID. No. 1) contendo alteração nos dois genes CobS e CbiA (SGCobSCbiA) relacionados com a síntese de cobalamina por Salmonella em ambiente anaeróbico.

25 A presente invenção refere-se, ainda, ao uso da referida cepa mutante de Salmonella Gallinarum para induzir proteção em aves contra a infecção pela cepa homóloga natural e cepa de Salmonella Enteritidis através de uma vacina.

30 DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A FIGURA 1 contém a foto do Eletrofotograma do gel de agarose 1% com as bandas referentes aos genes íntegros e alterados, onde:

MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder);
5 1 - 3, fragmento $\Delta cobS$ Spec^r de SG (2964bp); 4 - 5, fragmento *cobS* (original) de SGNal^r (994bp); 6, Controle positivo com STM F98 $\Delta cobS$ Spec^r (2964bp); 7 - 9, fragmento $\Delta cbiA$ Kan^r de SG (1930bp); 10 - 11, fragmento *cbiA* (original) de SGNal^r (1360bp); 12 - 13, Controle positivo
10 com STM F98 $\Delta cbiA$ Kan^r (1930bp).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção foi iniciada para estudar a participação de genes responsáveis pela respiração da bactéria em anaerobiose, considerando-se que salmonelas são
15 parasitas intracelulares. Para tanto, foram construídos mutantes, de *Salmonella Gallinarum* (SG), contendo genes inoperantes para a produção de algumas enzimas respiratórias que se manifestam durante a vida da bactéria em ambiente anaeróbico. Um dos mutantes tornou-se
20 completamente apatogênico para aves. Este mutante foi então, usado para imunizar as aves que posteriormente foram desafiadas com cepas selvagens de *S. Gallinarum* (SG) e também *S. Enteritidis* (SE). *S. Enteritidis* tem importância em saúde pública decorrente de casos humanos envolvendo
25 produtos alimentícios de origem avícola. Nos dois casos, observou-se proteção das aves pela cepa "vacinal".

A presente invenção foi realizada preparando-se uma cepa de *Salmonella enterica sorovar Gallinarum* contendo alteração em dois genes relacionados com a síntese de
30 cobalamina por *Salmonella* em ambiente anaeróbico (SGcobS-

cbiA-). Estas alterações tornaram a cepa apatogênica para aves e demonstrou ser capaz de provocar resposta imune conseguindo proteger as aves contra o Tifo Aviário e contra a infecção por *Salmonella Enteritidis*.

5 A biossíntese de cobalamina (CBL) só é encontrada entre organismos procarióticos, aeróbicos, anaeróbicos e anaeróbicos facultativos, incluindo-se *Salmonella Typhimurium*. Esta macromolécula constitui-se em nutriente essencial para a vida de animais e seres humanos. Em
10 *Salmonella Typhimurium*, sua síntese ocorre em condições de anaerobiose, podendo ser sintetizada em aerobiose ou anaerobiose quando a bactéria for suprida com as substâncias precursoras como cobinamida (Jeter et al., 1984; Escalante-Semerena, 1990). O operon responsável pela
15 biossíntese de Ado-CBL contém 17 genes CbiA-P, que estão envolvidos na produção da porção inicial da molécula (anéis corrin) e genes envolvidos na integração do nucleotídeo à cobinamida (Cob UST). As salmonelas são bactérias anaeróbicas facultativas capazes da biossíntese de
20 cobalamina (CBL) durante o crescimento em anerobiose. As vias de produção da vitamina B12 são muito complexas, requerendo a atividade catalítica de mais de 24 enzimas. CbiA (Cobyrinic acid a,c-diamide sintetase) é a primeira glutamina aminotransferase na via anaeróbica para a
25 biossíntese de vitamina B12. Esta enzima chama a atenção por catalisar reações químicas em diversos pontos do substrato. O operon contém 17 genes Cbi e 3 Cob.

Os mutantes defectivos quanto aos genes CobS e CbiA oriundos de *Salmonella Gallinarum* foram então preparados
30 conforme metodologia dos protocolos contidos no manual de

técnicas de biologia molecular presentes em Molecular Cloning volumes 1,2 e 3 (Sambrook & Russel, 2001), e no trabalho de Turner et al. (1998), para preparo de genes defectivos relacionados com a respiração anaeróbica de *S.*

5 *Gallinarum*.

Os mutantes foram preparados por conjugação e transdução conforme descrito abaixo:

1. Conjugação do gene defectivo (Can^r ou Spc^r) em *Salmonella gallinarum*

10 O gene defectivo, presente em *Escherichia coli* S17.1 λ pir, será inserido no recipiente final, *S. Gallinarum*., cepa resistente ao ácido nalidíxico (SG9Nal^r). Culturas de EC S17.11 λ pir e as cepas de SGNal^r , serão preparadas, individualmente, em ágar Luria-Bertani (LB) incubado a
15 37°C/24horas em agitação. Com auxílio de uma alça bacteriológica, o crescimento das duas culturas será misturado e espalhado na superfície de ágar LB, que será incubado a 37°C/90 minutos. Usando a alça bacteriológica, o crescimento será colhido e adicionado a 10 mL de caldo LB,
20 que será espalhado, também com alça, sobre a superfície de ágar LB contendo ácido nalidíxico (20ug/mL) e canamicina ou espectinomicina. As placas serão incubadas a 37°C/24 horas. As colônias emergentes serão semeadas em ágar LB contendo discos impregnados com os antibióticos ácidos nalidíxico
25 (30 μ g), cloranfenicol e canamicina ou espectinomicina.

Colônias Nal^r , Can^r ou Spc^r e C^s , serão submetidas ao teste de aglutinação frente ao antígeno somático anti Fator 9 e à acriflavina.

Colônias O9(+) e acriflavina (-) serão submetidas à
30 PCR para caracterização definitiva do mutante desejado.

A PCR será realizada utilizando-se os primers 1 + 4 de cada mutante.

2. Transdução

O preparo de mutantes contendo dois genes defectivos foi realizado através de transdução.

As cepas de Salmonella Nal^r, SG, SP e SE, contendo os genes defectivos cbiACan^r, serão cultivadas em 10mL de caldo LB, incubado a 37°C/24h. Essas culturas apresentam, aproximadamente, $1,0 \times 10^{10}$ ufc/mL. Serão adicionados 5µL de uma solução do bacteriófago ØP22, para se obter uma relação de 0,03Ø/1 bactéria. A mistura será incubada a 37°C/24h sob agitação. A seguir, centrifuga-se o cultivo a 4000rpm/25minutos/4°C, filtra-se o sobrenadante (45µm) e procede-se à contagem do ØP22 em ágar LB com camada de Salmonella (SP, SE ou SG). Posteriormente, a solução de bacteriófago será adicionada em cultura de Salmonella (10mL de caldo LB), preparada em agitação a 37°C/24h. Essa cultura apresenta, aproximadamente, $3,0 \times 10^9$ ufc/mL.

A seguir, prepara-se culturas das salmonelas contendo o gene defectivo CobS Spc^r. Antes da adição do bacteriófago, a cultura será centrifugada, conforme descrito acima e ressuspensa em 1mL de caldo LB. Neste caso, a relação ØP22/SG deverá ser de 0,8/1,0. O ØP22 será cultivado na cepa de Salmonella Nal^rcbiACan^r, o qual será adicionado à cultura de Salmonella Nal^r CobS Spc^r. A mistura será incubada a 37°C/30 minutos e depois espalhada em placas de ágar LB contendo ácido nalidíxico (20µg/mL) e canamicina (30µg/mL), que será incubado a 37°C/24horas. Colônias emergentes serão purificadas em ágar LB mais discos de antibiogramas impregnados com os antibióticos

ácido nalidíxico (30µg/mL) e canamicina (30µg/mL), sendo incubadas a 37°C/24horas. As colônias serão submetidas à técnica da PCR para confirmação dos resultados.

3. Teste genotípico da cepa vacinal SG Δ cobS Δ cbiA 5 para a detecção da deleção nos genes *cobS* e *cbiA*

Após os testes preliminares, para caracterização final das cepas obtidas, procedeu-se à PCR e eletroforese.

3.1. Preparo do Primers

Os primers foram preparados com base no genoma de
10 *Salmonella Typhimurium* (MCCLELLAND et al., 2001).

Gene *cobS*

Primer 1: F 5' - gagatctagaacgaatctgctgtttgcgct - 3' (SEQ
2)

Primer 4: R 5' - agtctagaacagacccagcagaaagatc - 3' (SEQ 3)

15 Gene *cbiA*

Primer 1: F 5' catctagaaaggcatcacgcatttattc - 3' (SEQ 4)

Primer 4: R 3' - tgtctagacagccagtgtgtgcaacattt - 5' (SEQ 5)

3.2. Preparo da amostra:

30 µL X/mistura

20 X=23,00 µL H₂O, 3,0 µL 10X buffer, 3,0 2mM dNTP, 0,9
µL MgCl,

0,5 µL primer 1

0,5 µL primer 4

0,4 µL taq DNA polimerase (Invitroven 10342-020)

25 colônia bacteriana

3.3. PCR (Reação de Cadeia Polimerase)

Para confirmar se a cepa utilizada para preparar o inóculo vacinal era SG Δ cobS Δ cbiA realizou-se a PCR para detectar a presença dos genes alterados.

30 Uma cepa de *S. Typhimrium* F98 com deleção nestes

mesmos genes (STM F98 Δ cobS Δ cbiA) foi utilizada como controle positivo.

A solução empregada para a realização da PCR era composta de 50 μ L, correspondendo a: 47,9 μ L de solução X-mix, 0,6 μ L de cada primer (1 e 4), 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA) e 0,4 μ L de DNA (100ng/ μ L).

As condições para a realização da PCR foram: 95°C por 4 minutos e 25 ciclos utilizando-se: 95°C por 20 segundos, 45°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos. Utilizou-se um período de extensão a 72°C de 5 min. Após a reação, as amostras permaneceram a 4°C e era adicionado 6 μ L de "loading buffer" em cada.

3.4. Eletroforese das amostras

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para análise do tamanho dos fragmentos obtidos (Aparelho: Consort E863, 600V 250mA, cuba Horizon 11-14 CE, Life Technology). O gel consistirá de 90mL (agarose a 10%, diluída em solução tampão TAE - 4,84g TRIS base, 1,034mL ácido acético glacial, 2mL 0,5M EDTA pH 8,0, 1000mL H₂O), acrescido de 9 μ L de solução aquosa a 1% de brometo de etídio (Sigma E-4391). As amostras, mais o marcador de peso molecular (1 μ L DNA Gibco 10787-018, 2 μ L de solução corante, 7 μ L água destilada) foram submetidos a uma corrente elétrica de 80V. Após 3 horas e 30 minutos, o gel foi colocado sob luz ultravioleta e fotografado. Os resultados estão demonstrados na Figura 1.

Os testes abaixo foram realizados pela via oral inoculando no papo das aves 0,5 mL de cultura contendo células viáveis de SG (10⁸ UFC/mL). A via oral é vantajosa em aves por se tratar de criação em escala industrial,

contendo elevado número de animais (milhares). Granjas de aves reprodutoras podem ter cerca de 50.000 aves por núcleo e aves de postura comercial, de 10.000 a mais de 100.000. Este produto também pode ser aplicado por via parenteral.

5 **4. Ensaios *in vivo***

Esses ensaios seguiram os modelos adotados por BERCHIERI et al. (2001a, b). As aves foram criadas em gaiolas de bateria com água e ração *ad libitum*.

10 No momento da chegada das aves, foram coletadas amostras de sangue para testes sorológicos visando à detecção de anticorpos anti-*Salmonella* e suabes de fundo de caixa, conforme ZANCAN et al. (2000) para pesquisa de *Salmonella* spp. Os experimentos foram realizados após os testes terem sido executados no momento da chegada das aves
15 de um dia. Os resultados foram negativos para a pesquisa de *Salmonella* spp e anticorpos anti-*Salmonella*, respectivamente.

O comportamento bioquímico de *Salmonella Gallinarum* (Fisiologia bacteriana) foi determinado a partir de provas
20 positivas: glicose, H₂S, lisina, maltose, dulcitol, salicina, celobiose, tartarato, gelatina, mucato e ornitina; e ainda por provas negativas: uréia, indol, triptofano, motilidade, sacarose, gás, citrato, malonato.

5. Cepas bacterianas

25 Foi utilizada uma cepa de SG, resistente ao ácido nalidíxico (Nal^r), com mutação dupla, contendo parte dos genes *cobS* e *cbiA* deletados de seu genoma (SG Δ *cobS* Δ *cbiA*). Para o desafio, nos experimentos de avaliação da mortalidade, infecção sistêmica e prevenção do tifo aviário
30 foi utilizada uma cepa selvagem de SG resistente ao ácido

nalidíxico (SGNal^r) e uma cepa de SE resistente ao ácido nalidíxico e à espectomicina (SENal^rSpec^r) para os estudos de avaliação do potencial de imunização cruzada contra a infecção por SE. As bactérias estão armazenadas no centro
5 de coleção espanhol de Cultivos Tipo através do número de acesso 7632.

6. Preparo dos inóculos

As culturas, para cada inóculo, foram preparadas a partir de suas respectivas cepas (SGNal^r, SG Δ cobS Δ cbiA e
10 SENal^rSpec^r), que foram semeadas em caldo Luria-Bertani (LB) (Invitrogen 12780-052) e incubadas por 24 horas a 37°C, em agitação (100rpm). Uma amostra de cada cultura foi diluída decimalmente em 0,9 mL solução salina, pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10. De cada diluição foi retirado 0,1mL,
15 que era despejado em placas contendo ágar verde brilhante (Oxoid CM0263) contendo novobiocina (1µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VB Nal/Nov), que foram incubadas a 37°C/24h. O número de colônias por mililitro de caldo LB foi transformado em log₁₀ para apresentação dos resultados.
20 As culturas continham aproximadamente 10⁸ UFC/mL.

7. Aves

Foram utilizadas aves susceptíveis ao tifo aviário (BERCHIERI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2005), de variedade vermelha (Hy-line Brown) e de variedade branca
25 (Hy-line W36) de linhagem comercial, para postura de ovos de mesa e pintinhos com um dia de vida provenientes de incubatório comercial de aves de corte (COBB 500). As aves de postura foram alojadas em gaiolas de baterias de cria e recria, já os pintinhos de corte foram colocados em caixas
30 de madeira teladas. As aves receberam aquecimento elétrico

durante o período inicial, água e ração *ad libitum*.

8. Avaliação da infecção de aves por SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ em comparação com a cepa de SG original

8.1. Experimento 01: Avaliação da mortalidade

5 Para a avaliação do comportamento do mutante obtido, este foi inoculado em aves comparativamente à cepa selvagem. Foram utilizadas aves de variedade vermelha de linhagem comercial para postura de ovos de mesa.

10 Para cada cepa foram utilizados dois grupos contendo cada um 20 aves.

Pintinhos de um grupo receberam 0,5 mL de uma cultura preparada em caldo LB, incubada a 37°C/24h em agitação e do outro, esta cultura diluída a 10^{-2} em caldo LB. O inóculo foi administrado por via oral, no quinto dia de vida.

15 As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se a mortalidade.

8.2. Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica

Para este ensaio, foram utilizadas 80 aves de variedade vermelha de linhagem comercial para postura de ovos de mesa. As aves foram divididas em dois grupos contendo 40 aves. Aves de um grupo foram infectadas com o inóculo (sem diluição) da cepa original e as do outro grupo com a cepa mutante, no quinto dia de vida. 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi), cinco aves de cada grupo, 25 foram sacrificadas para a estimativa da presença de SGNal^r e SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ em baço e fígado.

As amostras de baço e de fígado foram colocadas em solução salina, pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10, maceradas e diluídas decimalmente em 0,9 mL de PBS. De cada 30 diluição retirou-se 0,1mL, que era despejado em placas

contendo ágar verde brilhante (Oxoid CM0263) contendo novobiocina (1µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VB Nal/Nov), que foram incubadas a 37°C/24h. O número de colônias por grama de órgão foi transformado em log₁₀ para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10), era adicionado igual volume de caldo selenito (Oxoid CM395) contendo novobiocina (0,04%) (caldo SN), preparado em concentração dupla. O frasco era incubado a 37°C/24h e a seguir, seu conteúdo era semeado em ágar VB Nal/Nov, com incubação a 37°C/24h.

9. Avaliação do potencial do mutante SG Δ cobS Δ cbiA como cepa vacinal sobre a cepas selvagens de SG e SE

9.1. Experimento 03: Proteção de aves utilizando SG Δ cobS Δ cbiA contra a infecção por SG

Este experimento foi realizado com aves de linhagem de postura comercial para ovos de mesa, variedade vermelha.

Os inóculos da cepa vacinal de SG Δ cobS Δ cbiA e da cepa desafio de SGNal^r foram preparados conforme o procedimento descrito anteriormente no item 6.

Foram formados três grupos contendo 40 aves cada. As aves do grupo A foram vacinadas aos cinco dias de vida, do grupo B aos cinco e vinte e cinco dias de vida e as aves do Grupo C não receberam nada (controle). A dose vacinal consistia de 0,5mL da cultura de SG Δ cobS Δ cbiA, inoculado por via oral, diretamente no papo. Aos 45 dias de vida, todas as aves foram desafiadas com 1,0 mL de inóculo, contendo a cepa selvagem de SGNal^r.

As aves foram examinadas durante 28 dias, registrando-se a mortalidade e os sinais clínicos apresentados. No 28º

dia de vida, as aves remanescentes foram sacrificadas para a realização de exame bacteriológico de fígado, utilizando-se suabes estéreis de algodão. As amostras foram colocadas em tubos contendo 2 mL de caldo SN e incubadas a 37°/24h.

5 Após o enriquecimento, as amostras foram semeadas em ágar VB Nal/Nov. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Decorrido este período, procedeu-se à leitura das placas.

9.2. Experimento 04: Proteção de aves utilizando SG 10 *ΔcobSΔcbiA* contra a infecção por SE

Este experimento foi realizado com aves de linhagem de postura comercial para ovos de mesa, variedade branca.

Os inóculos da cepa vacinal de SG *ΔcobSΔcbiA* e da cepa desafio de SENal^rSpec^r foram preparados conforme o
15 procedimento descrito anteriormente no item 6.

Foram formados três grupos contendo 40 aves cada. As aves do grupo A foram vacinadas aos cinco dias de vida, do grupo B aos cinco e vinte e cinco dias de vida e as aves do Grupo C não receberam nada (controle). A dose vacinal
20 consistia de 0,5mL da cultura de SG *ΔcobSΔcbiA*, inoculado por via oral, diretamente no papo.

Neste ensaio foram avaliadas a excreção fecal e a infecção sistêmica da cepa utilizada no desafio.

A avaliação da excreção fecal foi feita pesquisando-se
25 a presença de SENal^rSpec^r nas fezes, duas vezes por semana, durante quatro semanas, por meio da colheita de fezes cloacais com suabes estéreis de algodão. Os suabes foram colocados em tubos contendo 2 mL de caldo SN. Após agitação, foram semeados em ágar VB Nal/Nov. A seguir, as
30 placas e tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Na

ausência de crescimento em ágar VB Nal/Nov, semeava-se novamente os suabes enriquecidos em placas contendo ágar VB Nal/Nov com incubação a 37°C/24horas. Decorrido este período, era realizada a leitura das placas.

5 Para avaliar a infecção sistêmica, 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi), 5 aves, de cada grupo, foram sacrificadas para a estimativa da quantidade de SE em baço, fígado e conteúdo cecal (BERCHIERI et al., 2001a,b).

10 As amostras de baço, de fígado e de conteúdo cecal foram colocadas em solução salina pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10, maceradas (conteúdo cecal era homogeneizado) e diluídas decimalmente em 0,9 mL de PBS. De cada diluição foi retirado 0,1mL, que era despejado em placas de ágar VB Nal/Nov, as quais eram incubadas a 37°C/24h. O número de
15 colônias por grama de órgão foi transformado em $\log_{10}$ para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10), era adicionado igual volume de caldo SN, preparado em concentração dupla. O frasco era incubado a 37°C/24h e o
20 seu conteúdo era semeado em ágar VB Nal/Nov, com incubação a 37°C/24h. Decorrido este período, era realizada a leitura das placas.

10. Análise estatística

Os dados relativos à mortalidade foram analisados pelo
25 teste não paramétrico do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (GREENWOOD & NIKULIN, 1996). O teste de comparação múltipla de Tukey foi utilizado na análise dos resultados obtidos nas contagens de SG e SE dos órgãos ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (DANIEL,
30 1991).

11. Avaliação da infecção de aves por SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em comparação com a cepa de SG original

11.1. Experimento 1: Avaliação da mortalidade

Na Tabela 1 estão presentes os dados referentes à mortalidade de aves que receberam os inóculos sem ser diluído e o diluído a 10^{-2} da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ e da cepa selvagem SGNal^r. Durante os 28 dias de observação, nos grupos de aves que receberam o mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, diluído ou não, a mortalidade foi nula. No grupo controle, a cepa de SGNal^r causou mortalidade em 83,3% das aves que receberam a cultura sem diluição e em 60% das aves que receberam a cultura diluída 100 vezes. No 28º dpi, as aves remanescentes foram sacrificadas, para a realização do exame bacteriológico de fígado. SGNal^r ou SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ não foram recuperadas nas aves de seus respectivos grupos.

Tabela 1. Mortalidade de aves vermelhas comerciais para postura, desafiadas experimentalmente no quinto dia de vida com cultura de SG Δ cobS Δ cbiA em comparação com a cepa selvagem SGNal^r.

Mortalidade de aves (dpi) em grupos de 30																	Nº de aves restante s		
Cepa		Cultu ra	aves															Total	%
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	22	28			
SGΔcobs	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 a	0	30	
ΔcbiA	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 a	0	30	
	N	-	-	-	2	5	9	7	1	-	-	1	-	-	-	25 b	83,	5	
SGNal ^r																	3		
	10 ⁻²	-	-	-	-	2	10	4	2	-	-	-	-	-	-	18 b	60	12	

dpi: dias pós infecção; N: cultura sem diluição; Aves sacrificadas no 28º dpi. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (χ^2 , p<0,05), considerando-se a mesma concentração do inóculo.

11.2. Experimento 2: Avaliação da infecção sistêmica

Os suabes de fundo de caixa e os testes sorológicos realizados no momento da chegada das aves de um dia, apresentaram-se negativos para a pesquisa de *Salmonella* spp e anticorpos anti-*Salmonella*, respectivamente.

Os resultados quanto à infecção sistêmica estão na Tabela 2. A quantidade de SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ em fígado e baço das aves foi significativamente menor do que a da cepa selvagem (SGNal^r), no 5° e 7° dpi. Além de menor multiplicação, a cepa mutante SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ foi encontrada no fígado das aves até no 7° dpi, enquanto que a cepa selvagem, persistiu no fígado e no baço das aves do grupo controle até o 14° dpi. A partir do 21° dpi, a cepa mutante SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ não foi encontrada em nenhum dos órgãos examinados e o grupo controle não tinha nenhuma ave para a inspeção devido à mortalidade.

Tabela 2. Número ($\log_{10}$) de células viáveis (UFC/g) de *Salmonella Gallinarum* em baço e fígado de aves vermelhas comerciais para postura, desafiadas no quinto dia de vida com cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ ou com a cepa selvagem (SGNaI^r).

dpi	órgãos	SG $\Delta cobS \Delta cbiA$					SGNaI ^r						
		1	2	3	4	5	μ	6	7	8	9	10	μ
2	Baço	2	0	2,3	0	0	0,86a	2,69	0	3,71	2,47	4,04	2,58a
	Fígado	2	2	2,47	2	0	1,69a	2	0	3,14	2	3,25	2,08a
5	Baço	0	3,41	0	2,95	3,38	1,95b	6,07	5,59	5,76	6,11	6,2	5,94a
	Fígado	0	2,47	0	2,3	2,9	1,53b	6,07	5,07	6,04	7,07	6,07	6,06a
7	Baço	0	0	4,27	0	0	0,85b	7,07	4,71	5,87	4,72	4,77	5,43a
	Fígado	0	0	0	2	2	0,8b	6,96	5,36	6,14	4,72	6,41	5,92a
14	Baço	0	0	0	2	2	0,8a	4,14	0	5,68	0	0	1,96a
	Fígado	0	0	0	0	0	0	3	0	3,36	0	0	1,27a
21	Baço	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	
	Fígado	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	
28	Baço	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	
	Fígado	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	

5 dpi: dias pós-infecção; 0: negativo, M: aves que não foram inspecionadas devido à mortalidade. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

12. Avaliação do mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ como cepa vacinal contra a infecção pelas cepas selvagens de SG e SE

12.1. Experimento 3: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ contra a infecção por SG

5 Os dados apresentados na Tabela 3 revelam que a cepa mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ conferiu proteção contra a cepa selvagem SGNal^r, reduzindo a mortalidade entre as aves vacinadas. A mortalidade foi de 15% entre as aves do grupo A, 25% entre as aves do grupo B e 75% entre as aves do
10 grupo C (controle), que não receberam o inóculo da cepa mutante. A diferença entre a mortalidade das aves dos grupos A e B e a mortalidade das aves do grupo C (controle) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 3. Mortalidade de aves vacinadas oralmente com cultura de SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ e desafiadas oralmente com a cepa selvagem SGNal^r.

Vacinação (idade)	GRUPOS		
	A 5 dias	B 5 e 25 dias	C não vacinado
nº de aves mortas/total	3/20 ^a	5/20 ^a	15/20 ^b
% de mortalidade	15	25	75

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (χ^2 , $p < 0,05$).

12.2.Experimento 4: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ contra a infecção por SE

Para a avaliação da proteção das aves pela cepa de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ contra SE analisou-se a excreção fecal mediante
5 exame de suabe de cloaca e a infecção sistêmica estimando-se a presença de SENal^rSpec^r em baço, fígado e conteúdo cecal.

Na Tabela 4 estão os resultados referentes à análise da excreção fecal de SENal^rSpec^r. No grupo B, no qual as
10 aves receberam a cepa vacinal de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ aos 5 e 25 dias de vida, houve redução significativa ($p < 0,05$) da excreção fecal da cepa de SENal^rSpec^r utilizada no desafio. Os suabes cloacais foram realizados duas vezes por semana nas aves dos grupos A, B e C. O número de aves testadas
15 diminuía conforme eram realizados os sacrifícios para a colheita das amostras de órgãos.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da avaliação da infecção sistêmica pela cepa de SENal^rSpec^r, utilizada no desafio das aves. A vacinação das aves com o
20 mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, reduziu o número de SENal^rSpec^r em baço, fígado e ceco das aves dos grupos A e B, em comparação às aves do grupo C (controle). No 2° e 5° dpi, a contagem de SENal^rSpec^r no conteúdo cecal das aves do grupo C (controle) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que
25 no grupo B e no 5° e 7° dpi a contagem de SENal^rSpec^r no fígado das aves dos grupos A e B também diferiu estatisticamente em relação ao grupo C (controle).

Tabela 4. Número de suabes positivos após a inspeção da cloaca de aves brancas para postura, para detecção de SENal^rSpec^r utilizada como cepa desafio após a vacinação de aves com cultura de SG Δ cobS Δ cbiA.

vacinação (idade)	GRUPOS								
	A			B			C		
	5 dias			5 e 25 dias			não vacinado		
dpi	D	E	T	D	E	T	D	E	T
2	16	12	28	11	8	19	11	10	21
5	17	11	28	5	5	10	14	13	27
8	0	3	3	0	0	0	2	7	9
12	0	1	1	0	0	0	0	3	3
15	1	1	2	0	0	0	1	1	2
19	0	1	1	0	0	0	0	0	0
22	0	1	1	0	0	0	0	1	1
26	0	2	2	0	0	0	0	0	0
TOTAL	34	32	66b	16	13	29a	28	35	63b

5 dpi: dias pós-infecção; D: Resultado da semeadura direta (0h); E: Resultado da semeadura após enriquecimento (24h); T: Total. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (χ^2 , $p < 0,05$).

10 Grupo A: vacinação com a cepa SG Δ cobS Δ cbiA aos 5 dias de vida

Grupo B: vacinação com a cepa SG Δ cobS Δ cbiA aos 5 e 25 dias de vida

Grupo C: controle (não vacinado).

Tabela 5. Contagem (Log_{10}) do número de células viáveis (UFC/g) da cepa desafio SENal^rSpec^r, em baço, fígado e conteúdo cecal de aves brancas para postura, vacinadas oralmente com cultura de SG $\Delta\text{cobS}\Delta\text{cbiA}$.

		GRUPOS														
		A (5 dias)					B (5 e 25 dias)					C (não vacinado)				
		Aves					Aves					Aves				
dpi	Órgãos	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
2	Baço	2	2	0	0	0	0,8a	0	0	0	0	0a	2	0	2	0
	Fígado	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0a	0	2	0	0
	Ceco	2	3,64	4,07	2	2	2,74ab	2	0	2	2	1,6b	5,47	2	4,65	2
5	Baço	0	0	2	2	2	1,2ab	0	0	0	0	0,4b	2	2	2	2
	Fígado	0	0	0	2	0	0,4b	0	0	0	0	0,4b	2	2	2	2
	Ceco	2	4,82	2	4,55	4,89	3,65ab	0	5,69	2	0	1,54b	2	6,62	7,07	6,2
7	Baço	2	2	2	0	0	1,2a	0	2	0	0	0,8a	2	2	2	2
	Fígado	0	2	0	0	0	0,4b	0	0	0	0	0,4b	2	2	2	2
	Ceco	0	0	0	2	2	0,8a	0	0	2	2	1,2a	2	2	2	2
14	Baço	0	0	2	0	0	0,4a	0	0	2	0	0,4a	0	2	0	2
	Fígado	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0a	0	0	2	2
	Ceco	2	2	0	0	0	0,8a	0	0	2	0	0,4a	0	2	2	2
21	Baço	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0a	0	2	0	0
	Fígado	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0a	0	0	0	0
	Ceco	0	0	0	0	0	0a	2	0	0	0	0,4a	0	0	0	0
28	Baço	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0a	0	2	0	0
	Fígado	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0a	0	0	0	0
	Ceco	0	0	0	0	0	0a	2	0	0	0	0,4a	2	2	0	0

dpi: dias pós-infecção; 0: Negativo; Médias (μ) seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Grupo A: vacinação com a cepa SG $\Delta\text{cobS}\Delta\text{cbiA}$ aos 5 dias de vida

Grupo B: vacinação com a cepa SG $\Delta\text{cobS}\Delta\text{cbiA}$ aos 5 e 25 dias de vida

Grupo C: controle (não vacinado).

13. Discussão dos resultados

Conforme consta na Tabela 1, nos grupos em que as aves receberam o mutante SG $\Delta cobS \Delta cbiA$, não se observou mortalidade, enquanto que nos grupos controles, a mortalidade foi de 83,3% (25/30) quando utilizou-se o inóculo sem diluição e de 60% (18/30) quando o inóculo foi diluído a 10^{-2} em caldo LB, à semelhança de resultados observados em estudos anteriores sobre o Tifo Aviário (BARROW *et al.*, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Complementando os estudos a respeito da relação entre a cepa mutante e aves, foram feitos estudos a respeito da infecção sistêmica. Conforme pode-se observar na Tabela 2 a cepa mutante foi recuperada do fígado até o 7º dpi, enquanto a cepa selvagem permaneceu neste órgão até o 14º dpi, assim como foi descrito anteriormente por OLIVEIRA *et al.* (2005) com a infecção de aves de postura adultas, utilizando a mesma cepa de SG. A contagem bacteriana nos órgãos revelou uma menor quantidade de SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ em relação à cepa selvagem SG. Aos 21 dpi, SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ não foi encontrada nos órgãos examinados, enquanto que o grupo controle não possuía nenhuma ave, devido à mortalidade causada pela cepa selvagem. Assim sendo, pode-se afirmar que a deleção dos genes *cobS* e *cbiA* trouxe à cepa mutante transtornos metabólicos que refletiram no seu comportamento *in vivo*, com relação ao crescimento e à virulência no organismo hospedeiro. A alteração metabólica de microrganismos leva ao comprometimento da sua sobrevivência no organismo hospedeiro. SHAH *et al.* (2007) verificaram situação similar quando tornaram o gene *metC* inoperante em uma cepa de SG. A incapacidade desta bactéria em sintetizar

metionina interferiu no seu crescimento nos órgãos invadidos (fígado e baço), diminuindo de forma significativa a sua virulência.

A via de biossíntese da cobalamina em *Salmonella* spp. pode ficar comprometida quando algum gene do operon *cob* torna-se inoperante, sendo incapaz de sintetizar esta molécula, se substâncias precursoras não forem encontradas no ambiente (GRABAU & ROTH, 1992). A cobalamina é uma molécula importante para *Salmonella* Typhimurium, cuja principal função seria atuar na degradação de fontes de carbono, como o propanediol e o tetrionato, para a obtenção de energia (JETER, 1990; AILION et al., 1993; BOBIK et al., 1999; PRICE-CARTER et al., 2001). Portanto, essa substância exerce influência na multiplicação bacteriana e sua ausência pode levar à atenuação da bactéria (FIELDS et al., 1986). A partir dos resultados obtidos na presente invenção nota-se a influência da cobalamina no metabolismo bacteriano de SG. No entanto, essa participação pode variar entre os sorotipos de *Salmonella* spp., como descrito no trabalho anterior (BJÖRKMAN et al., 1996), uma cepa de *Salmonella* Typhimurium com alteração de genes envolvidos na biossíntese de cobalamina continuou expressando a mesma virulência.

A cepa utilizada na presente invenção apresentou dois genes alterados, relacionados com a biossíntese da cobalamina, enquanto que mutantes de SG contendo alteração no gene *cobS* ou *cbiA*, individualmente, não tiveram a virulência diminuída da mesma maneira (PAIVA et al., 2007). A deleção simples pode não ter sido suficiente para bloquear a biossíntese de vitamina B₁₂, talvez porque a

bactéria utilize processo alternativo que não dependa daquela enzima, enquanto a alteração dupla conseguiu causar danos irreparáveis.

Segundo JETER et al. (1984), mutantes de *Salmonella* Typhimurium incapazes de sintetizar cobalamina caem em três classes fenotípicas: 1ª. Deleção na parte I do operon *cob*: a bactéria sintetiza cobalamina só quando for fornecido *cobinamida*; 2ª. Deleção na parte II do operon *cob*: a bactéria sintetiza cobalamina só quando for fornecido dimetil-benzimidazol (DMB); 3ª. Quando a deleção ocorre na parte III do operon *cob*: os mutantes falham na síntese de cobalamina mesmo quando se fornecem ambos os precursores (*cobinamida* e DMB). O gene *cbiA* localizado na parte I do operon *cob* é o primeiro local de leitura para iniciar a síntese da cobalamina e em *Salmonella* Typhimurium codifica uma amidase que atua em fase tardia da via biossintética (ROTH et al., 1993). Assim, no mutante SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ foram eliminados um gene da parte I (*cbiA*) e um da parte III (*cobS*), quebrando a via de biossíntese da cobalamina.

Os genes que codificam enzimas para o metabolismo de carboidratos, nucleotídeos ou aminoácidos, são chamados de genes de manutenção e são conhecidos por participarem dos mecanismos de virulência, através da aquisição de nutrientes essenciais para o crescimento intracelular de *Salmonella enterica*. A cobalamina é importante quando atua como cofator em reações como as das enzimas homocisteína metil transferase (CAUTHEN et al., 1966) e etanolamina amônia liase (SCARLETT & TURNER, 1976), responsáveis, respectivamente, pela síntese de metionina e degradação da etanolamina. Assim, o amplo espectro de atuação, sugere que

esta molécula seja imprescindível, não por possuir apenas uma função essencial, mas por ser um catalisador de várias etapas do metabolismo bacteriano.

De acordo com os resultados acima, a deficiência de cobalamina interferiu na multiplicação e persistência de SG, indicando que a atenuação está ligada à perda da capacidade de sobreviver dentro do sistema fagocítico-mononuclear.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3 a vacinação por via oral, com a cepa SG $\Delta cobS \Delta cbiA$, protegeu as aves contra o desafio com a cepa selvagem de SG. Em grupos de 20 aves, sobreviveram 17 aves naquele em que se utilizou uma dose vacinal, 15 quando se empregou 2 doses vacinais, permanecendo apenas 5 aves vivas após o desafio pela cepa selvagem de SG, diferindo dos grupos vacinados (χ^2 , $p < 0,05$). A resposta imune gerada pela aplicação de uma dose vacinal teve a mesma eficácia que a utilização de duas doses. Esses resultados sugerem que a cepa SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ pode imunizar as aves por meio da inoculação oral, conseguindo diminuir a incidência de Tifo Aviário. Alguns resultados semelhantes foram relatados anteriormente com a utilização da cepa SG9R. Segundo BOUZOUBAA *et al.* (1989), uma cepa selvagem de SG que provocou a mortalidade em 60% de aves do grupo controle, não causou mortalidade no grupo de aves vacinadas com SG9R, embora tenha provocado lesões necróticas focais no fígado em até 55% das aves, à semelhança de relato anterior (SILVA *et al.*, 1981). Em experimento descrito por LEE *et al.* (2005), após o desafio com uma cepa patogênica de SG a mortalidade variou de 95 a 100% nos grupos controles, enquanto que nos grupos

vacinados com SG9R essa variação foi 0 a 5%. Assim como SG9R, a cepa SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ poderá ser utilizada com sucesso no controle do Tifo Aviário, com algumas vantagens como a ausência de lesões severas em órgãos e a possibilidade de
5 diferenciá-la de outras cepas de SG. CHACANA & TERZOLO (2006) notaram que a vacinação com uma cepa atenuada de SE (*Salmonella* TAD E) foi capaz de proteger aves contra o sorotipo SG após a aplicação de três doses. Porém, a imunidade não foi duradoura e quando o desafio foi
10 realizado em maiores intervalos de tempo, a mortalidade das aves vacinadas foi igual à do grupo controle. Portanto, a melhor proteção contra o Tifo Aviário é obtida quando utilizam-se vacinas preparadas a partir de cepas de SG.

Tendo-se em vista que os sorotipos Gallinarum e
15 Enteritidis possuem composição antigênica semelhante, pertencendo ao sorogrupo D1 (O: 1, 9, 12), investigou-se a possibilidade de se utilizar a cepa de SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ como vacina para controlar a infecção de aves por SE. Foram realizados dois experimentos para a avaliação da proteção
20 contra uma cepa desafio de SE, sendo um com aves de postura de linhagem branca e o outro com pintinhos de corte.

No experimento com as aves de postura, após o desafio inspecionou-se a excreção fecal e a colonização de fígado, baço e ceco por SE. Os resultados referentes ao exame dos
25 suabes cloacais (Tabela 4), demonstram uma redução na excreção fecal de SE no grupo em que as aves receberam duas aplicações da cepa SG $\Delta cobS \Delta cbiA$, aos 5 e aos 25 dias (χ^2 , $p < 0,05$). Não houve diferença no número de suabes positivos entre o grupo das aves que receberam uma dose da cepa
30 vacinal, aos cinco dias e o grupo controle (χ^2 , $p > 0,05$).

SILVA et al. (1981) relataram à redução de 20% na excreção fecal de STM em aves vacinadas por via oral ou subcutânea com a cepa SG9R. BARROW et al. (1991), notaram que não ocorreu redução da excreção fecal de uma cepa de SE, utilizada para desafiar as aves após a vacinação com SG9R. Na presente invenção, envolvendo a utilização da cepa SG $\Delta cobS \Delta cbiA$, a excreção fecal de SE foi reduzida em cerca de 55% quando as aves receberam duas doses da cepa vacinal e nenhuma ave excretou a cepa desafio após o 5° dpi. Enquanto a excreção de SE foi observada durante toda a fase experimental pós desafio (22° dpi), nas aves do grupo onde se aplicou uma dose da cepa vacinal e do grupo controle (sem vacinação) (Tabela 4). Esses resultados são motivadores, tendo-se em vista que BETANCOR et al. (2005) também observaram a redução da excreção fecal de SE, em aves vacinadas (duas doses) com cepa atenuada de SE, mas com a presença da bactéria nas fezes por período mais longo, de 15 dias.

Conforme consta na Tabela 5, houve redução na quantidade de SE recuperada no fígado das aves vacinadas com uma dose de SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ a partir do 5° e 7° dpi, enquanto que no grupo em que as aves receberam duas doses vacinais, a redução foi significativa no conteúdo cecal nos 2° e 5° dpi, no fígado nos 5° e 7° dpi e no baço no 5° dpi. Assim, pode-se afirmar que a cepa vacinal foi capaz de reduzir a infecção de aves por SE, quando foram utilizadas duas doses. Esses resultados são inovadores, tendo-se em vista que, as vacinas vivas disponíveis são incapazes de impedir completamente a instalação de SE no ceco e a colonização dos órgãos das aves, sendo às vezes expressiva

na proteção conferida contra a infecção sistêmica (BARROW *et al.*, 1991; COOPER *et al.*, 1994; GANTOIS *et al.*, 2006).

Vacinas contendo outros sorotipos de *Salmonella* para proteger aves contra SE também já foram avaliadas. HASSAN & CURTISS (1994b), utilizaram uma cepa atenuada *Salmonella* Typhimurium Δ cya Δ crp visando inibir a presença de sorotipos de *Salmonella* dos grupo B, C, D e E em aves. Em aves vacinadas na 2ª e 4ª semana e desafiadas por SE na sexta semana de vida, a proteção contra a colonização do ceco foi fraca, já a redução da quantidade de SE recuperada nos órgãos foi melhor quando foram utilizadas cepas pouco invasivas para desafiar as aves.

CERQUETTI & GHERARDI (2000) utilizaram uma cepa atenuada de SE para vacinar aves nos primeiros dias de vida. A cepa vacinal conferiu boa proteção contra os sorotipos SE e SG, quando o desafio foi realizado em 14 dias após a aplicação da última dose imunizadora, mas não foi capaz de proteger contra o desafio por STM. Esta cepa apresentou algumas características que podem desfavorecer a sua utilização no campo. Foi necessário aplicar quatro doses vacinais, o que aumenta o estresse das aves e o custo da vacinação para os produtores. Após a última dose, as aves excretaram a cepa vacinal no ambiente por até duas semanas. A cepa SG Δ cobS Δ cbiA possui algumas características vantajosas quando considera-se seu uso como vacina. A inoculação de apenas uma dose, administrada por via oral, foi eficaz contra SG. Outra vantagem que SG Δ cobS Δ cbiA tem sobre as demais cepas vacinais disponíveis, principalmente contra SE, baseia-se no fato de que mesmo após a sua inoculação oral, a excreção fecal e a

consequente contaminação do ambiente são inexpressivas, além da necessidade de poucas aplicações (no máximo duas) para uma proteção efetiva contra o sorotipo heterólogo.

Em um estudo a campo, FEBERWEE *et al.* (2001a) relacionaram a redução de infecções por SE em lotes de aves poedeiras comerciais à utilização da vacina SG9R, em conjunto com a aplicação de um programa de biossegurança, incluindo outras medidas sanitárias que diminuem o risco de infecções por SE. Na presente invenção, os inóculos utilizados para desafiar as aves continham grande quantidade de bactéria, que dificilmente seria encontrada em condições normais a campo. As condições em que os experimentos foram executados propiciavam a constante reinfecção das aves devido à alta contaminação no ambiente dentro dos infectórios. O uso da cepa SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ em granjas avícolas ainda não foi testado, mas os resultados dos ensaios realizados indicam que SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ poderá ser uma importante ferramenta para combater infecções por SG e SE.

Face aos resultados favoráveis ao uso da cepa SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ como vacina, investigou-se seu emprego para evitar a colonização cecal de aves por SE no início da vida, na forma de exclusão competitiva. Já foi relatado que cepa de *Salmonella* Typhimurium consegue inibir a colonização cecal de aves por cepas homólogas (BERCHIERI JR & BARROW, 1990). COOPER *et al.* (1994), conseguiram impedir a colonização cecal de aves recém nascidas por SE, aplicando oralmente um inóculo contendo uma cepa atenuada de SE no primeiro dia de vida. No experimento em que pintinhos de corte receberam SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ no primeiro dia

de vida, não ocorreu inibição de SE que foi inoculada por via oral no segundo dia de vida, a qual colonizou e se multiplicou no ceco das aves de ambos grupos. A quantidade de SE encontrada no conteúdo cecal dos pintinhos do grupo controle e do grupo vacinado, sacrificados no 5º dpi, foi elevada e não diferiu entre si (Tabela 6). Assim sendo, a cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ não impediu a colonização cecal pela cepa desafio, como fez a cepa atenuada de SE (COOPER et al, 1994). METHNER et al. (2001) analisaram a utilização de uma cepa de STM atenuada para impedir a colonização cecal de pintinhos desafiados por uma cepa patogênica homóloga no 3º dia de vida, sem sucesso. A colonização do intestino por uma cepa "vacinal" de Salmonella seria uma forma de proteger aves recém eclodidas e aves recém vacinadas contra a infecção por cepas patogênicas, pois durante este período, a resposta imune ainda é limitada. Porém, esta ação parece estar distante da capacidade das cepas vacinais disponíveis, incluindo-se a SG $\Delta cobS\Delta cbiA$. Cepas atenuadas de SE mostraram melhores resultados; no entanto, são excretadas no ambiente, o que é uma característica indesejável para uma vacina. A proteção do trato intestinal das aves durante este período parece ser exercida, mais satisfatoriamente, pelo método de exclusão competitiva (METHNER et al., 2001; STERZO et al., 2005).

A cepa atenuada SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ mostrou-se capaz de proteger aves contra o desafio pela cepa patogênica de SG e também foi eficaz em reduzir a infecção por SE quando inoculada duas vezes em aves de postura. Destarte, os resultados obtidos na presente invenção são promissores e deverão nortear futuros estudos visando a aplicação da cepa

SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ como vacina no controle da infecção de aves por SG e SE, em condições experimentais controladas, bem como estendê-los para pesquisas aplicadas ao campo.

Portanto, dentro das condições experimentais adotadas na presente invenção concluiu-se que:

- A cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ tornou-se atenuada e não causou mortalidade em aves.

- A aplicação de uma ou duas doses da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ é capaz de proteger aves contra o desafio por uma cepa selvagem de SG.

- A inoculação de duas doses da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ foi capaz de gerar imunidade cruzada e proteger aves contra o desafio por uma cepa de SE.

- Houve redução significativa da quantidade de SE encontrada no fígado, no baço e no conteúdo cecal das aves que receberam duas doses de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$.

- A aplicação de duas doses da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ causou grande redução da excreção fecal de SE utilizada para desafiar as aves.

- A cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ é invasiva e não foi capaz de impedir a colonização do ceco pela cepa de SE.

- A vacinação com duas doses de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ causou redução de SE nos órgãos, no conteúdo cecal e na excreção fecal, desta forma, a proteção conferida pela cepa vacinal deve ser classificada como parcial.

- A cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ possui vantagens, como a impossibilidade de ser excretada nas fezes, a completa atenuação, a excelente imunogenicidade contra SG, a incapacidade de infectar humanos e a possibilidade de ser detectada e diferenciada por técnicas moleculares.

A descrição da invenção, detalhada, acima, e os exemplos aqui descritos foram apresentados apenas com as finalidades de ilustração e descrição e não como limitação. Portanto, é considerado que a presente invenção compreende
5 quaisquer e todas as modificações, variações ou equivalentes compreendidos no escopo dos princípios subjacentes básicos revelados acima e aqui reivindicados.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

<120> CEPA BACTERIANA MODIFICADA E USO DA MESMA

<130> 13861/2008 - FCAV-Unesp.

<160> 5

<210> 1

<211> 24457

<212> DNA

<213> *Salmonella enterica sorovar Gallinarum*

<400> 1

caaggcgcag	tgccggaagc	accgatttga	atggaacggc	gagcaccggc	tggtgcgctt	60
taccgacgtg	cgccactatg	atgatgaagg	ctttccgcgc	cactcgtggc	gctatgagtt	120
cgataatggc	gtgaccaccc	tatatccctg	tccgacgcga	aaatcctcag	tatcaagcct	180
tctgataatc	cctttaagct	gacgattctt	cacggtcggt	atctgcttgt	taatccgggc	240
ttgtgggtcc	aggcgctcaa	ggagcgtgaa	gtgcggcgca	atgttttcgc	cttccggcgc	300
gtttccctgac	gtagacgcga	ttatcggcga	caggtctccg	gcgatgggtga	tgaagccgcg	360
gcacaataag	gccttaacgg	gatacagaac	cgctcccgcc	taaggcttca	ttcagccact	420
ttccatatca	cataaatacg	cctcttccgc	tcctgtccag	cagcaggcga	cagctcattt	480
cgttagcgaa	acggtggctc	attaaacgtg	cgtaattttac	gtgagtgcga	acgatcacct	540
tctgcgcgta	gtaaatcaat	agcacgaata	ccaatttgca	aatgtttctga	aatagccccc	600
tcataaaacc	ggtttgctcg	cccgggcagt	ttaatttcac	cgtgtaaagg	ttgtcagaa	660
acacaaagca	gcgtgccgta	aggcacgcgg	aagcgatagc	cctgggctgc	aatcgtcgcg	720
ctctccatat	caatcgcgac	cgcgcggcta	aggttgaatc	gcagcgcgca	tgcggaataa	780
cgaagctccc	agttacgatc	atccgtgggt	acgaccgttc	ccgtgcgcag	tcgctgtttc	840
acctcttcac	cgggcattcc	gctaaccgct	ttgttgccgt	cgtacagcgc	acgctgtact	900
tccgcaatgc	ttggaatagg	aatatcaggc	ggcagaacgg	catccagcac	atgatcatcg	960
cgtaagtagg	catgggcccag	cacataatca	ccaatcgctt	gactttctcg	taaccctcca	1020
cagtgcceca	tcataagcca	gacgtcaggc	cgcaacacgg	ccaaatggtc	gcaaatacgtt	1080
ttagcatttg	aaggggccgac	accgatattt	accagcgtaa	tccccgtccc	atctgccgtt	1140
accaggtgcc	aggcgggcat	ctgatgcttc	ttccaggcca	gatcggaaat	agcctcttcc	1200
ggcgcttccg	tttctgccgt	gatccaaatt	ccgccggcac	aggaaagcgc	gatataggga	1260
ctgtcaggat	caagaatttg	gctgcatccc	cagcgcacaa	actcatcgac	atagcgggtg	1320
tagttggtaa	acaaaacgaa	gggctgaaaa	tggtcaaccg	gcgtaccggt	atagtgcctg	1380
aaccggggcca	acgagaagtc	aacacgacgc	gcgtcggaat	gcgatagcgg	atagaattcg	1440
ccgggggtgga	acagaccgtc	tgccgtctca	tcgccaatct	gcgccagttc	tgtggttagga	1500
aatggcgcg	ttagcccggc	gctcatagaa	cgatccagcg	tcagagccga	gccatcgatc	1560
acataaggat	acgggatctc	atggtgcgag	gcctctaccg	caatatgcgc	gccataatca	1620
tggtaaacga	ggttaagctg	ttccagaaga	taagcgcgaa	atagcgcagg	ccgcgtaacg	1680
gtagtggat	aacagccggg	atgagtaaag	cgtccaaaag	cgcgtgtttt	aggcgggttc	1740
gggtcgcgcg	catcccgact	tacagacagc	gaaggtataa	caaacagttc	gttaagcctg	1800
gcgtggggat	cgggcagcgt	accgttatca	acatagtcag	cgatggcttc	acggagcgcg	1860
ttaaccgact	gctcgtatag	ctcctccagg	cgatccagcg	cctgctcggg	cgttagggtt	1920
gtgcctttat	tttccatatt	attctcctta	gcgttcacag	gtgaggcacg	tcattcgata	1980
gtatgacagc	aaaggaggaa	actaaagggg	ttagcgtaa	ggtggcgaca	gtaaaataga	2040
accctttaaa	aagaaaagag	aactatctta	gcgccaccat	catcgctcaa	aaagaagggt	2100
actggtagac	ccatttggtta	agttcattac	aattagtcac	ataaccattt	cccggctttt	2160
gctgactcga	tcagcatgct	gatagtga	tctgggacgg	gtacaggttc	cgttttcttg	2220
aacggatgcc	atgaaaaagg	gtgattagga	aaatagggtt	ctattctgaa	gttacctcgc	2280
togacattga	gttcctcgaa	gaattttatt	atgagatctt	cggcttcaag	ttcatcaatg	2340
ctcagatcag	tatcaaggct	aatctctggt	gttaattcca	cttgctta	gttgaaaaga	2400
tatgtgccag	cataaggccg	tacaagctcg	taaacttgct	gttcaatatt	gtctaccata	2460
acttatcatt	ggcccagaga	atggtattgt	agtcgcgtat	agtgcaatat	gttatttggt	2520
acacatctgc	ggcaaggata	atttcccaga	tcaaaggaa	ggaacgtcca	acaaacggcg	2580
caatgttacg	aaccataaca	cgtctggctg	tccatggggg	gtaaccgcct	aaccatgtcg	2640
gaagggatat	tccaaaggga	aattttgact	ttttaaacac	tgcacgtgca	gtcctggacg	2700
cgtatgatgt	gccttttagtc	gctccagcgg	gtttcgcctt	tgtccaaaga	ttattacgac	2760
ctgatgccaa	agcaacaaca	gccccgaaat	ctgcaacacc	aatcccaaac	tggttgccgg	2820
tattctcaca	aaaaatcata	acagaagttc	ggcagcagtc	agattggatt	ttcctgcata	2880
gaagtatggt	ccatttagtt	cttctactgt	atccattaga	aactctatag	ttactatttt	2940
ggtttactta	ttgtacatcc	ttgtttcgaa	tgaagaaat	caatcttttg	ggaaagaacg	3000
gatcaagatc	actggaaata	tctgaaatca	gatgaaagag	acagtcgcga	ttcccaccag	3060
gggcatcacc	tggcaagctt	gtgtgatcgc	tccgtttgaa	ccgaacacat	ctatatgtca	3120

gcatactgat	acggggttga	tcttgccgat	agcgggtatcg	gttaatgcc	tacgtagggg	3180
ctccattttc	tcagcgaacc	gtgaagcctc	cgattaagcc	cccaaaaacc	atggatgtca	3240
aaaaaccccg	taaaccctct	caggtaaac	gggtaaagat	aatttatgt	tttttaaacg	3300
tctccggact	caccaggata	tcccgaact	aaaatctggc	tcctctgact	ggactcgaac	3360
cagtgcata	cggattaaca	gtccgccgtt	ctaccgactg	aactacagag	gaatcgtgtg	3420
aacggggcga	atattaacga	ggtgcccctg	gcttgctaaa	gcctgttttc	acaaaaaaag	3480
ttcgtttgct	gctttattcc	acacttcggt	taaaattcac	cgtttcctga	tgattttcac	3540
agcaaaaagc	gcttactccc	tctttacgcg	cgggtatctc	cacagccagc	gcccgtttat	3600
cagacgccag	taaaacagtg	cgccacgcac	ggcccagtc	agaaacatcc	ccagccaaac	3660
ccctacaacc	cccataccca	gcacaatacc	aagcgtatac	cctgccacaa	cgcgacagcc	3720
ccacatcccc	agcatcgata	cccacatcgc	aaatcgca	tcgcgcgcgc	ctttaaaacc	3780
cgcagggcaac	accacgcg	cgcgcacaa	tggcataaag	gcagcattaa	gccagagcag	3840
aactttcact	acctctttta	cgctctgctc	ctgggtataa	aatgaggcaa	acagaccgcg	3900
aaacggcgcc	gtccccag	caattgccgt	aagtacgata	gtcgacatcc	agaatacatg	3960
gcgcagttga	cgctctgcct	gaccaatttg	cccggtacca	agacgcttac	cggtgataat	4020
agtcgacgcc	gaaccaagg	ggttaccg	cagggtgata	agcgcgcgca	cggaaaaagg	4080
aataaagtta	cccgaataa	cgttagtgc	cattccggcg	acaaacattt	gcgtcagtag	4140
cttgccaccg	ttgaacagca	ctgattcaat	gctcgccgga	ataccgatac	ccatcacttc	4200
ccagataatg	ccgaaattca	gcggcttcag	atagcttttc	agcggaaatgc	gcagcgcggg	4260
attaaaccga	atcatcagca	cccaaataat	cgctaccg	ccgatgtagc	gcgaaatggt	4320
taatcccagc	cccgcgcg	caaaaccag	cccttgcag	gagaaagccc	cgtaaatcag	4380
gatgctgctg	ataataatat	tgagaatgtt	catcccgccg	ttaatcatca	acgggatttt	4440
cgtattccct	gccccacgca	gcgcgcgcgt	accgattagc	gcaattgccg	cagccggata	4500
actcagcacc	gtcagttcaa	ggtacgttaa	cgccagcccc	tttacttctg	gcgtcgcctc	4560
gcctgcgaca	atattaataa	tttactgcc	gaaataatga	atgaccactg	ccagcacaac	4620
ggcaaatagc	gtcataatca	ccagcgactg	gcgcgcgcgc	gcccttgccg	gtcgcctgtc	4680
gcgcttgccg	aggctaaagg	cgaccaccac	cgtagtacca	agatcgatag	ccgcaaaaaa	4740
agccataatt	agcatattaa	aactgtcg	aagccccacg	cccgcatttg	cttccttgcc	4800
cagccaactg	acgagaaaa	tactgagcac	gcccattagc	aaaacacagg	tattttccag	4860
aaaaataggg	atagcaagt	gggtgatttc	acgccagaac	aacactttgt	agctcttgcg	4920
tttggcatac	cagggcgtag	ggacgacagc	ctggcgtaag	gcagtgagag	cgttcaaaat	4980
ggaccttaaa	gaagagagtt	gaaaccacat	ttcaataatg	agcgagaaat	cgtaaggctg	5040
caaagctttt	tgcaaaaaa	atgtctgcaa	atgcaacaaa	gtgatgagat	aaccgcgaat	5100
cgaatctgta	agaggttaaa	tggggtttga	caaaaatttt	tccgcccgtc	atatacgacc	5160
ccacacgatt	cctctgtagt	tcagtcggta	gaacggcgga	ctgttaatcc	gtatgtcact	5220
ggttcagagc	cagtcagagg	agccagattt	tagtttcggg	acatcccagc	gagtcagag	5280
acgtttaaaa	aaacaagaac	ttatctttac	ccggttgacc	tgataaggtc	taccgggttt	5340
cttgacatcc	atagttttta	ggggccta	cgggggcctc	acggttcgct	gagaaaaatg	5400
agccccgtgc	atgacactca	ctactaatac	agatactcca	gccccatgaa	accagcaatg	5460
cgcagggata	tttaaaaggc	agccctgccc	gcgctaagt	tgaccggcat	tccggaacgg	5520
cgctccagca	cctcattaac	ccgcgaagta	tcaacgtcat	cccctttgat	aaacgtgcgc	5580
agcactggcg	taacgggcaa	tggaactttt	ttgtctgact	caaattcagc	acggttgcca	5640
gaaagcggtt	cgtgtacctc	cagccaacga	ctgccatccg	gctctaccga	aaatttaacg	5700
ggcctgtcga	taatctgaac	gcgggttcct	acaggaacat	ggtcgaataa	atatttaata	5760
tcgtctatgc	gtaaacggat	acagccctga	ctgacgcgaa	ggccaatgcc	aaagttagcg	5820
ttagtgccat	ggatggcata	taacctgccg	atatatatgt	cgtatagccc	catagggtta	5880
tccggccccg	cagggcaccat	cgcgggcagc	gtttttccct	ctttagcata	ttcccgacgc	5940
gtattagccg	ttggcaccca	aaccgggcca	tcttgtttgc	gttcaaccgc	agttaccag	6000
ttgcgcggcg	tttcacggcc	agcctgacca	ataccaatag	gtagcacctc	aaccgtattc	6060
gtgcctgcg	gataataata	aaggcgcac	tcggcgacgt	ttaccacaat	accttcacga	6120
acggtgtcga	gcagaatcaa	ctgctgcggc	accaccagtg	tggaaccaga	ctgaggtaaa	6180
aacacatcca	cgccgggatt	cgcttcaagc	atattactca	gcccttgacc	gtagcggcg	6240
gcaaatgact	ctaagggtg	agtattgttc	tgcggtacgg	cgattgtgac	aggctgtcct	6300
accagacgac	tgcttcggg	cggaacggga	tagcttatag	ccagcgagaa	atggcttacc	6360
aacaagacga	aaaacggaaa	aaaagggtg	atacgcgca	ttatatccct	tcctttgtcg	6420
cggcaggtgt	gcgttaagta	tagctttttt	ctcacatggc	tggtgttgtg	cgccccgggt	6480
atgttgcggt	tgctttcccc	tccggcagga	caatattact	ggccgccaac	tccccatgt	6540
tggtggaacat	ggcgacgcg	gcttccacga	tcggcatcgc	cagcgccgcg	ccgcttcctt	6600
cacctaacgc	catcgccata	tgcaaatagg	gttccataga	caaatgcgcg	agcgcgatgc	6660
gggcgccttt	ttccgcgcaa	aagtgcgacg	ggatcagata	aggtctcacc	gcaggcgcaa	6720
tctgacaggc	cgcacgcgct	gccgagtagg	aaagaaaagg	atccagcaat	acgggttaagc	6780
cacaccttgc	cgcgcgaagc	atcacgcggg	tcaccccgac	cagatcaaaa	ccaccacact	6840
tcgacaacac	atcaatgccg	tcgcgcggat	tggtgtgatt	aatcgcaatc	gcccgcgcga	6900
cgcgtccac	tttattatcg	atgcgggaag	gcggaagatt	cgcgcgaatc	cccaccacct	6960
cttttgcatc	acttcctgta	aaaacgctga	ccatcgcggc	ggctggcgta	gtgttcgcca	7020
ttccagctc	ccctacgcca	aataaggtca	cgcgcggttg	cgccaggtcg	caggtgtagc	7080
gggaaacctc	cagcaaaaagc	gcctcagcct	gcaagcgact	catcgccggg	ccaacgcgaa	7140
tattttccgca	gcccgcgcgcg	acgcgcata	taactacgcc	aggaataggt	tcggcatcaa	7200

taccgacatc	aatgacatgc	accttcgcac	cggcctgagc	ggcaagcacg	catacgccgg	7260
ttgttccccg	cgatcatatc	gcccctgaa	tcgcccgcac	gattttgggc	gaaaccgcta	7320
cgcttcatc	ccagacgcca	tggtcggcg	acatcaccag	caccgccttt	tcacctacct	7380
gcgcggtacc	gttaagaccc	ggcatacccg	cgagctgaac	ggctaagggt	tccagtctgc	7440
ccaggctgcc	cggcggtttg	agcaggccgt	caatatgttg	ctgcgcacgc	gccatcgcc	7500
cggcgctccg	cgcaggaatg	tcacggagta	aagcgtgtag	tgtctgcata	agatgtctcg	7560
tccgtaataa	tcggctcata	acagagccag	cagaaagatc	aattcaccaa	gttcgatcgc	7620
cgcgcccagc	gtatcgccgg	tttgaccgcc	aagcgtacgt	ttaagcaact	ggccaaggat	7680
gaaaatcgcc	gcgcattgtg	ccaccattgc	ggccaacct	tgcataccag	gcagtaatac	7740
cgtggcgacg	attaccgcca	atcccagagt	aatgcagggt	tgccgtccgc	tgactttacc	7800
gataaataca	ttgccaagcc	cctcttcacg	ggcgtagcga	tgacggtaca	tcaataaaac	7860
ggcgctgccg	cgtccggccg	cacaggccgc	cgccaacgcc	gccaacattg	gcgttccacg	7920
taacgccagt	tcgctgacca	ccagaatgtt	tgccagtagc	acaaaaataa	gcgccagccc	7980
gccatgggtt	cccagacgac	tatcacgcat	aatctccagc	attcgctcac	atgagggaag	8040
cggtgatcgc	cgaagtatcg	actcaactat	cagaggtagt	tgcgctcatc	gagcgccatc	8100
tcgaaccgac	gttgctggcc	gtacatttgt	acggctccgc	agtggatggc	ggcctgaagc	8160
cacacagtga	tattgatttg	ctggttacgg	tgaccgtaag	gcttgatgaa	acaacgcggc	8220
gagctttgat	caacgacctt	ttggaaactt	cggcttcccc	tgagagagc	gagattctcc	8280
gcgctgtaga	agtcaccatt	gttggtcacg	acgacatcat	tccgtggcgt	tatccagcta	8340
agcgcgaaat	gcaatttgga	gaatggcagc	gcaatgacat	tcttgagggt	atcttcgagc	8400
cagccagcat	cgacattgat	ctggctatct	tgctgacaaa	agcaagagaa	catagcgttg	8460
ccttggtagg	tcacgcggcg	gaggaactct	ttgatccggg	tcctgaacag	gatctatttg	8520
aggcgctaaa	tgaacacctt	acgctatgga	actcgccgcc	cgactggggt	ggcgatgagc	8580
gaaatgtagt	gcttacgttg	tcccgcattt	ggtacagcgc	agtaaccggc	agaatcgcg	8640
cgaaggatgt	cgtgcgcgac	tgggcaatgg	agcgccgtgc	ggcccagtat	cagcccgta	8700
tacttgaagc	tagacaggct	tatcttggac	aagaagaaga	tcgcttggcc	tcgcgcgacg	8760
atcagttgga	agaatttggt	cactacgtga	aaggcgagat	caccaaggta	gtcggcaaat	8820
aaggaaaaaa	tgccatcgca	ggtatcgcc	agcccccca	ggcgccagcg	ccagaataca	8880
gaacaacgcc	gctagcggaa	taccacacca	gggttgacgg	aggatgaaaa	tcaggccgct	8940
tacgcccccc	agaatcaacc	cgataaagg	aaacatcacg	atcccacgcg	aatactgctc	9000
gaaatccagt	ccctgcgacc	agcgtgacgg	cacgggcaag	cggctaataa	aagcgagcat	9060
ggcccaaaaac	agcttactca	tttaattttg	actccaatac	ctgagactac	cagccagacc	9120
tcactcgccg	ctgcccggag	tcgttggttg	accgcagccg	caatatcacg	aaaatggcgc	9180
gcccagacgt	tttccgggac	gatccccatt	cccacctcat	ttgtcaccag	taccactttc	9240
gcccggcgac	gctggcaggc	tgcaattaaa	atctgaattt	catcgtaaat	ggcgcgctcc	9300
atcgccgcgt	aatcccactg	ttcgggatcg	ttctgcctc	ccagcgcaaa	cagcagattc	9360
gtcaccatgg	tggtaataca	ttccagcaaa	atcgcgctgt	caggggcaag	atccgcggta	9420
atcaacgtat	caagatgccg	ccagcattct	gcggtccgcc	agtgtgccgg	cctgccatct	9480
ttatgatgct	gaattctcgc	cgccatctcg	tcatacaaga	tctgcgagg	ggcgatatac	9540
agtacctgcg	gcgcattcgc	aattaaggct	tcagcatgac	ggcttttacc	actacgtgcc	9600
ccgcccgtca	ccagaatcat	cataccgct	cctgatgttg	ttgcatgatg	gtataaattt	9660
tatcaatata	aatatgttgc	cgcacgcctt	ccgcccagc	atcaaattgc	cgcgctttat	9720
gatccgcata	acaaaaagtc	gtttccacg	gcgcaagccc	cttccgcgcc	cgtaacccat	9780
tgaccaccgc	acgggtaaa	gcacgcgtgt	caaacaggcc	gtgaaggtaa	gtgcaaaacg	9840
ccagtcgcgc	ggcgggtgac	gcgccatccg	ccacagagca	tccatttttc	tgtaacgtca	9900
tgcccgatac	gcactcttcc	tgacgacccg	tttcccccat	gtgaatttca	taaccgcgta	9960
ccggtagccc	gcgcgcggca	gcccagccagc	cgggcagctc	gcctgacatt	gtcgcgttaa	10020
cctgcgtcgt	ggttttatcc	tgtgcaaagc	gagtgattgt	attaagcagc	cccaggcccc	10080
gctgcgtacc	cagccccgac	tccacctcat	ccacaatggt	gtcgcgccagc	atctggtagc	10140
cgcgcgaaat	ccccatcacc	ggcacgccct	gcccgtgtgt	ctgcaatacc	gcacccgcca	10200
tcccgttttc	gcgcagccag	gcgaggtcgc	tcagcgtatt	cttactgccc	ggcaggatca	10260
ccagatcaac	gtcagtcaac	gcttccgggc	ggcgaatata	gcgtatgcgc	acatccggct	10320
gcgcgcgacg	agcgttaaaa	tccgtaaagt	tagaaatatg	tggcagttgc	acaatggcaa	10380
tagtgatata	acggggggcg	ttaccgcgat	atttatcggt	ttgcagcgcg	acgccatctt	10440
catcttccag	atccacatcc	agccacggca	tcactcccag	gaccgggacg	ccggtaagcg	10500
attcgatttg	ttcgataccg	gaatagagta	gcgccacgct	gcccgcggaat	ttgttgataa	10560
tgacgcccct	tactctgtca	cgctcctgtt	tatgcagcag	cgcagcggtg	ccataaatag	10620
cggcgaatac	gcccggcccg	tcgatatccg	ccaccagaat	aaccggacac	tgggccattt	10680
ccgccattcc	catattgacg	atatcgcgat	cgcgcagatt	gatttccgcc	gggcttccgg	10740
cgccttccag	cacaataacg	tcataattct	gcgccaggct	gttatagacc	gcaaggattt	10800
gctcacgcaa	acgcggttta	tagtcatggt	aactaacgcg	atccatattg	gtcgcacatt	10860
tccccatcag	cacgacctgc	gcctggcgat	cgctggctcg	tttgagcagc	accgggttca	10920
tacgcacatc	tggcgtgatc	cccgcggctt	ccgcctgaaa	aatttgcgcc	cgccccatct	10980
ctttaccatc	cggcgtaata	ccagaattaa	gcgcgatatt	ttgcgattta	aacggcgcg	11040
tacgcagacc	atcctgataa	aaaatgcggc	ataaacccgc	cgccagcaca	cttttgccga	11100
cgtcggatgc	cgtccccctgc	aacataactg	cctgcgtcat	gacgcctccc	tgaatgcgca	11160
cttttgcat	cgatgaaaaa	actccgttcc	tgttttacac	agcgcgagtc	ccagttgagt	11220
atgaagtttg	accagccagg	gctgggttag	ccccgcgtgt	tccatcgctt	ccgtacacgc	11280

gaaaacctcg	ccaggcgcg	catgctgag	gatctggccc	tggcgtaata	cgtatacggc	11340
atcgctaatt	ccataaataa	gatcgatata	atggctggat	ataatgacat	gattgcccctg	11400
cgccacaatc	cgcctgatga	tagcaatcat	ctgagtgcg	cctgcgggat	cgagaccagc	11460
agtgggttca	tccagcaata	gatagcgcg	ctgtagcacc	agcgctccgg	cgatagccac	11520
acgttttttt	tgcccatgac	tcaaactg	aatgggctga	tggcgaaaat	gttgggcgctc	11580
aaccagcggt	agcgctcgt	cgacgcggcg	cgtagtttcc	gcctccggca	cccccaaatt	11640
acgtaaaacta	aatgcaatat	cgctatcgat	atcagtataa	aaaatctgct	gttcagggtc	11700
ctgaaaaacc	gtcgcgaact	gctggcgag	cgccagtagt	ccgcgcttgc	tgtaatccag	11760
cggttttccc	tgcacaca	cggccccttt	ttgcgagcg	aacaagccgc	tcaggttcat	11820
aaaaagcgta	gacttcccac	agcgttccgc	gcccaccaa	ccggtaacag	gcgaaagcga	11880
aaaatccata	tttaaccctt	taagtaccgg	ctcattctga	taacgaaacc	acaggtctga	11940
agtggcaagc	ataatagtcc	ttacagggtga	aaatcaccct	gatacagttt	gatatccagc	12000
gtggtggtca	tttgctgata	acgcattaac	acccgcgtaa	acaggagtc	agccagcatc	12060
gccagagatc	gatagccgtt	cggcaggctg	caataaccaa	aacgcagcgt	ttgcgcacga	12120
cggattggcca	cgcctcatc	cagaagaata	aagagaaagc	gccacgttaa	caggatttgc	12180
tcggtaagca	ggcgtggaat	atgcgcgcgc	ttaagcaagc	taattaactg	cggaacgggt	12240
aggttcatca	ccagccacaa	cgtcgcggac	agcgcgctca	ggctacgcca	gaacgtttca	12300
ttcgccgtaa	ccacgcccgc	acgggtaatc	ccgatccagt	acggcccaac	agatatgcca	12360
gccagcagca	tttgcggtc	gcggtgatg	ctgaagataa	tcgttatcac	gccgaccaac	12420
aaaaatccaa	aaggtatcgc	catccatcga	caccagcgcc	agagggatat	gcgcaatagc	12480
caacagctca	atccggcaat	gatcagcagc	tcaatgccct	gccctacagg	cggcagaaca	12540
aacgccagta	tcacatcgc	cagccacagc	aaaaacttgc	gctgcggcgc	aacgtgtgcc	12600
cagcggcttt	gatagctgag	tcgatcaagc	ccggtcatca	cggcgttgtt	tacctttgca	12660
ataccccagg	atataaaaaa	tcaccgcccgc	gccaaagagag	ccctgaaggg	taaacagcag	12720
gctttcaatt	tcaccgctgg	caggttcata	taacgctgga	aaccagggtt	tatactgcgg	12780
cgcaatagcc	tgaatctggc	tttccgcttc	gccgtctgaa	ccgccatatt	caccgccatg	12840
gttaataaaa	aacggcagaa	tcaccagcgc	caccaccatc	gctaacaaca	tcaacgtttt	12900
tttcatttta	atgtccttgt	acggaatca	cttgccgttt	ggttaactgg	tcataaatca	12960
tgacggttaa	taaaccttca	gcaatggcga	caggaatctg	tgtgaggcag	aaaatcccca	13020
taaacttcac	aacagaccct	gtcgtcccg	catggggatc	gggaaacgca	acgccaaagt	13080
ggactgaagt	cacaaaatag	gtcgccaaat	ccgccagcat	cgcgcacaga	aaaacggcga	13140
catcacggcg	cagtcgggca	cggcaggcca	ttttccacac	cagataaccg	acaaccgggc	13200
caatcacccg	catcgacatt	ccatttgcg	caagcgtcgt	caggccaccg	tgccgcagca	13260
atagcgcctg	aaacaacagc	acaaccgcgc	cgagaatcgc	caccaccccg	ggcccgaaca	13320
agataaccgc	cagaccaacg	ccggtcggat	gtgaacaact	ccccgttacc	gacggaattt	13380
tgagcgcgga	caggacaaaa	ataaacgcgc	cgcacagcgc	cagcagtacc	ttctgatgat	13440
tatcctcctg	cacaatacgc	cgtaagcgca	ccagtccata	ccacaagcag	ggtaaaaaaca	13500
gtagccacca	ggccagcgcc	cacactggcg	gtaaaaagcc	ctccatgata	tgcatcgcaa	13560
acgcctgttg	cgggacaacc	atcagcaata	gcgctgcagc	cagtccactg	aaagacaact	13620
gtcggaagctg	ctgttcaagt	ttcattctgc	atactccac	tgtttattga	ccagaatggt	13680
cgaaaaatag	ggcaacggtc	gatcatcggt	gacctcgtgg	agatggcgcc	agcactgctc	13740
gccgggcagt	gtggcctcgg	acatcattaa	ggcgattcc	agcaggccag	cctgcgccag	13800
caaagcttta	atacgggcga	acggccata	cactttcatc	aacaccaggc	tatcatgctg	13860
ttgtagcgcc	tgggctat	ccgcttcgg	cgcggtacaa	gaaataaccg	ccagcgattg	13920
ccgttctatg	tccagcgcca	ttttcgcgcg	ggcgctatc	gcggcgaaag	acgtgacgcc	13980
ggggacaatc	tcagccact	ccgggcagcc	gattcgttgg	agtaaaaaaa	tccaggtact	14040
gaatagcatc	gcacgcccc	gggtaataaa	accgacctgt	ttaccgcgtt	ccacctctgc	14100
ggtaagcgcg	gcggcaacct	cgttccagac	cgcttctttc	tcggcgccgt	cagcgctcat	14160
agggaaatgg	caacaacgta	cttcgctctg	ctcgccgaga	tagtcgcgca	caatcgacag	14220
cgccagacta	tcgccccctt	tacgaccggc	gggcgcatac	agaatgtcca	gcgagccaag	14280
aatccgcgct	gcgcggagcg	ttatcaggtc	gggcgcgctt	ggcccgttac	ttaatgcgta	14340
taattttaccg	ttcatgccgc	ctcctctacc	gccatgttca	gcgcctggtg	caaatgcgcg	14400
acaaacatcg	cccggatagc	cgggttttct	cccagcccgc	tcagccacgg	cgtcgccgga	14460
atgcccgcgg	cgttaaagcg	cattttccat	gagtcgcccgt	cgtctgaagc	catatcatta	14520
atggcgtgat	cgcccgccac	cagcattaat	ggcatcaaat	gtacgcccgt	gacgccttcg	14580
tcacgcaggc	tgctgatcag	gatgtcgacc	tccgggtagc	tttctacggc	gccgacgcgc	14640
gccggaaagc	gctgcggcgt	catcatatga	tcgagacagg	cataagctgc	gaatgcgtga	14700
ttggttcgcg	cgtggcccat	aaaaacgact	ttctccgttt	gtctgagcga	tggcatctgt	14760
tgctcgcaacg	cctgcattag	ctgcacataa	tcgttatggc	tgctcaacag	cggcacgccc	14820
agcgtcaggc	gagtgaataa	cggacgcaag	agttgtactt	cacggacaat	tttttcatat	14880
tcgtcgccgt	taataatgtg	caacgactga	atcgccacgt	cctgatatcc	ctgtgcggca	14940
agcttttgca	aagcctgtaa	tggcgtatcg	atgtcgatac	cgtcacgctg	gcgaagcttg	15000
cgaatgatca	ttccggaaagt	gaaggcgcg	aacaggtcgc	gacgaggaca	ggacgcccgc	15060
agatgcagtt	cgcagccac	aatgtttttt	tcacaggtgt	cgtgatagct	ggtgccaaaa	15120
ctgaccacca	gaagcgcttt	tttcattttt	actccttagc	tgccggccagc	cagcgcgata	15180
aacgctgcgc	aaaggcggcc	tggttttcca	gtaactcatc	acccgtcaca	agcggcgctcg	15240
ggcgcgcaat	aacgatgcaa	ggaatgcccg	catccagaca	gggctgaact	ttttcctgat	15300
atccccctc	cgcgcgggac	gctttggtaa	tgaccacgtc	ggcccgccac	tggtggtaaa	15360

acgcggcggtt	aaaatcagcg	ctgaacggcc	cacacagagc	gaaaattttct	ccaacgcccga	15420
accccagttc	gctgcagcgt	tgaatcacct	ccgccacggg	cagtagcgcg	gccagcaacg	15480
ttttttccgc	cagcccggca	cgccagacgg	ccagatcttt	actgccggtc	gtcagtaaca	15540
cgcgcggaac	aaaacgcctc	gctatctcgc	aggcatcggc	aatactgcgc	gccgtataga	15600
gaagcggatg	cgtcagattg	ctaagctgct	ccggacgctg	ataacgactt	aacaacacgc	15660
ctgccgtttc	acaggcgcg	aggaggttat	ggctgaccat	ttctgcataa	ggatgcgatg	15720
catctattac	ccagcgagta	cggttttctt	ttagccaggc	gaccatctgc	ccgtactcca	15780
gacgaccaca	gcgcacctgc	cctttaatgt	cgcccgcag	cgcttttccg	gctggcgctg	15840
ccacggataa	ggtgtacgcg	acgttcgccg	catccagttg	tcggcataac	gcgcgcgc	15900
cgtggtgccc	gcccaccacc	agcacatccc	cctcattcac	agcgtgtaac	ctcgcggcgt	15960
tatcatcagc	ccatcctgaa	cataggtcgt	tttattacca	acgatgacca	gactggatcat	16020
atctaccggg	tcaaaatcca	tatcgccgag	cgtagtacgc	catttttcc	ctttcttacg	16080
tccggcggtt	ttcaccacgc	caaccggcgt	ttgcgcgctt	ttactggcgg	caagcaggtc	16140
aaacgcgcgc	gccagatgcc	cttcgcggcc	gcggctgcgc	gggttgtaaa	aacagataac	16200
aaagtctgcc	tctccggcgg	caacaatacg	tttttcaatt	accggccacg	gggtcagcag	16260
gtcgctgagg	ctgatattgac	agaagtctgt	catcagcggc	gcaccagca	gcgagcggc	16320
tgcgatactg	gcggtcatcc	ccggaataag	gcgaacctct	acatccagct	tctgcttgct	16380
caccagctcc	agcaccagtc	ccgccatgcc	gtaaataccg	gcgtcgccgc	tgctaatacag	16440
cgccacgtta	tgcccggcct	gcgccagctc	aatcgccgcc	tggcagcggt	caatctctct	16500
gcacatcccc	gttttgatca	cctgcttate	gccggtaaa	gctttcacca	ggtgggtgta	16560
ggttttataa	ccgagcagca	tttcgcgcgc	ctgaagcgcc	tcaatcgctt	ccatcgctcat	16620
cattgcctgc	gaaccggggc	caataccaat	tacgctcaac	atcagtgtgc	aactcctaaa	16680
gtaatagtga	cgccctgttc	tcgcagggtc	tcgcctaaca	attgtccctg	gcttaataac	16740
cacgctgccg	ggccgggatac	gctgccaacg	cccaccggtt	ttctgacgaa	gccagaaccg	16800
ggaaaatggt	gttcgaattc	gcgtaacgct	tcggcggtaa	aggttttaaa	aggcagcgcg	16860
cagcaggagg	cgagctgaat	aagccccggc	tccccctttt	tgagcgtgac	gctgccaatc	16920
gcttttaacg	ccagcggatc	gagttttctg	gcttcaagct	ggcgcgccag	taatgtcgct	16980
aacaggggaa	atggcggtatc	gcggcgccag	ccaattcccg	ccaccacgcg	ctggggcacc	17040
agtttccagt	gcggtacggg	aagctcaggg	aggctattac	gcaaagagac	gcagataagc	17100
gcatccagtt	caggcagccg	ctgcaaatca	tcaacaggga	taaaaccgcg	aatatcacac	17160
tggccgatct	cttcggttag	ttcggcatcc	caccataacc	ccacacgttg	atgactgacc	17220
aacatctggt	taacggtttt	taccgccgtt	cgaagatcgg	acatgcgggc	gttaagctgg	17280
aaagctaagg	tgtccaacgc	ggacatctca	ttgacatccg	ttgccgtggt	aatcaccgga	17340
tcggcgctcg	atcttcctgc	caggtagcgc	gtcaaggcat	tggccccgcc	cgcatgaccg	17400
gaaagcaggc	taatgacatg	ctgacctcgt	tcataaatga	cgaccaccgc	cggatcgctg	17460
aacttgctcg	tactaaccg	cgccaggaca	cgaacggcaa	tgccggtcgc	gccgataaaa	17520
ataagcgcg	tataagtgg	aaaagcctgc	cggcggtat	tagcgaatcc	gccatcgaag	17580
ggaataaatc	cctcttcccg	cagtttttca	ctggttaaagc	aggttaacgg	cagcatcgcg	17640
gcgagtctct	ttgccagcgc	cacgccgcgc	ggcgctcagg	aaaacaacgc	aatggattca	17700
ggcttttacg	tattcatggc	taaagtccgc	tgcataaagt	cttgagttagt	gatactcctt	17760
accagaaaaa	ttcccgacca	ggattagcgc	cgtcttacgc	atgccagcat	cacgtacttt	17820
gtcgctaata	tccgctaacg	tgccgcgaac	ggtctgactt	tccggccagg	tagccttata	17880
aatgaccgcg	acaggcgtag	ttgccggata	accgccggca	atgagacgtt	ccgccacccg	17940
gtgaatacgc	tgaacggaga	gataaatcgc	catcgacgtc	tgggtgactg	cgaacgcctc	18000
cagttgtttc	cgcgccggta	ctggcgtagc	cccttccaga	cgggtaataa	tgagactctg	18060
cgatacttcg	ggtacggtat	attccacacc	cagctccgcc	gcagcgccga	gaaacgcgct	18120
gacgccaggc	atacctgcc	agtcgatacc	acggcgagtt	aactcctcgc	cttgctcacg	18180
tacggagccg	tacagcgaga	catcgcccgt	ttgcaaacgc	accaccgttt	ttccgcctt	18240
cacgcccgcc	gccatcagct	cgataatctg	ctcaagatgc	agttcggcgc	tgctcgtagc	18300
ttctgcctgc	gcggggcagt	aatccagcag	ttcgggtattg	atcagcgaac	cggcatagat	18360
aactacctgc	gcctgttgca	gcaggcggtg	gcctttaagc	gtgatcagct	cgcatcgcc	18420
cggcccgggc	ccgacgaacc	atacacagcg	tggatcaaat	gtctctgaca	tggttttctt	18480
ccttctgaca	ggcgataaca	aaaacaggat	tggtcggttt	gaaatagtgc	cccgcctcca	18540
gcggcggtta	cgatgaaagc	tgaagctgta	cacagtcctc	tcgacatgcg	ccgatgtgcg	18600
caagatgcgc	cagcgcgcta	tgaaggtttt	cctgcaagat	aaaggctatc	accagacggc	18660
caccggggtg	cagatggccc	atcgcccagt	caatcagcgc	cgtcagatgt	ccgccgctgc	18720
cgcccataaa	caccgcacgc	gcttttcccg	ttatggtcat	tggcgcttcg	ccggggagaa	18780
tatcgattat	gcgcgaggca	aagcgctgac	gattctcatc	aagcagcgt	agtgcgcgag	18840
gattacgctc	gatagcgctc	acctgcaacg	aaggaaattg	cagcgccgct	tcaattgaga	18900
cgcttcccg	tcccgccccg	acgtcaatca	ggtgactggc	gcggtggagc	tcaagtttcg	18960
acagtgccag	cgcccgtagc	gcctcttttg	tcattggcac	gttctcgccg	cgcagaaaaa	19020
gctcatcttt	catcaaggat	caccactgca	ttcatttcat	agtcggcggt	gaccgcaactg	19080
acgggtatcg	agtggatccg	ctcattttcc	atcgccagat	tttcaccaat	caccattaa	19140
cgatgccttc	tgccccgcgc	gaccagttcc	cgcgcgattt	ctcgcggccc	gcagcgggca	19200
tccgtgacca	tgcccacttt	gcgatgggtc	gctaactgct	cgaagctgac	gcaacgaccg	19260
tggctactgg	tcaaccacat	gtcattcata	tcaattccag	cctgtgcgca	cagatactgt	19320
acggcgctga	tgccagggat	aatgcgaacc	tggtcgatgc	caaaatgcgc	caccagcggt	19380
gtaccgatgc	cataaaacag	cggatcgccg	gaggccagca	ccacgatccc	tttatcccca	19440

cgggcgggcaa	tccatgacaa	caacgcgcca	atatccgcgc	ccagcgtaaa	tcgttcgccc	19500
ccaaacgccc	gaaactgccc	caaatgccgt	ttaccgcctg	ccagcgcatc	ggcgtggctc	19560
atcgcttcca	gcgcgcgagg	cgctcatcaa	tgccgtccag	cgggcccat	tcccacgacc	19620
gttagcattg	cagctcctta	gcaatctcgt	cgacgggacg	attactgccg	agaatatggt	19680
tatcaaaaaga	aaacaggatg	gcgtcgcaga	caggcgggcg	tttggtaaaa	cgcagcatct	19740
gcatgactcg	caaacaaaata	cgcttgga	gatggttata	gatatgcccg	aagccatatg	19800
cttcaatgtg	ctccattgcc	gcttcgggtg	tatcgcaatc	gctgaccagg	gtgagtaact	19860
ccagcgggcg	gcccagtaaa	gctaaatgcg	cgaccagcgt	ttccatgccc	gcatcgga	19920
tatggctatg	ggtatgaaag	atcccggcg	cgattttgat	caattttcca	ggatgacca	19980
ccagcactat	ctggcaaaaat	cccagccgta	ccgcctcttc	aatcatgtag	ccgacaaaat	20040
tgctcatggt	gacgactgcc	tgtgtgtcga	cgcccatattg	ttcggaaca	aaccgttcgc	20100
cgtggttgcc	cggcacgagt	atcacccgcg	ttaatcctga	cgcccgtttg	atctccagtt	20160
ccagcgatag	cgagcgtttc	cagctttctt	ccgacatcgg	cgtcacaatg	ccggtagtgc	20220
caataatgga	aatgccgcca	agaatgccaa	gccgcgagtt	atacgttttt	tgcgcccgcg	20280
cttcgccttc	cggggcaaaa	atctccacat	cgccccacg	cgccgggccc	atcgcttcgc	20340
gcaccgctga	ctcaatggta	tggcgcgcg	tacgactgata	ggcggcgctc	ccgagcgga	20400
gtccaatccc	tttacgcgt	taccgtacca	taccttcgcc	gccagtga	gtaatctcac	20460
cgctgtcggt	gagcgtaacg	cgggcaaaaa	tcagcattcc	gtgcgtggca	tccacgtcat	20520
cgccgcatc	tttacgaatt	gcggtatcg	cctgctggcc	ttcaatgtgc	ggcgactcca	20580
cgttcaggca	tagcgtgacg	cccagcgcg	tgacgatgga	gacctgatga	atcagatgtt	20640
gacgtaatac	catcagcgcg	gcgacttttg	ccgcgcgcgt	cgcgaggaa	ccggtgggtat	20700
atcctttacg	taacgcttta	ccgtggtgcc	agaccggcgc	gtcaaaaaga	agctcgctca	20760
tcaggcctcc	cggaggtgat	agagcaacgc	attgacgata	gcggcagcca	cgttactgcc	20820
gcctttacgc	cctaacgcgg	caaccgcggg	gaaatggcta	tgggtgagt	cctctttgga	20880
ctccgcgcg	ccgacaaagc	ctaccgggtac	gcccaccacg	ccgctcaccg	tcacgttatg	20940
ttcaagcaaa	cggaacagg	ccgtcggcgc	attaccgaaa	acaaagagct	tgtttttctc	21000
ctcctcgcg	atagcgatat	cgacggcggc	cattgaacgg	gtaatcccct	gcgtttgtgc	21060
ggcgcgacc	acgcgcggat	cgctgatata	acagcgacac	tcgcccga	acgtcgccag	21120
taatctttta	ttaatgcgg	acagcgccat	cgtggtatcg	gtataataa	tgcacggatg	21180
gcgtaacgca	tcacaagct	gctccagcgc	atcgcgagag	aaccacaaaa	tgtccagcca	21240
gtcgaaatcg	gcggtggtat	gaataaccgc	cttgataatg	gcctcatgga	gcggactggc	21300
gaaacggtaa	tcaggacgcg	tttcgcgaat	aatgtcgcta	ataatggtga	aactgttggc	21360
ctcaatgggt	tggggctgct	ggatataatg	catactgtcg	tcctcaggcc	acgccagata	21420
acccgcaccg	cgccgcaatt	aacagcgcca	gcgccagggt	tgaagcgacc	cacatcaatc	21480
gaatcgttcg	ggaatattcg	tccacggaaa	tatcgcgctg	cgcgctgcct	atccagggct	21540
tgtccacacg	cgcccaaaag	tagttatttg	ggccaccgag	ctggattcct	aaggcgccg	21600
ccacacacgc	ttccgaccag	gcgcaatttg	ggctactgtg	gttataacg	tcacgcagc	21660
caatacgcag	cgcccgccaa	ccactcaggc	gacacagtcc	tgccgcaatg	cccagcaaca	21720
gccagctcag	tcgggcagga	agatagttcg	ctacgtcgtc	catacggg	ctgaccatac	21780
caatcgccc	gtatttttca	tgtttgtagc	ccaccattga	atccagggtg	ttgacggctt	21840
tgtaggccat	cgccagcggc	gcgcgcgca	gaaagaggaa	aaagagcggc	gcgataatgc	21900
cgtcaacggt	gttttctgca	accgtttcca	ccacggcgcc	attgatctgc	gctggctgaa	21960
gttcgcgacg	atcgcgccc	acgatccagg	agagttttat	tcggctttcc	gcaaggctgt	22020
tcttccgtaa	cggtcgttca	acctcctgcg	cgcggtgggc	cagagagcgt	ccggccagcg	22080
tggtaaagat	catccagact	tcgacgctcc	agccaaacca	ggggtgaatc	cgctgcgcca	22140
gcgccagtac	gccccatgcc	acgccccagg	tcgccccgac	aaccacaacc	cacattacgc	22200
cgccgccaat	ccgcagcgct	ttatcgccgg	gacaatagcg	acgcacaata	cgctgcacaa	22260
acggtattaa	accactatc	cagcgtaccg	gatggggcca	gtgttgagg	tcgccgatga	22320
taaaatccag	caccagggcg	atacaccagg	caagaattcgt	cataatacgc	gctcgccg	22380
gccagccagt	gctgcaacat	ttccggacgc	tgggcgaaat	ggacgtgcag	atagctggca	22440
aacgtgttgc	ctgtctgcca	gccgccagtc	cattcctgta	acacgcggcc	atcgcgaa	22500
ttacgacagg	ccataacggc	gggtgtttcg	gggataaaat	ctgagtgtg	aaattcatgg	22560
ccgcgcacta	tctcgccagg	cgccgccaat	agcgttggct	gcatagcctg	cgctcacaa	22620
taaccaaagc	gggtgagtcg	cttaccatt	ttgctgtgac	cggggataat	attcgccatc	22680
tgtatgaattt	ccccgcgcgt	atcctccaga	gtgctcccca	gatacatcag	accaccacac	22740
tccgcgtaaa	tcgccacgcc	gcgctgatgc	gccgcccga	atatgagcca	tattcaacgg	22800
gaaacgtctt	gctcaaggcc	gcgattaaat	tccaacatgg	atgctgattt	atatgggtat	22860
aaatgggctc	gcgataatgt	cgggcaatca	ggtgcgacaa	tctatcgatt	gtatgggaag	22920
ccgatgccc	cagagttggt	tctgaaacat	ggcaaaggta	gcgttgccaa	tgatgttaca	22980
gatgagatgg	tcagactaaa	ctggctgacg	gaatttatgc	ctcttccgac	catcaagcat	23040
tttatccgta	ctcctgatga	tgcattggtta	ctcaccatcg	cgatcccagg	gaaaacagca	23100
ttccagggtat	tagaagaata	tcctgattca	ggtgaaaata	ttgttgatgc	gctggcagtg	23160
ttcctgcgcc	ggttgcatte	gattcctgtt	tgtaatgttc	cttttaacag	cgatcgcgta	23220
tttcgtctcg	ctcaggcgca	atcacgaatg	aataacggtt	tgggtgatgc	gagtgatttt	23280
gatgacgagc	gtaatggctg	gcctgttgaa	caagtctgga	aagaaatgca	taagctattg	23340
ccattctcac	cggattcagt	cgctactcat	ggtgatttct	cacttgataa	ccttattttt	23400
gacgagggga	aattaatagg	ttgtattgat	gttgagcag	tcggaatcgc	agaccgatc	23460
caggatcttg	ccatcctatg	gaactgcctc	ggtgagtttt	ctccttcatt	acagaaacgcg	23520

ctttttcaaa	aatatggtat	tgataatcct	gatatgaata	aattgcagtt	tcatttgatg	23580
ctcgaatgagt	ttttctaagg	cagtgaagcaa	taatgttcaa	tggcattttt	gaggagctga	23640
tagtgggcgt	cgctagtga	gcgattcaca	atcacgccc	cgaggttgag	ggtcgggtcg	23700
aagtgtgaa	atcccataac	ggtagccgca	agcgacgttg	aaacagcctt	gccgtccacc	23760
agtaggatga	ccgggcaacc	aagctgtttg	gccatcgcg	ctgtgctgca	gtaattgggg	23820
tcgacgccat	agccgtcata	caaccccatg	accccttcaa	tgacagcgat	atccgcctgc	23880
cgcatttggt	cgcaaaataa	ggcgttgaga	acaggaggag	gaagcatgaa	actgtcaaga	23940
ttacgggacg	ccacgccaca	gatagcggta	tgccagccgg	tatcaaggta	atctggccca	24000
actttaaacg	gctgtacg	cagcgcgcg	ttttgcagca	gcctcaacaa	accaagcgtc	24060
accgtgggtt	tgccgcaacc	gcttcctgtg	cctgcaagaa	taaatgcgtg	atgccttgcc	24120
gccattaccc	tgatcctgtt	caggggtgta	gggtatata	ggtacgcgca	tgttcagtct	24180
ttcgactgta	cgcgtcttcg	caacccactt	cccaccgaag	ttgttggtta	tcaccgacag	24240
gcaggtcttc	tggttagc	tcctcctcgc	ccgtccttcc	caatcttgcg	atcagtggtc	24300
tttacgggg	cgtcagcatc	acagcagcgg	gggtgcggg	ggattttcac	ccccttcctt	24360
accacaaatg	tggaacac	gttggtttac	gttatggctg	tacggcacac	ccataacgac	24420
aattaataat	gtgctacgtt	ttacatttct	gtgagca			24457

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<223> Primer 1 - Gene cobS

<400> 2

gagatctaga	acgaatctgc	tgtttgcgct	30
------------	------------	------------	----

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<223> Primer 4 - Gene cobS

<400> 3

agtctagaac	agaccagca	gaaagatc	28
------------	-----------	----------	----

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<223> Primer 1 - Gene cbiA

<400> 4

catctagaaa	ggcatcacgc	atttattc	28
------------	------------	----------	----

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<223> Primer 4 - Gene cbiA

<400> 5

tgtctagaca	gccagtgctg	caacattt	28
------------	------------	----------	----

REIVINDICAÇÕES

1. Cepa bacteriana modificada caracterizada pelo fato de ser identificada pela SEQ. ID No. 1.

2. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser defectiva quanto aos genes *cobS* e *cbiA*.

3. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser atenuada devido à deleção de ambos os genes *cobS* e *cbiA*.

4. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato da deleção ocorrer em um gene na parte I do óperon *cob*, onde o *cbiA* está localizado e um gene na parte III do óperon *cob*.

5. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato dos genes serem associados à produção de cobalamina em ambiente anaeróbico.

6. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser preparada por conjugação e transdução.

7. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ter sido preparada a partir de *Salmonella enterica* sorovar *Gallinarum*.

8. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato dos primers para detecção da deleção nos genes *cobS* serem os primer 1 (SEQ. ID No. 2) e primer 2 (SEQ. ID No. 3).

9. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato dos primers para detecção da deleção nos genes *cbiA* serem os primer 1 (SEQ. ID No. 4) e primer 2 (SEQ. ID No. 5).

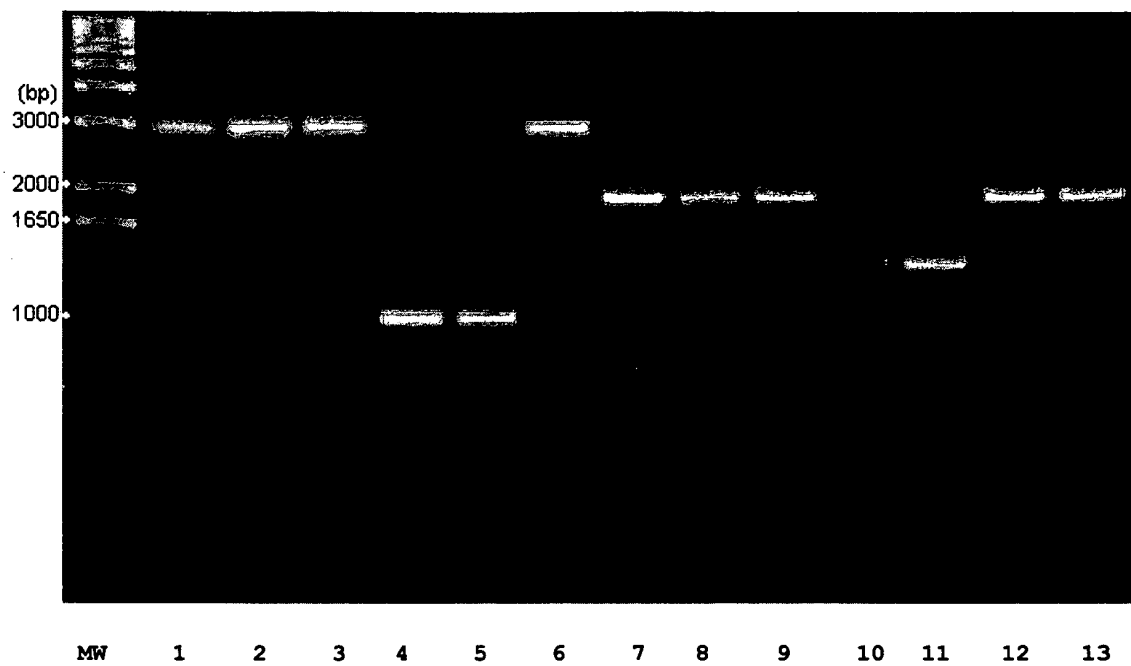
10. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser impossibilitada de ser excretada nas fezes.

11. Cepa bacteriana modificada, de acordo com a
5 reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser incapacitada de infectar humanos.

12. Cepa bacteriana modificada caracterizada pelo fato de ser conforme a amostra CECT 7632.

13. Uso da cepa bacteriana modificada conforme
10 definida em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de ser para produzir uma vacina para induzir proteção em aves contra a infecção pela cepa homóloga natural e cepa de Salmonella Enteritidis.

FIGURA 1



R100013-5

CEPA BACTERIANA MODIFICADA E USO DA MESMA

A presente invenção refere-se a um mutante de Salmonella Gallinarum defectivo quanto aos genes Cobs e CbiA (SGCobSCbiA), associados à produção de cobalamina pela
5 bactéria em condições anaeróbicas para uso como vacinas. A presente invenção refere-se, ainda, ao uso da referida cepa mutante de Salmonella Gallinarum para induzir proteção em aves contra a infecção pela cepa homóloga natural e cepa de Salmonella Enteritidis através de uma vacina.