

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VACINAS COMERCIAIS E ISOLADOS  
BRASILEIROS DE *SALMONELLA GALLINARUM***

**Autor: Priscilla Karina Vitor Koerich**

**Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do  
Nascimento**

**PORTO ALEGRE**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VACINAS COMERCIAIS E ISOLADOS  
BRASILEIROS DE *SALMONELLA GALLINARUM***

**Autor: Priscilla Karina Vitor Koerich**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Doutor em  
Ciências Veterinárias na área de Medicina  
Veterinária Preventiva.**

**Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do  
Nascimento**

**PORTO ALEGRE**

**2015**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

### CIP - Catalogação na Publicação

Koerich, Priscila Karina Vitor  
Caracterização de vacinas comerciais e isolados  
brasileiros de Salmonella Gallinarum / Priscila Karina  
Vitor Koerich. -- 2015.  
32 f.  
Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2015.

1. Salmonella Gallinarum. 2. Tifo Aviário. 3.  
Diagnóstico. 4. Vacina SG9R. 5. surtos. I. Nascimento,  
Vladimir Pinheiro do, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Priscilla Karina Vitor Koerich

**CARACTERIZAÇÃO DE VACINAS COMERCIAIS E ISOLADOS BRASILEIROS  
DE *SALMONELLA GALLINARUM***

Aprovada em 08 de abril de 2015.

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Luciana Ruschel

Universidade Federal de Passo Fundo - UPF

Membro da Comissão

---

Dr. Ivomar Oldoni

BRF S.A.

Membro da Comissão

## RESUMO

*Salmonella* enterica subespécie enterica do sorotipo Gallinarum pode causar doença sistêmica grave em galinhas e uma vacina viva de *Salmonella* Gallinarum 9R (SG9R) tem sido amplamente utilizada para controlar a doença. O objetivo do presente estudo foi determinar se a cepa 9R da vacina viva de *Salmonella* Gallinarum foi responsável por causar surtos de Tifo Aviário em lotes de galinhas de reprodutores de galinhas e perus, além de verificar a resistência antimicrobiana dos isolados dos surtos. A reação em cadeia da polimerase triplex, o teste antimicrobiano padrão, a identificação de genes de beta-lactamase e o sequenciamento completo do genoma pelo Ion Torrent PMG foram utilizados nos isolados de campo e na cepa vacinal de *S. Gallinarum*. Os 60 isolados testados não eram de origem vacinal e apresentaram alta resistência a medicamentos dos grupos de macrolídeos e quinolonas. O sequenciamento completo do genoma (WGS) e a análise de polimorfismo de nucleotídeo único em isolados selecionados para genes essenciais de *Salmonella* enterica confirmaram a origem selvagem desses isolados e mostraram duas possíveis fontes de *S. Gallinarum* nos surtos estudados. *S. Gallinarum* isoladas de surtos de Tifo Aviário no período estudado não foram causadas pelo uso da vacina viva SG9R. A fonte das cepas sequenciadas foi diversificada.

**Palavras-chave:** *Salmonella* Gallinarum, Tifo Aviário, diagnóstico, vacina SG9R, surtos.

## ABSTRACT

*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Gallinarum can cause severe systemic disease in chickens and a live *Salmonella* Gallinarum 9R vaccine (SG9R) has been used widely to control disease. The aim of the present study was to determine if the 9R-strain of the *Salmonella* Gallinarum live vaccine was responsible for having fowl typhoid outbreaks in chicken flocks from both chicken and turkey breeders as well as to verify the antimicrobial resistance of the isolates from the outbreaks. The triplex polymerase chain reaction, standard antimicrobial test, beta-lactamase genes identification and Ion Torrent PMG whole-genome sequence were used in the field isolates and in the vaccine strain of *S. Gallinarum*. The 60 tested isolates were not from vaccine origin and manifested high resistance to drugs from macrolide and quinolone groups. Whole-genome sequencing (WGS) and single nucleotide polymorphism analysis on selected isolates for core genes from *Salmonella enterica* confirmed the wild origin of these isolates and showed two possible sources of *S. Gallinarum* in the studied outbreaks. *S. Gallinarum* isolated from fowl typhoid outbreaks in the studied period were not caused using the SG9R live vaccine. The source of strains sequenced was diverse.

**Key Words:** *Salmonella* Gallinarum, fowl typhoid, diagnosis, SG9R vaccine, outbreaks.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Situação do Tifo Aviário na Saúde Pública</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Situação do Tifo Aviário no Mundo</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3</b>	<b>Etiologia</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4</b>	<b>Patogenia e Epidemiologia</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5</b>	<b>Sinais Clínicos</b> .....	<b>12</b>
<b>2.6</b>	<b>Alterações Anatomopatológicas</b> .....	<b>12</b>
<b>2.7</b>	<b>Alterações Histopatológicas</b> .....	<b>13</b>
<b>2.8</b>	<b>Tratamento e Prevenção</b> .....	<b>14</b>
<b>2.9</b>	<b>Vacinação</b> .....	<b>15</b>
<b>2.10</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	<b>15</b>
<b>2.11</b>	<b>Bacteriologia Convencional</b> .....	<b>16</b>
<b>2.12</b>	<b>Métodos Moleculares</b> .....	<b>17</b>
2.12.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	17
2.12.2	Análise do Polimorfismo de Restrição dos Fragmentos de DNA (RFLP – PCR) ...	17
2.12.3	Multilocus de Repetições em Tandem de Número Variável (MLVA): .....	17
2.12.4	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) .....	18
2.12.5	Ribotipagem .....	18
2.12.6	Identificação através da região 16S - MicroSEQ® .....	19
2.12.7	Micro arranjos (Microarrays) .....	19
2.12.8	Nova Geração de Sequenciadores (NGS) .....	20
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>23</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>26</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Tifo Aviário, uma doença aguda ou crônica de septicemia, é causado pela *Salmonella enterica* subsp. *enterica* do sorotipo Gallinarum biovar, afetando galinhas, perus e diversas outras espécies de aves (Shivaprasad, 2000). Aves adultas são geralmente as mais afetadas, embora todas as idades sejam suscetíveis. A disseminação da bactéria ocorre principalmente por meio de aves infectadas, que podem transmitir a doença tanto horizontalmente para aves da mesma geração quanto verticalmente, por meio da transmissão via ovo (Beach e Davis, 1927; Nobrega e Bueno, 1942; Hall *et al.*, 1949; Kwon *et al.*, 2010). Embora dados oficiais de muitos países europeus, EUA, Austrália e Japão indiquem que o Tifo Aviário esteja ausente em plantéis comerciais, sua ocorrência pode ser subestimada devido à maior propensão de casos em plantéis de subsistência (Barrow & Freitas Neto, 2011). O impacto econômico do Tifo Aviário continua significativo para a indústria avícola em diversos países da África, Ásia, América Central e do Sul (Jones *et al.*, 2001).

A cepa vacinal viva *S. Gallinarum* (SG9R) tem sido empregada como medida de controle do Tifo Aviário em diversas regiões onde a doença é endêmica. No Brasil, essa vacina é utilizada para combater o Tifo Aviário em poedeiras (Feberwee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005). Entretanto, a aplicação da vacina não é autorizada em rebanhos de reprodutoras de frangos e perus, assim como em lotes de frangos destinados à produção de carne. A compreensão da mutação dos genes de biossíntese do LPS e da base molecular da atenuação do SG9R, incluindo a expressão de genes de virulência, ainda não está totalmente esclarecida. Tem sido sugerido de que tanto o SG9R quanto suas variantes podem ser responsáveis por alguns surtos da doença em aves de produção. Essa suposição é corroborada pelo isolamento de cepas rugosas semelhantes ao SG9R em casos de Tifo Aviário em galinhas vacinadas com SG9R na Coreia. Além disso, os resultados de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e análise em Multilocus de Repetições em Tandem de Número Variável (MLVA) em isolados de um surto de Tifo Aviário na Bélgica revelaram que essas cepas eram praticamente idênticas à cepa utilizada na vacina (Kwon & Cho, 2011; Immerseel *et al.*, 2013).

O Brasil desempenha um papel importante e significativo na produção internacional de carne de aves, com a maior parte dessa produção concentrada nos estados do Sul (UBABEF - União Brasileira de Proteína Animal, 2015). Apesar dos avanços na avicultura brasileira, surtos de Tifo Aviário ainda ocorrem esporadicamente, podendo resultar em mais de 50% de mortalidade. Determinar se esses surtos estão relacionados ao uso prévio de SG9R ou à contaminação cruzada é uma questão problemática.



Neste estudo, a reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR) e o sequenciamento completo do genoma bacteriano (WGS) foram empregados como ferramentas epidemiológicas para investigar se o SG9R foi a fonte dos surtos. O WGS tem se mostrado uma ferramenta poderosa para a investigação de surtos causados por *S. enterica*, apresentando concordância epidemiológica e maior resolução do que a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), o método tradicional de subtipagem de cepas de *Salmonella* (Deng *et al.*, 2015; Scaltriti *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2015). Além disso, foi estabelecido um importante perfil de resistência antimicrobiana para caracterizar os isolados.

O objetivo deste estudo foi distinguir os isolados provenientes de surtos em reprodutas de galinhas e perus das cepas vacinais SG9R. Além disso, buscou-se determinar a resistência antimicrobiana dos isolados e empregar o sequenciamento completo do genoma bacteriano (WGS) e a análise de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em genes centrais para identificar a origem dos isolados selecionados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As salmoneloses aviárias são enfermidades provocadas por enterobactérias do gênero *Salmonella*, o qual é composto pelas espécies *enterica* e *bongori*. A *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*), que contém vários sorovares (Tindall *et al.*, 2005).

O Tifo Aviário e a Pulorose, embora sejam causados por bactérias com diferenças bioquímicas e genéticas, apresentam similaridades em aspectos como sinais clínicos, epizootiologia, lesões, além de métodos de controle e procedimentos de erradicação. A sorovariedade específica das aves é a *Salmonella Gallinarum* que compreende dois biotipos: *Gallinarum* e *Pullorum*, descritos como agentes etiológicos do Tifo e Pulorose Aviária respectivamente (Shivaprasad, 2008). A *Salmonella enterica* sorovar *gallinarum* biovar *Gallinarum* causa o Tifo Aviário em galinhas, perus e outras espécies de aves (Shivaprasad, 2000). Esta enfermidade é considerada relevante e de importância econômica, com distribuição mundial, controlada em países do Oeste da Europa, América do Norte, Austrália e Japão e emergente na indústria avícola em vários países da África, Ásia, América Central e América do Sul (Jones *et al.*, 2001), onde há criação de aves criadas livremente.

O Tifo Aviário é mais comum em granjas de postura comercial, embora possam ocorrer entre aves reprodutoras (corte e postura comercial), perus, galinhas caipiras, patos e faisão. A relação agente-hospedeiro com a ave é bastante diferente da pulorose. A *Salmonella Gallinarum* é altamente patogênica para aves em qualquer idade. A mortalidade provocada pelo Tifo Aviário pode chegar a 40-80% do plantel. Observa-se que algumas aves adoecem e acabam morrendo em 7-14 dias. Este processo é contínuo e aos poucos, vai acometendo aves do plantel, tendo-se no final, mortalidade dentro dos parâmetros acima mencionados (Junior & Neto, 2009).

### 2.1 Situação do Tifo Aviário na Saúde Pública

*Salmonella Gallinarum* raramente foi isolada de humanos e por isso tem pouca relevância a Saúde Pública. Além disso, dos casos isolados os indivíduos se recuperaram sem tratamento, mostrando que é uma doença auto-limitante (Shivaprasad, 2008).

## 2.2 Situação do Tifo Aviário no Mundo

Em diversos países, os registros oficiais de doenças como o Tifo Aviário são frequentemente insuficientes, já que essas condições são subnotificadas - ocorrendo muitas vezes em aves de criação de fundo de quintal/caipiras - e a incidência dessas enfermidades é subestimada.

Embora alguns países sejam declarados livres tanto do Tifo Aviário quanto da Pulorose, essa afirmação pode parecer um tanto improvável, considerando a variedade de espécies de aves silvestres que podem atuar como reservatórios desses sorovares. Além disso, de acordo com as informações mais recentes da Organização Mundial de Saúde Animal, os últimos casos de Tifo Aviário nos Estados Unidos e no Canadá foram relatados em 1981 e 1983, respectivamente (OIE, 2013a). Em muitos países europeus, a situação é parecida. Apesar de terem aparentemente eliminado o Tifo Aviário, enfrentam uma maior dificuldade no controle da Pulorose. Esse desafio é, em grande parte, devido ao crescimento significativo da criação extensiva de aves "free-range". Essas aves são mantidas em pisos com processos de desinfecção deficientes ou até mesmo inexistentes, e a presença de vetores oriundos da vida selvagem (Davis & Wray, 1995a, Davis & Wray, 1995b) aumenta o risco de infecções por *Salmonella spp* (Auri *et al.*, 2010).

Entre 2005 e 2008, a Rússia relatou 302 surtos de Tifo Aviário, com o último reporte sendo feito em 2012. O México e o Brasil tiveram surtos reportados em 2011, enquanto a Argentina fez a sua comunicação em 2012. Na indústria avícola asiática, a ocorrência do Tifo Aviário é frequente, com a China reportando casos em 2012. Na África, vários países relataram casos em 2011 e 2012 (OIE, 2013a).

Com base nas informações oficiais, é desafiador determinar com precisão a ocorrência e distribuição do Tifo Aviário na maioria dos países, e é provável que muitos cenários estejam subestimados. É fundamental ter uma ideia da incidência dessa infecção, pois isso afeta diretamente as medidas de controle, como biosseguridade, programas de vacinação, testes de diagnóstico e eliminação de aves. A biosseguridade desempenha um papel crucial, já que fatores como aves silvestres, pessoas e outros vetores têm uma influência direta. Em alguns países, a pressão pública para a criação de aves "free-range" acaba aumentando o risco de contaminação, tanto para a criação de frangos de corte quanto para a postura comercial. Isso também representa um risco de contaminação para as próprias aves silvestres. A pressão pública está impulsionando algumas mudanças na criação de aves que, infelizmente, não são benéficas para a saúde ou o bem-estar desses animais. Essas alterações podem resultar em um

aumento na incidência de várias infecções, sejam elas bacterianas, virais ou parasitárias (Barrow & Freitas Neto, 2011).

### 2.3 Etiologia

A *Salmonella* Gallinarum é um bacilo Gram-negativo, não-esporogênico, e aeróbio ou aneróbico facultativo. As colônias podem ter tamanho variável, sendo que são consideradas minúsculas, medindo entre 0,3-1,5 X 1,0-2,5mm. Tanto a *Salmonella* Gallinarum, quanto a *Salmonella* Pullorum são imóveis e crescem melhor em cultura direta em meio seletivo, a 37° C (Shivaprasad, 2008).

*Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum são indistinguíveis pela sorotipificação convencional, visto que ambas pertencem ao Grupo D (ambas reagem contra o antígeno somático O: 1, 9, 12 e não reagem aos antígenos flagelados: -:-) (Christensen *et al.*, 1993). Para fazer a classificação destes dois sorovares, é utilizada uma combinação de marcadores bioquímicos, como por exemplo, a produção de gás, fermentação de dulcitol, maltose, rhamnose e xilose e a descarboxilação da ornitina. A *Salmonella* Gallinarum fermenta o dulcitol e não descarboxila a ornitina, enquanto a *Salmonella* Pullorum não fermenta o dulcitol e descarboxila rapidamente a o ornitina. Entretanto, algumas cepas de *Salmonella* Pullorum que não descarboxilam a ornitina já foram isoladas de aves de postura comercial (Crichton & Old, 1990).

### 2.4 Patogenia e Epidemiologia

Embora seja mais comumente descrito em aves adultas, o Tifo Aviário pode acometer aves em qualquer idade da vida. Quando acomete aves jovens, pode ser confundida com a Pulorose. As galinhas são hospedeiros naturais do agente do Tifo Aviário. Outras espécies de aves, também são susceptíveis. No entanto, *Salmonella* Gallinarum, natural ou experimentalmente, já foi isolada de outros animais como ratos, chimpanzés, raposas, coelhos, cobaias e seres humanos (Junior & Neto, 2009).

Assim como outras enfermidades bacterianas, o Tifo Aviário e a Pulorose podem ser transmitidos de diversas formas. As aves infectadas, tanto as portadoras saudáveis quanto as doentes, são as principais formas de disseminação e eliminação do agente. As aves podem se infectar através da infecção transovariana, pela penetração da bactéria através da casca do ovo, bem como através da transmissão horizontal entre aves infectadas. A contaminação

também pode ocorrer no incubatório. As fezes de aves infectadas representam uma importante fonte de infecção, assim como alimentos, água e a cama onde as aves repousam. As pessoas também desempenham um papel importante na disseminação quando não são seguidas boas práticas e procedimentos de biossegurança, como a troca de roupas, sapatos, banhos e lavagem das mãos. Da mesma forma, veículos como caminhões de ração ou ovos podem atuar como veículos do agente. Aves selvagens, mamíferos e moscas também são importantes disseminadores desses organismos (Shivaprasad, 2008).

## **2.5 Sinais Clínicos**

As manifestações clínicas geralmente são observadas em aves adultas. Elas podem se apresentar quietas, prostradas, deitadas, com diminuição do apetite e desuniformidade no crescimento e ganho de peso. Além disso, é comum observar diarreia de coloração amarelo-esverdeada a esverdeada, queda na produção de ovos, redução da fertilidade e, em poucos dias, a ocorrência de óbitos. O curso da doença costuma durar de cinco a sete dias, embora em alguns casos possa ser mais prolongado. A morbidade e a mortalidade podem atingir níveis elevados, variando de 10% a 80% ou até mais. Nos lotes afetados por Tifo Aviário, a mortalidade não ocorre de uma só vez. Inicialmente, algumas aves adoecem e, entre elas, algumas acabam falecendo. Esse padrão pode se repetir várias vezes, resultando em uma significativa mortalidade final, afetando grande parte do lote (Junior & Neto, 2009).

## **2.6 Alterações Anatomopatológicas**

As Salmonelas podem infectar as aves, no entanto, a severidade das lesões pode variar consideravelmente. (Turnbull & Snoeyenbos, 1974).

O Tifo Aviário é uma enfermidade caracterizada por septicemia e toxemia. É possível observar congestão dos órgãos internos e anemia, causada pela destruição das hemácias pelo sistema reticuloendotelial. Nas fases agudas da doença, as alterações podem não ser proeminentes. O fígado e o baço podem aumentar de tamanho de 3 a 4 vezes. O fígado pode tornar-se friável, apresentando coloração esverdeada, amarelo-esverdeada a bronzeada, com pontos necróticos (esbranquiçados) e hemorrágicos. A vesícula biliar pode estar distendida devido ao aumento do volume de bile. Pontos necróticos também podem aparecer no baço e no coração, este último podendo apresentar ainda pontos de hemorragia. Em casos de evolução mais prolongada da enfermidade, pode-se observar hidropericárdio, bem como a

presença de processos inflamatórios formando nódulos esbranquiçados, semelhantes aos descritos na Pulorose, em órgãos como coração, baço, pulmões, rins, moela, pâncreas, duodeno e cecos. O processo inflamatório no coração pode atingir o pericárdio, que se tornará opaco, assim como o líquido pericárdico. Os rins podem apresentar coloração amarelada e o ovário pode estar atrofiado ou exibir folículos ovarianos hemorrágicos, murchos, congestos, císticos e disformes, contendo material caseoso ou hemorrágico em seu interior, semelhante ao que ocorre na Pulorose (Junior & Neto, 2009).

## **2.7 Alterações Histopatológicas**

Tanto nos casos agudos quanto nos casos crônicos, a doença é caracterizada pela hemólise e pela presença de lesões necróticas no coração e no trato gastrointestinal (Smith, 1955).

Nos casos superagudos, observa-se uma severa congestão vascular em vários órgãos, especialmente no fígado, baço e rins. Nos casos agudos e subagudos, há necrose multifocal dos hepatócitos com acúmulo de fibrina e infiltração de neutrófilos no parênquima hepático. Além disso, pode ocorrer infiltração periportal de neutrófilos, linfócitos e células plasmáticas no fígado. Nos casos crônicos, especialmente quando há presença de nódulos no coração, o fígado pode apresentar congestão passiva crônica com fibrose intersticial. O baço pode apresentar severa congestão ou exsudação fibrinosa vascular nos estágios agudos, e severa hiperplasia do sistema celular fagocítico mononuclear nos estágios mais avançados. Os cecos de aves jovens podem apresentar extensas áreas de necrose com debris com fibrina e neutrófilos no lúmen. Entretanto, as lesões microscópicas mais características ocorrem no coração e no ventrículo. No coração, a lesão inicia com necrose das fibras musculares e infiltração de neutrófilos, linfócitos e células plasmáticas. Nos estágios mais tardios, essas células são substituídas por um grande número de histiócitos. Macroscopicamente e histologicamente, os nódulos cardíacos podem ser confundidos com tumores linfóides causados pelo vírus da doença de Marek ou por retrovírus. Outras alterações, como serosites em vários órgãos, incluindo pericárdio, pleuroperitônio, serosa do trato intestinal e mesentério, podem ser observadas na maioria dos casos. Lesões microscópicas no ovário podem variar desde inflamação fibrinossupurativa nos casos agudos até uma severa inflamação piogranulomatosa (Shivaprasad & Barrow, 2008).

## 2.8 Tratamento e Prevenção

Em alguns países, os procedimentos utilizados para o controle de lotes infectados por Tifo Aviário incluem a antibioticoterapia. Uma variedade de quimioterápicos é descrita como eficaz na redução da mortalidade, porém, eles não são capazes de eliminar completamente a infecção de um lote, uma vez que as aves continuam infectadas, eliminando o agente no ambiente e reinfectando lotes subsequentes (Moore, 1948; Wilson, 1956). No Brasil, de acordo com o Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), é vedada a utilização de antimicrobianos para controle de *Salmonella Gallinarum* ou *Salmonella Pullorum*. Lotes de reprodutoras pesadas e de corte quando diagnosticados como positivos para um dos dois agentes, devem ser sacrificados ou encaminhados para abatedouros com o Serviço de Inspeção Federal (SIF). Além disso, é necessário realizar uma investigação epidemiológica oficial para identificar a origem da contaminação. (MAPA, 2003; MAPA 2013).

Para manter um plantel livre de Tifo Aviário, é necessário seguir padrões rigorosos de biossegurança, incluindo um plano de Boas Práticas de Produção. Este plano deve abranger o controle na entrada de pintinhos, de incubatórios e reprodutoras conhecidos por serem negativos para a doença, bem como o controle de veículos, equipamentos, funcionários, terceiros e visitantes, além de um programa de bioproteção. É essencial que haja sinalização informativa visível de biossegurança na entrada das granjas, juntamente com a implementação de barreiras físicas para evitar o contato com outras aves. Preferencialmente, as granjas devem operar com um ciclo único de produção e manter controle eficaz de roedores, além de proibir a presença de outros animais na propriedade. Deve-se elaborar um plano de saúde do plantel formulado por um veterinário, o qual descreva o programa de saúde a ser seguido. É importante que as granjas possuam um local apropriado para o tratamento de aves mortas, e que haja um manejo adequado das camas tanto na entrada quanto na saída do lote. Todas as políticas de biossegurança devem ser detalhadas e todas as pessoas envolvidas devem receber treinamento adequado. Auditorias periódicas, realizadas no mínimo anualmente, devem ser conduzidas para verificar a eficácia do programa e identificar oportunidades de melhoria (Shapiro *et al.*, 2011).

## 2.9 Vacinação

O controle dessas infecções depende do nível de infecção na região. Em áreas com alta pressão de infecção ou onde a erradicação não é viável, a utilização de vacinas pode ser uma opção para controlar a propagação da doença (Barrow & Freitas Neto, 2011).

Alguns estudos sugerem que a utilização de vacinas vivas é significativamente mais eficaz e oferece uma proteção mais robusta do que o uso de vacinas inativadas no controle de infecções por *Salmonella sp.* Isso se deve à capacidade das vacinas vivas de estimular o sistema imunológico inato pela presença da bactéria viva, o que resulta em uma resposta imune rápida e eficaz tanto sistemicamente quanto no intestino, proporcionando uma resistência efetiva à infecção (Mackaness, 1964; Blanden *et al.*, 1966; Foster *et al.*, 2003; Okamura *et al.*, 2007). A primeira vacina viva eficaz e atenuada foi a 9R e a 9S (Smith, 1956), desenvolvida décadas atrás. Embora a vacina 9S seja mais protetora do que a 9R, ela não induz a produção de anticorpos circulantes específicos para lipopolissacarídeos, nem interfere no teste de aglutinação rápida do sangue total (Barrow & Freitas Neto, 2011). Uma das vantagens da vacina 9R sobre outras vacinas é sua capacidade de oferecer proteção cruzada contra *S. Enteritidis* (Barrow *et al.*, 1991; Feberwee *et al.*, 2001). Embora as vacinas SG9R tenham sido amplamente utilizadas, elas podem apresentar alguma virulência em aves jovens e recém eclodidas (Lee *et al.*, 2005) e persistir nos tecidos por algumas semanas. (Barrow, *et al.*, 1991).

De acordo com o PNSA (Plano Nacional de Sanidade Avícola) do Brasil, nos estabelecimentos matrizeiros avícolas de Controle Permanente só podem utilizar vacinas inativadas contra *Salmonella Enteritidis*. Fica vedado o uso de qualquer vacina contra salmonelas em estabelecimento avoseiros, em bisavoseiros e em granjas de seleção genética de reprodutoras primárias (MAPA, 2003).

Os estabelecimentos avícolas de postura comercial devem manter alojados somente aves vacinadas, com vacinas vivas, para *Salmonella Enteritidis* (MAPA 2013). Além disso, a cepa vacinal SG9R é permitida e amplamente utilizada em poedeiras no Brasil.

## 2.10 Diagnóstico

O diagnóstico do Tifo Aviário é feito com bases nos achados clínico, anátomo-patológico e exames laboratoriais. Entretanto, o diagnóstico definitivo é o isolamento e identificação do agente – *Salmonella Gallinarum*.



## 2.11 Bacteriologia Convencional

O diagnóstico bacteriológico é dividido em isolamento, identificação bioquímica e caracterização da cepa bacteriana isolada por aglutinação rápida em lâmina. Para o isolamento de Salmonelas é sugerida a coleta de:

- Aves vivas: suabe de cloaca; fezes frescas do lote; material de cama, ninho e/ou suabe de arrasto; ovos.

- Aves necropsiadas: suabe de carcaça; baço; fígado; vesícula biliar; rins; pulmão; coração; trato gastrointestinal; articulações com lesões; conjuntiva com lesões.

O diagnóstico bacteriológico pode ser realizado a partir de enriquecimento, que pode ser seletivo ou não seletivo. A partir destes caldos (seletivos ou não seletivos), são realizadas estrias em placas de Ágar MacConkey, Ágar Verde Brilhante, Ágar Hektoen e/ou Ágar Rambach.

A identificação da *Salmonella* Gallinarum é feita através da identificação bioquímica preliminar, utilizando TSI (Tríplice Açúcar Ferro), LIA (Ágar Lisina Ferro), Urease e Motilidade.

As cepas que apresentarem resultado negativo para Urease e Motilidade e as demais reações características no TSI e LIA, devem ser submetidas a provas bioquímicas complementares, sendo elas: Indol; VM (Vermelho de Metila), VP (Voges-Proskauer), Citrato de Simons, Fenilalanina desaminase, TSI, Urease, Lisina descarboxilase, Arginina desidrolase, Ornitina descarboxilase, Motilidade, Malonato, D-Glicose produção de ácido e gás, Lactose, Sacarose, D-Manitol, Dulcitol e Maltose.

As cepas que apresentarem as características nas provas bioquímicas complementares, deverão ser submetidas a caracterização antigênica da cepa bacteriana – aglutinação rápida em lâmina, com o antissoro anti-somático O polivalente de *Salmonella* e mediante o resultado positivo, deverão ser caracterizadas antigenicamente com o anti-soro anti-somático D (MAPA, 1995).

Para o diagnóstico de Salmonelas imóveis, dentre elas a *Salmonella* Gallinarum, deve-se priorizar o diagnóstico a partir de órgãos.

Dentre as vantagens, o isolamento bacteriano é a prova definitiva para o diagnóstico. A desvantagem é o tempo para liberação do resultado e na caracterização antigênica não é possível fazer a diferenciação entre os biotipos Gallinarum e Pullorum.

## 2.12 Métodos Moleculares

### 2.12.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O PCR é uma importante ferramenta para a detecção de *Salmonella* spp em aves infectadas. A grande maioria dos PCRs é desenvolvida com pares de primers para detectar o gene *InvA* em aves infectadas por *Salmonella* spp. As vantagens do PCR é sensibilidade, é um método menos laborioso, além de ser uma técnica mais rápida, podendo ter resultados positivos em 21 horas após o início do processamento das amostras (Tuchili *et al.*, 1995). Dentre as desvantagens, podem ser citadas, a não diferenciação do sorovar da *Salmonella* spp e a necessidade de pré-enriquecimento para a detecção do agente pesquisado. Além disso, há uma variedade de PCRs disponíveis para comercialização no mercado ou desenvolvidos *in house*, o que resulta numa falta de reprodutibilidade de resultados, quando comparados diferentes tipos de PCRs (Ribeiro *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2011).

### 2.12.2 Análise do Polimorfismo de Restrição dos Fragmentos de DNA (RFLP – PCR)

O PCR - RFLP pode ser utilizado tanto para detectar, quanto para diferenciar alguns sorovares de *Salmonella* spp. O gene *flicC* está presente tanto na *Salmonella* Gallinarum, quanto na *Salmonella* Pullorum. Existem polimorfismos no códon 31, reconhecida pela enzima Himp II no biotipo gallinarum, não sendo encontrado no biotipo Pullorum. Dentre as vantagens de utilização do RFLP – PCR são o custo e a facilidade de ser realizada (Kwon *et al.*, 2000). Outros autores descrevem também a diferenciação no gene *rfbS*, utilizando a enzima TfiI para a *Salmonella* Gallinarum e a PleI, para a *Salmonella* Pullorum (Park *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2005). Dentre as desvantagens, está o fato da necessidade da colônia pré-isolada a fim de ter um melhor desempenho no teste.

### 2.12.3 Multilocus de Repetições em Tandem de Número Variável (MLVA):

É uma técnica utilizada para análise em multilocus das repetições em tandem de número variável que permite avaliar a variabilidade genética de microorganismos.

O potencial da técnica MLVA para tipificação foi demonstrada nos diferentes sorovares de *Salmonella*, incluindo Typhimurium (Lindstedt *et al.*, 2004; Best *et al.*, 2007), Enteritidis (Boxrud *et al.*, 2007; Beranek *et al.*, 2009), and Newport (Davis *et al.*, 2009). Entretanto,

mesmo o método MLVA sendo considerado eficiente para alguns sorovares, para outros, ele não teve os mesmos resultados satisfatórios (Beranek *et al.*, 2009).

Para *Salmonella Gallinarum* o MLVA pode ser utilizado como um método complementar a outras técnicas para estudos epidemiológicos de surtos, tais como PFGE, devido ao seu alto poder discriminatório e por ser um método confiável de genotipagem (Kang, *et al.*, 2011). Além disso, é um método rápido, fácil de ser executado, menos laborioso e com alta reprodutibilidade.

#### 2.12.4 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O procedimento para esta técnica é relativamente semelhante à realização de uma eletroforese em gel padrão, exceto que, em vez de correr constantemente a tensão numa direção, a tensão é realizada simultaneamente entre três direções, que corre através do eixo central do gel e que rodam em dois um ângulo de 60 graus para cada lado. A técnica utiliza enzimas de restrição para gerar fragmentos grandes e quando separadas por eletroforese em gel de agarose, os padrões resultantes são altamente específicos e discriminatórios entre as cepas (Seo *et al.*, 2006). As vantagens desse método são a alta reprodutibilidade dos perfis encontrados e separação de fragmentos de DNA grandes (até 600 kb) ou cromossomos inteiros. As desvantagens é a complexidade da técnica e protocolos de extração de DNA trabalhosos.

#### 2.12.5 Ribotipagem

A ribotipagem baseada na hibridação DNA-DNA, envolve o uso, como sondas, de RNA ribossômico (rRNA) ou de sequências de DNA que codificam o rRNA (rDNA). A utilização dessas sequências como sondas permite evidenciar, após hibridação, apenas os fragmentos de restrição que apresentam homologia com o DNA da sonda, entre os milhares de fragmentos gerados com uma enzima de restrição que reconhece sequências frequentes. Algumas sequências presentes na região genômica que codifica o rRNA são muito conservadas, nomeadamente as que codificam o rRNA 16S e 23S. Os perfis de hibridação obtidos são reprodutíveis e simples de interpretar (Grimont & Grimont, 1986).

A Ribotipagem com a utilização da enzima EcoRI é uma importante ferramenta para a diferenciação de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*. Quando ocorrem cepas do mesmo biovar, com ribogrupos diferentes, obtém-se uma importante informação

epidemiológica (Christensen *et al.*, 1993). A técnica possui como desvantagem a análise de uma pequena região do genoma, sendo assim, quando ocorrem resultados dentro do mesmo ribotipo, mesmo assim não podemos afirmar que as cepas advêm de uma mesma origem.

#### 2.12.6 Identificação através da região 16S - MicroSEQ®

O sistema de identificação microbiana para identificar microorganismos - MicroSEQ® ID (Applied Biosystems, Foster City, CA) é uma metodologia bem estabelecida e que tem como objetivo a identificação de espécies bacterianas, incluindo a *Salmonella* (Trkov & Avgustin, 2003; Clarridge, 2004; Woo *et al.*, 2008). Este método utiliza primers universais para amplificar a tanto parte da região (~500 bp) do gene 16S rRNA ou do gene inteiro (~1500 bp). O gene é um gene conservado encontrado nas bactérias, porém que apresenta regiões hipervariáveis possíveis de estabelecer diferenças entre os microorganismos, no nível de espécies e subespécies. Enquanto a região 16S é tradicionalmente considerada uma região muito conservada para distinguir espécies bacterianas em nível de subtipagem, alguns estudos de heterogeneidade intragenômica relataram a diversidade genética dentro das mesmas espécies, incluindo a habilidade de identificar cepas bacterianas relacionadas a surtos (Helm *et al.*, 2003; Acinas *et al.*, 2004; Clarridge, 2004; Case *et al.*, 2007). As vantagens podem ser citadas como um método padronizado de identificação bacteriana baseada na análise parcial ou inteira do seqüenciamento da região 16S rRNA, o sistema inclui uma análise automatizada, além de ser possível a construção de uma biblioteca personalizada para estudos epidemiológicos. Dentre as desvantagens, podemos salientar o custo/ensaio; o fato de ter que ter um equipamento específico para esta finalidade e a não identificação dos diferentes sorotipos de *Salmonella enterica*, permitindo somente a diferenciação dos isolados baseados nas diferenças dos subtipos moleculares (Hellberg *et al.*, 2012).

#### 2.12.7 Micro arranjos (Microarrays)

Os micro arranjos, também popularmente conhecidos como biochips de DNA, são constituídos de DNA dispostos em um suporte sólido, geralmente vidro, onde são aderidos oligonucleotídeos de DNA fita simples de aproximadamente 50 a 70 pb com tamanho semelhante a uma lâmina de microscópio óptico. Cada oligonucleotídeo possui uma seqüência representativa de um determinado gene. Ainda, cada oligonucleotídeo está aderido em um ponto específico da lâmina de vidro (microarray), conhecido como spot. Uma única lâmina

pode conter dezenas ou até centenas de milhares de spots, cobrindo assim um determinado genoma inteiro. Para a sua construção, o genoma de interesse é primeiramente seqüenciado e então um oligonucleotídeo de DNA fita simples de cada gene é representado no *microarray*. Esta tecnologia permite analisar um grande volume de dados simultaneamente (OIE, 2013b).

O princípio do sistema *microarray Salmonella* é baseado na especificidade do reconhecimento molecular da seqüência de DNA alvo e subsequente amplificação com primers universal. Cada alvo individual de DNA é reconhecido por uma sonda específica que contém um único ZIP code que corresponde a uma única posição no micro arranjo. Estes ZIP codes são usados para a detecção no micro arranjo após a amplificação. A sonda se liga através da DNA ligase quando há uma perfeita complementariedade com o alvo do DNA. Apenas sondas ligadas resultarão em produtos amplificados. Sondas que diferem do alvo do DNA não resultarão em produtos amplificados, mesmo no caso de apenas um nucleotídeo for diferente. Os produtos amplificados são hibridizados ao micro arranjo e visualizados por detecção colorimétrica. Estas gerações de imagens dos arranjos são analisadas por um *software* específico (Wattiau *et al.*, 2008).

Dentre as vantagens do teste podemos citar a identificação de mais de 100 sorovares dentro de uma mesma corrida, o tempo e a facilidade de execução. As desvantagens é a necessidade de um equipamento específico, a não diferenciação genética dentro do mesmo sorovar e o custo.

#### 2.12.8 Nova Geração de Sequenciadores (NGS)

O seqüenciamento de DNA é usado rotineiramente na caracterização genética de organismos vivos. Nos últimos anos, avanços tecnológicos levaram à disponibilidade de seqüenciamentos de DNA de alto rendimento e de baixo custo. A Nova Geração de Sequenciadores revolucionou a pesquisa genética e genômica. Estas novas plataformas de seqüenciamento diferem substancialmente de outras tecnologias de seqüenciamento, pois utilizam tanto as diferenças de pH, quanto a luz para detectar os eventos de polimerização. O sistema combina a tecnologia de seqüenciamento de semicondutores com a bioquímica natural para traduzir diretamente informações químicas em dados digitais, democratizando o seqüenciamento e torná-lo acessível a praticamente qualquer laboratório ou clínica. O sistema utiliza as melhorias exponenciais na indústria de semicondutores para fornecer escala e flexibilidade para diversas aplicações. Utiliza de forma simples, a química para o seqüenciamento e o sistema elimina a necessidade dos componentes ópticos caros e reduz

químicas complexas para medir extensão natural de DNA. Genomas inteiros serão seqüenciados de forma mais rápida e acurada do que pelos métodos convencionais (Bragg *et al.*; 2013).

### **3 ARTIGO CIENTÍFICO**

Este estudo resultou em um artigo científico, publicado em 2017 na revista científica *British Poultry Science* (v. 59, n. 2, p. 154-159; doi: 10.1080/00071668.2017.1406062).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram testados sessenta isolados de campo de *S. Gallinarum* de surtos de tifo aviário no sul do Brasil entre 2011 e 2014, duas cepas vacinais e *S. Gallinarum* NCTC10532. Esses isolados de surtos foram selecionados devido ao alto número de granjas de postura comercial nesta região do Brasil. Os isolados de campo foram cultivados a partir de reprodutores de peru (1), reprodutores de frango (22), frangos de corte (2) e lotes de terminação de peru (35). As cepas vacinais foram isoladas de duas marcas diferentes: SG9R, Nobilis®SG9R (MSD Animal Health, Boxmeer, Holanda) e Cevac® *S. Gallinarum* (Ceva Santé Animale, Libourne, França).

O conjunto de 2882 clusters de genes centrais para *S. enterica* (Leekitcharoenphon *et al.* 2012) no genoma de referência foi utilizado para comparar as amostras e obter a árvore de SNP. A avaliação da árvore de SNP nos genes centrais mostrou ser uma abordagem de alta qualidade para estudos epidemiológicos (Leekitcharoenphon *et al.* 2014). O sequenciamento completo do genoma bacteriano (WGS) foi utilizado neste estudo para investigação epidemiológica, mostrando-se uma ferramenta poderosa para investigar surtos causados por *S. enterica*, fornecendo uma grande concordância epidemiológica e maior resolução do que a PFGE, o método tradicional para subtipagem de *Salmonella* (Deng *et al.* 2015; Scaltriti *et al.* 2015; Taylor *et al.* 2015). A WGS oferece a máxima sensibilidade para tipagem de cepas e pode fornecer mais informações sobre relacionamentos filogenéticos entre as cepas (Immerseel *et al.* 2013). A análise WGS mostrou que as amostras poderiam ser classificadas em três grupos principais. Um foi formado pelas amostras SG04 e SG05, o segundo por cepas vacinais e o terceiro por outros isolados de campo. As amostras da propriedade B Brasil-RS e SG05 (Propriedade C Brasil-RS) são de propriedades diferentes, mas localizadas na mesma região, e os surtos ocorreram com um mês de diferença um do outro. Embora não saibamos a origem desses isolados de *Salmonella*, é possível especular que seja devido à presença de portadores animais livres que transitam entre as duas granjas. Através da investigação epidemiológica, os técnicos suspeitaram que a Granja C foi contaminada pela Granja B por um caminhão de ração (dados não mostrados). Os surtos nas Granjas A e D podem estar associados à mesma origem, pois os isolados eram semelhantes. No entanto, não houve relação epidemiológica entre isolados das Granjas A e D (dados não mostrados).

A Granja A, a amostra SG03 (Propriedade A Brasil-RS), veio de um surto que ocorreu 1 ano antes dos surtos que forneceram as amostras SG01 (Propriedade A Brasil-RS) e SG02 (Propriedade A Brasil-RS). Este fato pode explicar por que a amostra SG03 (Propriedade A



Brasil-RS) não mostrou as mesmas inversões que as amostras SG01 (Propriedade A Brasil-RS) e SG02 (Propriedade A Brasil-RS). Isso sugere que estas tiveram origens diferentes, indicando falta de biosseguridade nessas granjas. As amostras SG06 (Propriedade D Brasil-RS) e SG07 (Propriedade D Brasil-RS) da fazenda D são do mesmo surto e ocorreram 15 meses após os surtos que forneceram as amostras SG01 (Propriedade A Brasil-RS) e SG02 (Propriedade A Brasil-RS), mas nenhuma relação epidemiológica entre eles pôde ser encontrada, apesar das semelhanças nesses isolados.

O perfil de resistência mais frequente: norfloxacina, enrofloxacina, estreptomicina, eritromicina, espiramicina (8/60), foi encontrado em 2012 e 2013, em surtos de Tifo Aviário em terminadores de peru, reprodutores de frangos e frangos de diferentes estados do sul do Brasil. A ocorrência de *S. Gallinarum* resistente aos macrolídeos, eritromicina e espiramicina está de acordo com outros estudos (Chu e Chiu 2006; Kang *et al.* 2010). Apesar da taxa intermediária de resistência às fluoroquinolonas, ou seja, enrofloxacina relatada anteriormente, a alta prevalência de resistência à norfloxacina não foi relatada. A resistência contra aminoglicosídeos relatada neste estudo é consistente com Kang *et al.* (2010) que comparou isolados de *S. Gallinarum* da Coreia do Sul em 2002-2007 e encontrou aumento da resistência a quinolonas e aminoglicosídeos. A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, amoxicilina (35%) e ceftiofur (8%) e tetraciclina não foi relatada anteriormente para *S. Gallinarum*. No entanto, a susceptibilidade reduzida aos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina foi relatada no Brasil para diversas cepas de *Salmonella* spp., principalmente isoladas do ambiente avícola (Mattiello *et al.* 2015). Apesar da presença de resistência à cefalosporina de terceira geração, ceftiofur e ao  $\beta$ -lactâmico amoxicilina, genes para ESBL e cefalosporinase plasmídica não foram encontrados, indicando que a resistência observada nesses isolados não está relacionada aos genes pesquisados. Em pesquisas sobre *Salmonella* spp. isolada de animais de fazendas nos EUA de 1999 a 2003, a maioria da resistência ao ceftiofur estava associada a plasmídeos que codificam blaCMY-2 (Frye e Fedorka-Cray 2007). Neste relatório, o CMY-2 mediado por plasmídeo estava ausente nos isolados testados.

Embora o uso de antibióticos para o tratamento do Tifo Aviário não seja permitido no Brasil, a alta taxa de resistência relatada aqui demonstra que, como em outros países, o uso de antibióticos é frequente. Muitos antibióticos têm sido eficazes na redução da mortalidade em surtos de Tifo Aviário, mas não conseguem eliminar a infecção do lote, uma vez que as aves permanecem infectadas após o tratamento e podem ser reinfectadas do ambiente local (Gordon e Tucker 1957; Barrow e Freitas Neto 2011). O perfil dessa resistência a antibióticos

em isolados do presente estudo de aves comerciais pode ser consequência do uso contínuo de antimicrobianos para tratar problemas de doenças aviárias, como *Escherichia coli* ou artrite.

O presente estudo sugere que *S. Gallinarum* isolado de surtos de tifo aviário no período estudado não foi causado pelo uso da vacina viva SG9R. As cepas sequenciadas apresentavam semelhanças em alguns surtos, mesmo quando a relação epidemiológica não pôde ser encontrada.

O estudo destaca a presença de resistência antimicrobiana às principais classes de antibióticos utilizados na indústria avícola.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ACINAS, S.G., MARCELINO, L.A., KLEPAC-CERAJ, V., POLZ, M.F., 2004. "Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons." *Journal of Bacteriology*, 186, p. 2629–2635.
- AURI, K., CHEMALY, M., PRETETIN, L., ROUXEL, S., PECHEROT, M., MICHAEL, V., Le BOUQUIN, S., 2010. "Prevalence and risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French breeding and fattening turkey flocks at the end of the rearing period." *Preventive Veterinary Medicine*, 94, p.84-93.
- BARROW, P. A., LOVELL, M. A., BERCHIERI, A. 1991. "The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-alying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4." *Avian Pathology*, 20, p.681-692.
- BARROW, P. A., and O. C. FREITAS NETO. 2011. "Pullorum Disease and Fowl Typhoid- New Thoughts an Old Diseases: A Review." *Avian Pathology* 40: 1–13.
- BEACH, J. R., and D. E. DAVIS. 1927. "Acute Infection in Chicks and Chronic Infection of the Ovaries of Hens Caused by the Fowl Typhoid Organisms." *Hilgardia* 2: 411–424.
- BERANEK, A., MIKULA, C., RABOLD, P., ARNHOLD, D., BERGHOLD, C., LEDERER, I., ALLERBERGER, F. KORNSCHÖBER, C. 2009. "Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for subtyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*." *International Journal of Medical Microbiology*, 299, p. 43-51, 2009.
- BEST, E. L., LINDSTEDT, B. A., COOK, A., CLIFON HADLEY, F. A., THRELFALL, E. J., LIEBANA, E. 2007. "Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*: comparison of isolates from pigs, poultry and cases of human gastroenteritis." *Journal of Applied Microbiology*, 103, P. 565-572.
- BLANDEN, R. V., MACKANESS, G. B. & COLLINS, F. M. 1966. "Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid." *Journal of Experimental Medicine*, 124, p. 585-600.
- BOXRUD, D., PEDERSON-GULRUD, K., WOTTON, J., MEDUS, C., LYSZKOWICZ, E., BESSER, J., BARTKUS, J. M. 2007. "Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*." *Journal of Clinical Microbiology*, 45, P. 536-543.
- BRAGG, L. M., STONE, G., BUTLER, M. K., HUGENHOLTZ, P., TYSON, G. W. 2013. "Shining a Light on Dark Sequencing: Characterising errors in Ion Torrent PGM Data." *PLOS Computational Biology*, 9, p.1-18.
- CASE, R. J., BOUCHER, Y., DAHLLOF, I., HOLMSTROM, C., DOOLITTLE, W. F., KJELLERBERG, S. 2007. "Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies." *Applied Environmental Microbiology*. 73, p. 278–288.

- CHRISTENSEN, J. P., OLSEN, J. E., BISGAARD, M. 1993. "Ribotypes of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars gallinarum and pullorum." *Avian Pathology*, 22, p. 725-738.
- CHU, C., and C. H. CHIU. 2006. "Evolution of the Virulence Plasmid of Non-Typhoid *Salmonella* and Its Association with Antimicrobial Resistance." *Microbes and Infection* 8: 1931–1936.
- CLARRIDGE III, J. E. 2004. "Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases." *Clinical Microbiology*, 17, p.840-862.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2012. "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing." In 22nd Informational Supplement. CLSI document M100-S22, 19087-1898. Wayne, PA: CLSI.
- COHEN, A. L., S. K. FRIDKIN, S. S. HUANG, J. A. JERNIGAN, E. LAUTENBACH, S. ORIOLA, K. M. RAMSEY, C. D. SALGADO, and R. A. WEINSTEIN. 2008. "Recommendations for Metrics for Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings: SHEA/HICPAC Position Paper." *Infection Control & Hospital Epidemiology* 29: 901–913.
- CRICHTON, P. B. & OLD, D. C. 1990. "Salmonellae of serotypes Gallinarum and Pullorum grouped by biotyping and fimbrial-gene probing." *Journal of Medical Microbiology*, 32, p. 145-152.
- CUZON, G., T. NAAS, P. BOAGAERTS, Y. GLUPCZYNSKI, and P. NORDMANN. 2012. "Evaluation of a DNA Microarray for the Rapid Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), Plasmid-Mediated Cephalosporinases (Cmy-2-Like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like MOX) and Carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM)." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67: 1865–1869.
- DAVIES, R. H., WRAY, C. 1995 a. "Mice as carriers of *Salmonella enteritidis* on persistently infected poultry units." *The Veterinary Record*, 137, p.307-315.
- DAVIES, R. H., WRAY, C. 1995 b. "The role of the lesser mealworm beetle (*Alphotobius diaperinus*) in carriage of *Salmonella enteritidis* on persistently infected poultry units." *The Veterinary Record*, 137, p.407-408.
- DAVIS, M. A., BAKER, K. N., CALL, D. R., WARNICK, L. D., SOYER, Y., WIEDMANN, M., GROHN, Y., McDONOUGH, P. L., HANCOCK, D. D., BESSER, T. E. 2009. "Multilocus variable-number tandem-repeat method for typing *Salmonella enterica* serovar Newport." *Journal of Clinical Microbiology*, 47, p. 1934-1938.
- DENG, X., N. SHARIAT, E. M. DRIEBE, C. C. ROE, B. TOLAR, E. TREES, P. KEIM, *et al.* 2015. "Comparative Analysis of Subtyping Methods against a Whole-Genome-Sequencing Standard for *Salmonella Enterica* Serotype Enteritidis." *Journal Clinical Microbiology* 53:212–218.
- EWING, W. H. 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, 536. 4th ed. New York, NY: Elsevier Science Publishing.

- FEBERWEE, A., T. S. DE VRIES, E. G. HARTMAN, J. J. DE WIT, A. R. W. ELBERS, and W. A. DE JONG. 2001. "A Vaccination against Salmonella Enteritidis in Dutch Commercial Layer Flocks with Vaccine Based on a Live Salmonella Gallinarum 9R Strain: Evaluation of Efficacy, Safety, and Performance of Serologic Salmonella Tests." *Avian Disease* 45: 83–91.
- FELSENSTEIN, J. 1981. "Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach." *Journal of Molecular Evolution* 17 (6): 368–376.
- FOSTER, N., LOVELL, M. A., MARSTON, K. L., HULME, S. D., FROST, A. J., BLAND, P. & BARROW, P. A. 2003. "Rapid protection of gnotobiotic pigs against experimental salmonellosis following induction of polymorphonuclear leucocytes (PMN) by avirulent Salmonella." *Infection and Immunity*, 71, p.2182-2191.
- FRYE, J. C., and P. J. FEDORKA-CRAY. 2007. "Prevalence, Distribution and Characterization of Ceftiofur Resistance in Salmonella Enterica Isolated from Animals in the USA from 1999 to 2003." *International Journal of Antimicrobial Agents* 30: 134–142.
- GORDON, R. F., and J. F. TUCKER. 1957. "The Treatment of Chronic Carriers of Salmonella Pullorum with Furazolidone." *British Veterinary Journal* 113: 99–111. doi:10.1016/S0007-1935(17) 46151-3.
- GRIMONT, F. & GRIMONT, P. A. D. 1986. "Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools." *Annales Institut Pasteur/Microbiology*, 137B, p.165-175.
- GRIMONT, P. A. D., and F. WEILL. 2007. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*, 166. 9th ed. Paris. France: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur.
- HALL, W. J., D. H. LEGENHAUSEN, and A. D. MACDONALD. 1949. "Studies on Fowl typhoid.1. Nature and Dissemination." *Poultry Science* 28: 344–362.
- HELLBERG, R.S., HANEY, C.J., SHEN, Y., CHENG, C.M., WILLIAMS-HILL, D.M., MARTIN, W.B. 2012. "Development of a custom 16S rRNA gene library for the identification and molecular subtyping of Salmonella enterica." *Journal of Microbiological Methods*, 91, p. 448-458.
- HELM, R. A., LEE, A G., CHRISTMAN, H. D., MALOY, S. 2003. Genomic rearrangements at *rrn* operons in Salmonella. *Genetics* 165, p. 951–959.
- IMMERSEEL, F. V., D. J. STUDHOLME, V. EECKHAUT, M. HEYNDRIKX, J. DEWULF, I. DEWAELE, V. S. HOOREBEKE, et al. 2013. "Salmonella Gallinarum Field Isolates from Laying Hens are Related to the BRITISH POULTRY SCIENCE 5 Downloaded by [CAPES] at 03:28 11 December 2017 Vaccine Strains SR9R." *Vaccine* 31: 4940–4945.
- JONES, M. A., P. WIGLEY, K. L. PAGE, S. D. HULME, and P. A. BARROW. 2001. "Salmonella Enterica Serovar Gallinarum Requires the Salmonella Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System but Not the Salmonellapathogenicity Island 1 Type III Secretion System for Virulence in Chickens." *Infection and Immunity* 69: 5471–5476.

- JUNIOR, A. B., NETO, O. C. F. 2009. "Salmoneloses. In: Doenças das Aves (2° ed)", FACTA – Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas. p. 444-446.
- KANG, M. S., A. KIM, B. Y. JUNG, M. HER, W. JEONG, Y. M. CHO, J. Y. OH, Y. J. LEE, J. H. KWON, and Y. K. KWON. 2010. "Characterization of Antimicrobial Resistance of Recent Salmonella Enterica Serovar Gallinarum Isolates from Chickens in South Korea." *Avian Pathology* 39: 201–205.
- KANG, M. S., Y. K. KWON, A. KIM, K. M. LEE, B. K. AN, E. A. SONG, J. H. KWON, and G. S. CHUNG. 2011. "Differential Identification of Salmonella Enterica Subspecie Enterica Serovar Gallinarum and Pullorum Based on Polymorphic Regions of glgC and speC Genes." *Veterinary Microbiology* 147: 181–185.
- KANG, M. S., Y. K. KWON, A. KIM, J. Y. L. E. E. OH, M. J. KIM, B. K. AN, E. G. SHIN, J. H. KWON, and C. K. PARK. 2012. "Differential Identification of Salmonella Enterica Serovar Gallinarum Biovars Gallinarum and Pullorum and the Biovar Gallinarum Live Vaccine Strain 9R." *Veterinary Microbiology* 160: 491–495.
- KUMAR, S., G. STECHER, and K. TAMURA. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870–1874.
- KWON, Y. K., A. KIM, M. S. KANG, M. HER, B. Y. JUNG, K. M. LEE, W. JEONG, B. K. AN, and J. H. KWON. 2010. "Prevalence and Characterization of Salmonella Gallinarum in the Chicken in Korea during 2000 to 2008." *Poultry Science* 89 (2): 236–242.
- KWON, H. J., and S. H. CHO. 2011. "Patogenicity of SG 9R, a Rough Vaccine Strain against Fowl Typhoid." *Vaccine* 29: 1311–1318.
- LEE, Y. J., I. P. MO, and M. S. KANG. 2005. "Safety and Efficacy of Salmonella Gallinarum 9R Vaccine in Young Laying Chickens." *Avian Pathology* 36: 362–366.
- LEEKITCHAROENPHON, P., C. FRIIS, F. M. AARESTRUP, and D. W. USSERY. 2012. "Genomic Variation on Salmonella Enterica Core Genes for Epidemiological Typing." *BMC Genomics* 13: 1–11.
- LEEKITCHAROENPHON, P., E. M. NIELSEN, R. S. KAAS, O. LUND, and F. M. AARESTRUP. 2014. "Evaluation of Whole Genome Sequencing for Outbreak Detection of Salmonella Enterica." *Plos One* 9: 1–11.
- LINDSTEDT, B. A., VARDUND, T., AAS, L. & KAPPERUD, G. 2004. "Multiplelocus variable-number tandem-repeats analysis of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis." *Journal of Microbiological Methods*, 59, P. 163-172.
- MACKANESS, G.B. 1964. "The immunological basis of acquired cellular resistance." *Journal of Experimental Medicine*, 120, P. 105-120.
- MATTIELLO, S. P., G. DRESCHER, V. C. BARTH, C. A. FERREIRA, and S. D. OLIVEIRA. 2015. "Characterization of Antimicrobial Resistance in Salmonella

Enterica Strains ISOLATED FROM Brazillian Poultry Production.” *Antonie Van Leeuwenhoek* 108: 1227–1238.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Portaria N° 126 de 03 de Novembro de 1995.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 78 de 3 de Novembro de 2003.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 10 de 11 de Abril de 2013.

MOORE, E. N. 1948. “The efficacy of recent developed sulfonamides against fowl typhoid.” *Poultry Science*, 25, p.307-311.

NOBREGA, P., and R. C. BUENO. 1942. “On the Presence of *Salmonella Gallinarum* in Fresh Eggs of Hens Recognized as Chronic Carriers of Fowl Typhoid.” *Arquivos Do Instituto Biológico* 13: 17–20.

OIE. (2013a). World animal health situation [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformaion/statuslist](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformaion/statuslist) acessado em 06/abril/2015.

OIE. (2013b). World animal health situation [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformaion/statuslist](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformaion/statuslist) acessado em 06/abril/2015.

OKAMURA, M., TACHIZAKI, H., KUBO, T., KIKUCHI, S., SUZUKI, A., TAKEHARA, K., NAKAMURA, M. 2007. “Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and *Gallinarum* biovar Pullorum, using 4 different challenge models.” *Vaccine*, 25, 4837-4844.

PARK, M.; CHOI, K.; KIM, M.; CHAE, J. 2001. “Differential diagnosis of *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum* using PCR-RFLP.” *Journal of Veterinary Science*, 2, p. 213-219.

RIBEIRO, S. A. M., PAIVA, J. B., ZOTESO, F., LEMOS, M. V. & BERCHIERI, A. Jr. 2009. “Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *Gallinarum*.” *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, p. 184-188.

SCALTRITI, E., D. SASSERA, F. COMANDATORE, M. MORGANTI, C. MANDALARI, S. GAIARSA, C. BANDI, et al. 2015. “Differential Single Nucleotide Polymorphism-Based Analysis of an Outbreak Caused by *Salmonella Enterica* Serovar Manhattan Reveals Epidemiological Details Missed by Standard Pulsed-Field Gel Electrophoresis.” *Journal Clinical Microbiology* 53 (4): 1227–1238.

SEO, Y.; LEE S.; SHIN, E.; KIM, S.; JUNG, R.; HAHN, T. 2006. “Pulsed field gel electrophoresis genotyping of *Salmonella gallinarum* and comparison with random amplified polymorphic DNA.” *Veterinary Microbiology*, 115, p.349-357.

- SHAH, D. H., PARK, J. H., CHO, M. R., KIM, M. C., CHAE, J. S. 2005. "Allele-specific PCR method based on rfbS sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: serotype-specific rfbS sequence polymorphism." *Journal of Microbiological Methods*, 60, p. 169-177.
- SHAPIRO, D., STEWART-BROWN, B., HERMES, D., SHARPTON, R. 2011. "Designing an on Farm Biosecurity Program." *A Practical Guide for Managing Risk in Poultry Production*. p. 13-21.
- SHIVAPRASAD, H. L. 2000. "Fowl Typhoid and Pullorum Disease." *Revue Scientifique Et Technique* 19: 405–424.
- SHIVAPRASAD, H. L. & Barow, P. A. 2008. "Pullorum Disease and Fowl Typhoid. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadley AM, McDougald LR, Swayne DE (Editors)." *Diseases of Poultry* (12th ed.), Iowa State Press, Ames, IA. p. 620-634.
- SMITH, H. W. 1955. "Observations on experimental fowl typhoid." *Journal of Comparative Pathology*, 65, p. 37-54.
- SMITH, H. W. 1956. "The use of live vaccines in experimental *Salmonella gallinarum* infection in chickens with observations on their interference effect." *Journal of Hygiene*, 54, p.419-432.
- TAYLOR, A. J., V. LAPPI, W. J. WOLFGANG, P. LAPIERRE, M. J. PALUMBO, C. MEDUS, and D. BOXRUD. 2015. "Characterization of Foodborne Outbreaks of *Salmonella* Enterica Serovar Enteritidis with Whole Genome Sequencing Single Nucleotide Polymorphism-Based Analysis for Surveillance and Outbreak Detection." *Journal Clinical Microbiology* 53: 3334–3340.
- TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZÉBY, J. P. 2005. "Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, p.521-524.
- TRKOV, M., AVGUSTIN, G. 2003." An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*." *International Journal of Food Microbiology*, 80, p. 67–75.
- TUCHILI, L. M.; KODAMA, H.; IZUMOTO, Y.; MUKAMOTO, M.; FUKATA, T.; BABA, T. 1995. "Detection of *Salmonella gallinarum* and *S. typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction." *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57, p.59-63.
- TURNBULL, P. C. B. & SNOEYENBOS, G. H. 1974. "Experimental salmonellosis in the chicken. I. Fate and host response in alimentary canal, liver, and spleen." *Avian Diseases*, 18, p. 153-177.
- UBABEF (UNIÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL). Relatório Anual 2015. Accessed: 09th February, 2016. In: <http://abpa-br.com.br>
- WATTIAU, P.; VAN HESSCHE, M.; SCHLICKER, C.; VEKEN, H. V.; IMBERECHTS, H. 2008. "Comparison of Classical Serotyping and PremiTest Assay for Routine



Identification of Common *Salmonella enterica* Serovars.” *Journal of Clinical Microbiology*, 46, n.12, p.4037-4040.

WILSON, J. E. 1956. “The treatment of carriers of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* with furazolidone.” *The Veterinary Record*, 68, p. 748-751.

WOO, P.C.Y., LAU, S.K.P., TENG, J.L.L., TSE, H., YUEN, K.Y. 2008. “Then and now: use of 16SrDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories.” *Clinical Microbiology and Infection*, 14, p. 908–934.