

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

Estabelecimento de um índice de patogenicidade em amostras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium inoculadas em pintos de um dia de idade.

Dissertação de Mestrado

Diane Alves de Lima

Porto Alegre

2014

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

Estabelecimento de um índice de patogenicidade em amostras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium inoculadas em pintos de um dia de idade.

Autora: Diane Alves de Lima

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na Área de Sanidade Avícola

Orientador: Carlos Tadeu Pippi Salle

Co-orientadora: Kelly Cristina Tagliari de Brito

Porto Alegre

2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Alves de Lima, Diane

Estabelecimento de um índice de patogenicidade em amostras de Salmonella Enteritidis e Salmonella Typhimurium inoculadas em pintos de um dia de idade / Diane Alves de Lima. -- 2014.  
71 f.

Orientador: Carlos Tadeu Pippi Salle.

Coorientadora: Kelly Cristina Tagliari de Brito.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Salmonelose. 2. Inoculação. 3. Virulência. 4. Aves. I. Pippi Salle, Carlos Tadeu, orient. II. Tagliari de Brito, Kelly Cristina, coorient. III. Título.

Diane Alves de Lima

“ESTABELECIMENTO DE UM ÍNDICE DE PATOGENICIDADE EM AMOSTRAS DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS E *SALMONELLA* TYPHIMURIUM INOCULADAS EM PINTOS DE UM DIA DE IDADE.”

Aprovada em 26/02/2014

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

---

Prof. Dr. Felipe de Oliveira Salle

---

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes

---

Prof. Dr. Luiz Cesar Bello Fallavena

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por orientar minhas escolhas e proteger meu caminho.

A minha mãe Erci, pelo exemplo, apoio e dedicação em me ajudar sempre que possível. Ao meu marido, Moisés, que esteve ao meu lado em todos os momentos, demonstrando paciência, cumplicidade, e carinho.

A colega e amiga Roberta Pilatti, pelo companheirismo nas horas difíceis, pelas boas risadas compartilhadas e por todo auxílio prestado ao longo desse período.

Aos queridos colegas do CDPA, Gabriela, Karen, Flávia, Yulli, Gustavo, Daiane, Omar, Zico, Ricardo, Gabriel, Suelle, José, Sara, Leonardo e Prof. Hamilton, por estarem sempre à disposição e auxiliarem em tudo o que era preciso. Agradeço em especial ao Sílvio, pelo empenho na produção daquelas quantidades intermináveis de meios de cultivo.

Agradeço imensamente ao Thales Furian, quem esteve presente em todas fases de desenvolvimento deste trabalho, sempre disponível para esclarecer dúvidas, orientar e corrigir.

As amigas Rafaela pelo incentivo contínuo, e Fabrine por me acolher tantas vezes em sua casa com carinho e dedicação.

A minha co-orientadora, Dra Kelly, e demais integrantes da equipe do Laboratório de Saúde das Aves – IPVDF pelo apoio e disponibilização do local para a realização do estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, pela confiança em mim depositada, assim como pelos ensinamentos e paciência durante a confecção deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

As bactérias do gênero *Salmonella*, especialmente *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, são responsáveis por imensos prejuízos econômicos ao setor avícola, uma vez que produtos como carne de frango e ovos são apontados como a principal fonte desse patógeno em surtos de salmonelose humana. Perdas econômicas na avicultura também estão relacionadas à infecção em aves jovens devido ao desenvolvimento de doença clínica e ao aumento da mortalidade. A patogenicidade de *Salmonella* é considerada complexa e multifatorial necessitando de estudos que possam esclarecer a interação entre patógeno e hospedeiro. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a virulência de 130 isolados de *S. Enteritidis* e 70 de *S. Typhimurium*, inoculadas em pintos de um dia de idade através do estabelecimento de um índice de patogenicidade. Para cada cepa, foram utilizados 10 pintos comerciais da linhagem Cobb provenientes de matrizes de corte com idade superior a 58 semanas. As aves foram inoculadas com 0,2 mL de uma solução contendo aproximadamente  $2 \times 10^8$  UFC de *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium*, através da via intraperitoneal. A mortalidade e a presença de lesões associadas à septicemia foram observadas diariamente durante sete dias. As aves encontradas mortas durante esse período foram necropsiadas e observadas quanto à presença de aerossaculite (A), perihepatite (Ph), pericardite (Pc), peritonite (Pt), onfalite (O) e celulite (C). Para cada lesão foi atribuído o valor de “0,833” se presente e o valor “0” quando ausente. Animais mortos nas primeiras 24 horas pós-desafio receberam a pontuação 10, o que representa o índice máximo. Do segundo ao sétimo dia, houve uma diminuição proporcional da pontuação no tempo de morte (TM) a cada dia em que o animal sobrevivia. O cálculo do índice de patogenicidade de cada pintinho inoculado (IP) obedeceu a seguinte fórmula:  $IP = (TM \times 5) + A + Ph + Pc + Pt + O + C$ . Para obtenção do IP de cada amostra foi realizada a média do IP obtido com as 10 aves inoculadas. A partir dos resultados do trabalho, foi possível atribuir um valor de patogenicidade a cada uma das cepas permitindo classificá-las em grupos de baixa, intermediária e de alta patogenicidade. Os sorotipos analisados neste estudo não diferiram na capacidade de induzir a formação de lesões septicêmicas e elevada mortalidade. Desta forma conclui-se que, tanto *S. Enteritidis* quanto *S. Typhimurium*, são potencialmente capazes de causar doença clínica e mortalidade de forma semelhante aos sorovares adaptados às aves.

Palavras-chave: salmonelose, inoculação, virulência, aves.

## ABSTRACT

*Bacterials of the Salmonella genus, particularly Salmonella (S.) Enteritidis and S. Typhimurium, are responsible for serious economic loss on the poultry industry, once eggs and meat chicken are the principle sources of the pathogens on outbreak of salmonellosis in human. Economic loss on the poultry industry, also is related infection in young chicks due to development clinical disease and increased mortality. The pathogenicity of Salmonella is complex and multifactorial which requires studies that elucidate the interaction between pathogen and host. The present study, was conducted to evaluate the virulence of 130 isolate of S. Enteritidis and 70 of S. Typhimurium, inoculated in 01 day old chicks, through establishment of one index of pathogenicity. For each strain was used 10 commercial lineage Cobb chicks older than 58 weeks old. Chickens were inoculated with 0,2 mL containing approximately  $2 \times 10^8$  CFU of S. Enteritidis or S. Typhimurium by route intraperitoneal. Mortality and lesions associated septicemia were observed daily for seven days. Dead chicks during this period were necropsied and observed as the presence of airsacculitis (A), perihepatitis (Ph), pericarditis (Pc), peritonitis (Pt), omphalitis (O) and cellulitis. For each lesion was attributed the value "0,833" when present and "0" when absent. Dead animals on first 24 hours post-challenge received the punctuation 10. The second to seventh day, there was a proporcional decrease of punctuation on time of death (TM) each day that the chickens survived. The calculation of the index of pathogenicity obeyed the following formula:  $IP = (TM \times 5) + A + Ph + Pc + Pt + O + C$ . For obtainment IP of each strain was realized the average IP obtained with 10 inoculated chickens. Based on results this study, was possible to assign a value of pathogenicity for each isolated allowing to classify them on groups of low, intermediate and high pathogenicity. The sorovars analyzed did not differ on ability to induce septicemic lesions and high mortality. Therefore it is concluded that, such S. Enteritidis as S. Typhimurium, are potentially capable to cause clinical disease and mortality similar to serotypes poultry adapted.*

*Key words: salmonellosis, inoculation, virulence, chickens.*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de células viáveis das amostras testadas ao longo de 24 horas de incubação em caldo BHI a 37° C.....	31
Tabela 2 -	Média dos índices de patogenicidade das cepas de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> analisadas.....	34
Tabela 3 -	Classificação das cepas de <i>S. Enteritidis</i> em grupos de baixa (B), intermediária (I) e alta (A) patogenicidade.....	34
Tabela 4 -	Classificação das cepas de <i>S. Typhimurium</i> em grupos de baixa (B), intermediária (I) e alta (A) patogenicidade.....	34
Tabela 5 -	Presença de aerossaculite induzida pelas cepas de <i>Salmonella</i> de acordo com o sorovar.....	35
Tabela 6 -	Presença de peritonite induzida pelas cepas de <i>Salmonella</i> de acordo com o sorovar.....	36
Tabela 7 -	Presença de onfalite induzida pelas cepas de <i>Salmonella</i> de acordo com o sorovar.....	36
Tabela 8 -	Presença de perihepatite induzida pelas cepas de <i>Salmonella</i> de acordo com o sorovar.....	36
Tabela 9 -	Presença de pericardite induzida pelas cepas de <i>Salmonella</i> de acordo com o sorovar.....	36
Tabela 10 -	Presença de celulite induzida pelas cepas de <i>Salmonella</i> de acordo com o sorovar.....	37
Tabela 11 -	Percentual médio de aves mortas durante o período de observação, de acordo com o sorotipo inoculado.....	37
Tabela 12 -	Comparação entre as médias da mortalidade diária apresentadas pelos isolados de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> .....	37
Tabela 13 -	Percentual de reisolamento de <i>Salmonella</i> observados no primeiro e no sétimo dia pós-inoculação (DPI).....	38



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Curva de crescimento das cepas de <i>Salmonella</i> incubadas em caldo BHI a 37° C, em função de log10 do número de células viáveis por mL.....	32
Figura 2 -	Curva de crescimento das cepas de <i>Salmonella</i> incubadas em caldo BHI a 37° C, em função da densidade óptica com comprimento de onda de 600 nm.....	32
Figura 3 -	Distribuição das cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i> conforme o índice de patogenicidade classificatório.....	33
Figura 4 -	Frequência das lesões apresentadas pelos isolados de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> inoculadas em pintinhos de um dia.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Coleção Americana de Tipos de Cultura
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> – Infusão Cérebro Coração
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEVS	Centro Estadual de Vigilância em Saúde
DL50	Dose Letal média
DPI	Dia Pós-Inoculação
FBS	Fator de Bonificação de Sobrevivência
FT	Fagotipo
H <sub>2</sub> S	Gás Sulfídrico
IP	Ilha de Patogenicidade
IPVDF	Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor
Log <sub>10</sub>	Logarítimo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeo
LSA	Laboratório de Saúde das Aves
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
ppb	parte por bilhão
pH	Potencial hidrogeniônico
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> – Livre de patógeno específico
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i> – Ilha de patogenicidade de <i>Salmonella</i>
SPV	<i>Salmonella virulence plasmid</i> – Plasmídeo de Virulência de <i>Salmonella</i>
SSTT	Sistema de Secreção Tipo Três
UFC	Unidade Formadora de Colônias
XLD	Xilose Lisina Descarboxilase
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>O gênero <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Importância em saúde pública.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Patogênese da infecção na ave.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Fatores relacionados à virulência.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5</b>	<b>Salmonelose nas aves.....</b>	<b>19</b>
2.5.1	Paratifo Aviário.....	20
<b>2.6</b>	<b>Patogenicidade de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> em aves.....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Submissão à Comissão de Ética.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Local de estudo.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>Aves.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4</b>	<b>Amostras bacterianas.....</b>	<b>26</b>
<b>3.5</b>	<b>Preparo do inóculo.....</b>	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Determinação das curvas de crescimento.....</b>	<b>27</b>
<b>3.7</b>	<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>28</b>
<b>3.8</b>	<b>Inoculação.....</b>	<b>28</b>
<b>3.9</b>	<b>Observação dos animais.....</b>	<b>28</b>
<b>3.10</b>	<b>Isolamento bacteriano.....</b>	<b>30</b>
<b>3.11</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
	APÊNDICE A - Amostras de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Salmonella</i> Typhimurium: identificação e origem.....	58
	APÊNDICE B - Exemplo do comportamento de uma das amostras de <i>Salmonella</i> Enteritidis quando submetida aos critérios descritos para determinação do índice de patogenicidade.....	63

APÊNDICE C – Valores dos Índices de Patogenicidade obtidos para as cepas de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> .....	64
ANEXO A – Parecer favorável à pesquisa concedido pela CEUA-IPVDF.....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Desde 2004, o Brasil mantém o posto de maior exportador mundial de carne de frango, atingindo a marca histórica de 3,942 milhões de toneladas em 2011 embarcadas para mais de 150 países. Nesse mesmo ano, a produção brasileira atingiu o recorde de 13,058 milhões de toneladas, garantindo a posição de terceiro maior produtor mundial, somente superada pelos Estados Unidos e pela China (UBABEF, 2012).

Em 2012, o setor avícola nacional enfrentou uma série de dificuldades devido à alta no preço do milho e à escassez de soja. Em consequência disso, houve uma redução de 3,17% da produção de carne de frango em relação ao ano anterior. Uma queda de 0,62% também foi registrada nas exportações que alcançaram 3,918 milhões de toneladas em 2012. No entanto, mesmo frente a esses desafios, o Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e terceiro maior produtor de carne do frango (UBABEF, 2013).

Para alcançar esses elevados índices, a avicultura brasileira apresentou através dos anos elevado desenvolvimento industrial e alteração das características de produção. Dessa forma, por exemplo, houve um aumento do número de animais por metro quadrado. Entretanto, a elevada densidade e consequente proximidade das aves nos galpões proporcionam condições ideais para multiplicação e para a disseminação de patógenos (ANDREATTI FILHO, 2007a). Dentre esses, a *Salmonella* representa um importante problema na produção mundial, tanto para a saúde animal quanto pelo risco à saúde pública. Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre os principais agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos em todo mundo. Alimentos de origem animal, especialmente produtos avícolas, têm sido frequentemente envolvidos em surtos de salmonelose em humanos (BAÚ et al., 2001). A oferta de alimentos seguros à população constitui-se em um relevante desafio a ser alcançado pela indústria avícola.

A presença de *Salmonella* deve ser considerada não apenas pelo risco à saúde pública, mas também pelo potencial patogênico em aves jovens. Enteropatias pré e neonatais podem gerar prejuízos à mucosa intestinal e baixos índices de produção em aves adultas (ITO et al., 2007).

Nesse sentido, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) através da Portaria nº 193 de setembro de 1994 (BRASIL, 1994), e o Programa de Redução de Patógenos (BRASIL, 2003) visando garantir a inocuidade dos alimentos fornecidos à população e

manter a sanidade dos planteis avícolas. Baseados nesses programas diversos estudos têm sido conduzidos na tentativa de esclarecer os fatores de virulência associados à patogenicidade da *Salmonella*. No entanto, esse conhecimento ainda é insuficiente para explicar a complexa interação entre a bactéria e o hospedeiro infectado (MARCUS et al., 2000).

Atualmente o Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) desenvolve uma linha de pesquisa que relaciona a patogenicidade *in vivo* e a presença de genes associados à virulência em diferentes espécies de bactérias. Nessa mesma linha de pesquisa, SOUZA (2010) desenvolveu um trabalho com amostras de *Escherichia coli* em que a caracterização de genes associados à virulência e a sua expressão *in vivo* possibilitaram classificar a patogenicidade de diferentes cepas através da utilização de inteligência artificial.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a virulência de 200 de amostras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, inoculadas em pintos de um dia de idade, e estabelecer um cálculo que expresse o índice de patogenicidade dessas amostras. A partir dos dados gerados nesse trabalho, objetiva-se relacionar os dados de inoculação obtidos com o perfil genético de cada cepa e elaborar modelos matemáticos preditivos sem recorrer aos estudos *in vivo*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e consiste de bacilos curtos, gram-negativos, anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos. Em sua grande maioria são móveis com flagelos peritríquios, exceto *Salmonella Pullorum* (*S. Pullorum*) e *Salmonella Gallinarum* (*S. Gallinarum*). Crescem em caldos simples e meios seletivos para enterobactérias a uma temperatura ótima de 37° C, entretanto, suportam variações entre 5 e 45° C. São produtoras de gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e positivas para o teste de catalase, porém negativas no teste da oxidase, urease, indol e Voges Proskauer (VP). Fermentam glicose, manitol, xilose, dulcitol, ornitina, lisina, vermelho metila e citrato, mas não fermentam lactose, sacarose, malonato ou salicina. (BACK, 2004; GAST, 2008).

Baseado em estudos moleculares, o gênero foi dividido em duas espécies: *Salmonella (S.) enterica* e *S. bongori*. A *S. enterica*, por sua vez, é subdividida em seis subespécies designadas por números romanos: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV e VII), e *indica* (VI). Sorovares pertencente a *S. enterica* II a VII e *S. bongori* são frequentemente encontrados em animais de sangue frio, enquanto sorovares da *S. enterica* subespécie I estão associados a mamíferos e aves, e correspondem a 99,5% dos sorotipos comumente isolados (GRIMONT, WEILL, 2007). Devido à identificação completa ser muito longa, os nomes das espécies e subespécies não são indicados, sendo descrito apenas o gênero e o sorovar, por exemplo, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium, escreve-se *Salmonella Typhimurium* (BRENNER et al, 2000; POPOFF; LE MINOR, 1997).

Segundo o esquema classificatório de Kauffmann-White, existem mais de 2500 sorotipos (sorovares) de *Salmonella*. A classificação tem como base a composição antigênica das mesmas em relação aos seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e ocasionalmente capsular (Vi), o qual está presente apenas nos sorotipos *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin* (FERREIRA, CAMPOS, 2008; OLIVEIRA, 2012). Os antígenos O são designados por números arábicos e permitem classificar a *Salmonella* em grupos sorológicos denominados por letras do alfabeto como A, B, C<sub>1</sub> e D<sub>1</sub> (POPOFF; LE MINOR, 1997).

Para uma classificação mais detalhada, pode ser realizada a diferenciação dentro

do sorotipo através da técnica de fagotipagem, estabelecendo sistemas de tipificação. Dessa forma, é possível identificar o predomínio de fagotipos em uma determinada região, sobretudo para cepas envolvidas em surtos de salmonelose em humanos (OCHOA, RODRÍGUEZ, 2005).

## **2.2 Importância em saúde pública**

A *Salmonella* permanece entre os principais agentes responsáveis por toxinfecções alimentares em diversos países (GAST, 2008). Sua ampla distribuição na natureza está relacionada ao fato dessa bactéria utilizar o trato intestinal de homens e animais como reservatório natural levando a uma grande disseminação do patógeno através das fezes (LANDGRAF; FRANCO, 1996). Grande parte dos sorotipos desse gênero são patogênicos ao homem podendo causar uma ampla variedade de sintomas que incluem desde infecção gastrointestinal até casos graves de septicemia (DARWIN; MILLER, 1999; VIDAL et al., 2003). A gravidade da doença irá depender de fatores como dose, sorovar envolvido, idade e resposta imune do hospedeiro (TURNBULL, 1979; JONES; FALKOW, 1996). Por essa razão, idosos, crianças e pessoas imunocomprometidas podem evoluir para casos mais sérios, devido à menor resistência à infecções (PINTO et al., 2004).

A transmissão da doença ocorre principalmente após a ingestão de alimentos contendo células viáveis da bactéria (HIRSH, 2004). Embora frutas e vegetais tenham sido associados a surtos de salmonelose, produtos de origem animal são a principal fonte de contaminação, especialmente carne de frango, ovos e derivados (CHAI et al., 2012). Em geral, os surtos estão relacionados ao consumo desses alimentos preparados de forma inadequada ou através de contaminação cruzada (CRUMP et al., 2002; REZENDE et al., 2005). A contaminação de carcaças pode ocorrer pela presença da *Salmonella* no ambiente de criação das aves ou durante processo de abate, mesmo quando medidas de boas práticas de higiene e de processamento são seguidas (ALMEIDA et al., 1993). Em relação aos ovos, na maior parte das vezes, a contaminação ocorre pelo contato da casca com a bactéria excretada pelas fezes, a qual alcança o interior do ovo através de fissuras na parede ou no momento da remoção de seu conteúdo. Por outro lado, algumas cepas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* têm a capacidade de colonizar o trato reprodutivo da galinha permitindo que a bactéria seja eliminada diretamente no conteúdo do ovo (HUMPHREY, 2004).



A presença desse micro-organismo em alimentos representa um importante custo, tanto para países desenvolvidos quanto para aqueles em desenvolvimento. A cada ano, cerca de 93,8 milhões de casos de gastroenteritis são causados por espécies de *Salmonella* em todo mundo, resultando em 155.000 mortes (MAJOWICZ et al., 2010). De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos, as *Salmonella* são responsáveis por mais de um milhão de toxinfecções alimentares anualmente, totalizando 15.000 hospitalizações e mais de 350 mortes naquele país (VOETSCH et al., 2004; SCALLAN et al., 2011). Custos anuais estimados nos Estados Unidos em decorrência das salmoneloses ultrapassam um bilhão de dólares, devido a despesas médicas, ausências no trabalho e à queda na produtividade (TAITT et al., 2004).

No Brasil, durante o período de 1999 a 2009, ocorreram 6.349 surtos de doenças transmitidas por alimentos envolvendo 123.917 pessoas. Em apenas metade dos casos, o agente etiológico foi identificado sendo a *Salmonella* o mais prevalente. Dentre os alimentos envolvidos, ovos crus ou mal cozidos constam em primeiro lugar (BRASIL, 2009). Da mesma forma, dados do Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) do Rio Grande do Sul apontam a *Salmonella* como o agente prevalente em surtos reportados entre 1999 e 2007, sendo o sorotipo *S. Enteritidis* o mais isolado (FIGUEIREDO, 2008).

O sorovar *S. Enteritidis* é mais comum entre as enfermidades de origem alimentar em diversos países e tem demonstrado um aumento nos últimos anos, apesar da implementação de programas de erradicação e de medidas de controle (POPPE, 1994; BRADEN, 2006; MARTÍNEZ et al., 2008). A maior parte dos surtos envolvendo esse sorovar estão relacionados ao consumo de ovos contaminados por infecção transovariana (BRADEN, 2006). No entanto, a presença de *S. Enteritidis* em produtos cárneos também apresenta grande importância na disseminação do patógeno e não deve ser ignorada.

No Brasil, diversos estudos demonstram a maior prevalência de *S. Enteritidis* em produtos avícolas. Um estudo realizado em São Paulo pesquisou a presença da bactéria em 150 carcaças de frango congeladas provenientes de diferentes marcas comerciais. O percentual médio de contaminação observado foi de 32%, com predominância do sorotipo *S. Enteritidis* (SANTOS et al., 2000). Rezende e colaboradores (2005) isolaram o agente em 19,8% das 96 carcaças de frango pesquisadas em abatedouro no estado de Goiás, sendo novamente *S. Enteritidis* o sorovar mais encontrado. Alcocer et al. (2006)

detectaram o mesmo sorotipo em 18 dos 25 isolados de *Salmonella* oriundos de carcaças de frango comercializadas no Paraná. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo realizado no Rio Grande do Sul, o qual identificou *S. Enteritidis* em 10 dos 13 isolados de *Salmonella* encontradas em produtos de frango (BAÚ, 2001).

A erradicação da *Salmonella* na cadeia alimentar é pouco provável, visto que estes micro-organismos possuem uma efetiva habilidade de adaptação às mudanças ambientais. Entretanto, a investigação da resposta de *Salmonella* frente a diferentes fatores estressantes pode contribuir para melhoria das estratégias de intervenções auxiliando consumidores e produtores de alimentos (HUMPHREY, 2004).

### **2.3 Patogênese da infecção na ave**

Grande parte das salmoneloses são adquiridas através da ingestão de alimentos ou água contaminadas. Na doença sistêmica, após ser ingerida, a bactéria sobrevive ao pH ácido do estômago e compete com a flora intestinal normal pela disponibilidade das células-alvo (DARWIN; MILLER; 1999). Posteriormente, a *Salmonella* invade as células M (células epiteliais especializadas), coloniza as placas de Peyer no intestino delgado e ganha acesso ao tecido linfoide associado ao intestino (MARCUS et al., 2000). A partir daí, a bactéria sobrevive e replica-se em células fagocíticas, as quais servem como veículo para alcançar os nódulos linfáticos mesentéricos de onde são transportadas ao fígado e ao baço (RAUPACH; KAUFMANN, 2001). A interação da *Salmonella* com o epitélio intestinal resulta em sintomas de diarreia com perda de eletrólitos e inflamação localizada na mucosa (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001). Além disso, a ruptura das células epiteliais infectadas no lúmen intestinal gera o enfraquecimento dos vilos com conseqüente perda da superfície absorptiva (WALLIS; GALYOV, 2000). Fatores como a quantidade de inóculo bacteriano, a virulência da cepa de *Salmonella* e a capacidade da resposta imune do hospedeiro irão determinar a severidade da infecção (JONES; FALKOW, 1996).

### **2.4 Fatores relacionados à virulência**

O mecanismo de patogenicidade da *Salmonella* inclui diversos fatores de virulência que permitem à bactéria invadir, colonizar, sobreviver, multiplicar-se nas células do hospedeiro e causar doença. A supressão de qualquer um desses fatores pode

resultar em diminuição ou perda da virulência (SUZUKI, 1994).

Esses fatores são codificados por genes de virulência que podem estar presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, ou em locais específicos do genoma bacteriano, chamados de ilhas de patogenicidade (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

A habilidade da *Salmonella* em resistir às diferentes condições ambientais do hospedeiro, como por exemplo, pH estomacal, reduzida tensão de oxigênio, temperatura elevada e microbiota local, baseia-se na sua capacidade de regular a expressão de seus genes de virulência em resposta a essas variações (OCHOA, RODRÍGUEZ, 2005).

A adesão da *Salmonella* nas células epiteliais do intestino é mediada por adesinas e consiste no primeiro passo para ocorrência da doença. Essas estruturas reconhecem e interagem com receptores presentes na célula do organismo pelos quais possuem tropismo (OCHOA, RODRÍGUEZ, 2005). Na *Salmonella*, existem três tipos de adesinas implicadas na sua interação com as células alvo: fímbria do tipo I (codificada pelo genes *fim*), fímbria plasmidial (codificada pelos genes *pef*) e a fímbria polar longa (codificada pelo gene *ipf*). De um modo geral, essas fímbrias são responsáveis pelo reconhecimento das microvilosidades dos enterócitos e pela auto-agregação bacteriana (FERREIRA, CAMPOS, 2008).

Após a adesão, proteínas envolvidas com a entrada da *Salmonella* nas células M (codificadas por genes de invasinas) induzem a formação de ondulações na membrana celular. Essas alterações levam a um rearranjo do citoesqueleto de actina com emissão de extensões celulares (pseudópodos) que envolvem o micro-organismo em um vacúolo. Dessa forma, a bactéria é interiorizada por um processo de fagocitose induzida. (HIRSH, 2003; SIRCILI; TRABULSI, 2008). Genes de invasina estão em localizados nas ilhas de patogenicidade presentes no genoma da *Salmonella* (HIRSH, 2003).

Ilhas de patogenicidade (IP) consistem em segmentos de DNA inseridos no cromossomo da bactéria que apresentam características distintas do genoma bacteriano. Grande parte dos fatores de virulência de *Salmonella* estão agrupados em ilhas de patogenicidade, chamados *Salmonella pathogenicity island* (SPI). Entre os sorovares de interesse veterinário foram descritas cinco SPI, sendo que dessas, as ilhas SPI-1 e SPI-2 foram melhor estudadas até o momento (VIEIRA, 2009). SPI-1, presente em todos os sorovares de *Salmonella* (HENSEL, 2004), codifica proteínas que capacitam a invasão de células do hospedeiro através do sistema de secreção tipo III (SSTT). Esse sistema funciona como uma espécie de microseringa possibilitando a passagem de proteínas para o interior da célula intestinal promovendo modificações no citoesqueleto e

arcabouço celular, o que permite a entrada da bactéria (GRASSL; FINLAY, 2008; RYCHLIK et al., 2009).

Um outro tipo de SSTT é codificado por genes da SPI-2. Essas proteínas protegem a bactéria, após ter sido fagocitada, contra os mecanismos de defesa utilizados por fagócitos, como por exemplo, intermediários reativos de oxigênio (VIEIRA, 2009).

SPI-3 contém genes envolvidos na adaptação da *Salmonella* frente às limitações nutricionais encontradas no interior do fagossomo, incluindo baixas concentrações de magnésio, aminoácidos, purinas e pirimidinas (BARROW et al., 2010). SPI-4 codifica um “Sistema de Secreção Tipo I” que secreta proteínas envolvidas na colonização intestinal (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). Enquanto que SPI-5 parece estar associada principalmente reação inflamatória e secreção fluida na mucosa intestinal (MARCUS et al, 2000).

Dois tipos de toxinas têm sido reportadas na patogenicidade de salmonelas paratíficas: endo e enterotoxinas (GAST, 2008). A endotoxina está associada a porção do lipídeo A do lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram-negativas. A interação do LPS com o sistema imune leva a uma resposta caracterizada por febre, vasodilatação e ativação da resposta inflamatória. Em alguns casos, após o reconhecimento do LPS pelo sistema imune inato, ocorre uma produção exagerada de citocinas levando a colapso cardiovascular, alteração hemodinâmica, septicemia e morte (PIAZZA et al., 2008).

Membros do gênero *Salmonella* secretam uma enterotoxina chamada Stn (*Salmonella enterotoxin*) a qual é liberada no lúmen intestinal, resultando em grande perda de água e eletrólitos pelas células intestinais. Essa enterotoxina é similar à toxina do *Vibrio Cholerae* e à enterotoxina termolábil de *Escherichia Coli*. No entanto, sua função na produção de diarreia não está bem esclarecida (HIRSH, 2004).

Outro fator relacionado à patogenicidade de *Salmonella* é a presença de plasmídeos no citoplasma, chamados *Salmonella virulence plasmid* (Spv), encontrados em sorovares com potencial para produzir doença sistêmica, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Genes presentes nesses plasmídeos são necessários a sobrevivência da bactéria em ambientes com restrição de nutrientes e pH ácido, bem como resistência no interior de fagócitos sendo importantes na salmonelose sistêmica (BERCHIERI JÚNIOR, FREITAS NETO, 2009).

## 2.5 Salmonelose nas aves

Infecções aviárias por *Salmonella* geram custos associados aos gastos com medicamentos, perda de animais e redução no potencial produtivo. Por tratar-se de importante problema sanitário, restringem o comércio de aves e de subprodutos em todo mundo. Embora seja difícil calcular esse custo, sabe-se que infecções por *Salmonella* acarretam em enormes prejuízos econômicos (ZANCAN, 1998).

Nas aves, as salmoneloses podem ser classificadas em três enfermidades distintas: pulorose, tifo e paratifo aviário. A pulorose, causada por *Salmonella Pullorum*, é considerada uma doença de aves jovens e pode ocasionar elevada mortalidade. Não é comum observar a doença em aves adultas (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2007). A disseminação pode ocorrer por meio de cama, água e alimentos contaminados, entretanto, a transmissão transovariana é a mais importante perpetuando o agente por muitas gerações. Em geral, as aves apresentam sonolência, amontoamento, dispnéia, perda de apetite, asas caídas, retardo no crescimento e diarreia esbranquiçada aderida às penas próximas a cloaca. O pico de mortalidade ocorre entre a segunda e terceira semana pós-eclosão. Aves sobreviventes podem tornar-se portadoras (GAST, 2008; BERCHIERI JÚNIOR, FREITAS NETO, 2009).

*S. Gallinarum* é o agente do tifo aviário. A doença afeta principalmente aves adultas de fundo de quintal e poedeiras criadas em locais com biossegurança deficiente. A via de transmissão mais comum é a horizontal, mas ocorre também de forma vertical. Entre os sinais clínicos, chama a atenção o aumento da mortalidade, anorexia, prostração e fezes de coloração amarelo-esverdeada. Na necropsia, geralmente as aves apresentam fígado com focos de necrose e coloração bronze-esverdeada, peritonite, pericardite e enterite (BACK, 2004). Tanto a *S. Pullorum* quanto a *S. Gallinarum* são específicas das aves e não representam risco a saúde pública (ANDREATTI FILHO, 2007b).

Salmonelose paratífica, ou paratifo aviário, refere-se à infecção pelos demais sorovares de *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, com exceção de *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* e *S. arizonae* (BACK, 2004). Geralmente, esses sorotipos colonizam o trato intestinal das aves sem causar alterações clínicas, visto que não são específicos de aves. No entanto, conseguem persistir no intestino e, conseqüentemente, contaminar ovos e carcaças (ANDREATTI FILHO, 2007b).

### 2.5.1 Paratifo aviário

Como citado anteriormente, qualquer sorovar pertencente ao gênero *Salmonella* pode estar envolvido na etiologia do paratifo aviário, exceto *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* e *S. arizonae* (BACK, 2004).

*Salmonelas* paratíficas estão distribuídas mundialmente, presente em praticamente todos os países com produção avícola. A prevalência dos sorovares de *Salmonella* em aves varia em diferentes regiões geográficas e com o tempo. Entre os anos 1968 e 1973, no Reino Unido, *S. Typhimurium* representou mais de 40% dos isolamentos em aves, seguido por *S. Enteritidis* com 6%. Após 1980, *S. Enteritidis* fagotipo 4 (FT4) emergiu como sorovar predominante, excedendo os isolamentos de *S. Typhimurium* (BARROW et al., 2010). No Brasil, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* também compreendem os sorovares mais comumente isolados de salmoneloses paratíficas, seguidos por *S. Agona*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, e *S. Mbandaka* (BERCHIERI JÚNIOR, FREITAS NETO, 2009). Em geral, é possível observar uma similaridade entre a distribuição dos diferentes sorovares de *Salmonella* detectados em aves com aqueles identificados em alimentos e humanos (GAST, 2008).

*Salmonella* pode ser isolada de uma ampla variedade de espécies incluindo mamíferos, aves, insetos e répteis. A infecção por esse agente em animais domésticos pode resultar em estado de portador assintomático servindo como fonte de contaminação para diferentes espécies, entre elas as aves (QUINN et al., 2005).

A transmissão pode ocorrer tanto por via vertical quanto horizontal. Transmissão vertical deve-se à contaminação do ovo no trato reprodutivo da galinha, seja no ovário, no oviduto ou no momento da postura, através da passagem pela cloaca e contato com fezes contaminadas. Em geral, apenas sorovares mais adaptados às aves, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* têm a habilidade de invadir tecidos, além do trato intestinal, contaminando os ovos durante a sua formação. (HUMPREY, 2004; SUZUKI, 1994).

A transmissão horizontal pode ocorrer por diversas formas. Ainda no incubatório, as aves podem contaminar-se com resíduos de casca, gema e pintinhos infectados. A contaminação por ração e seus componentes também têm merecido importante destaque na introdução de *Salmonella* em granjas avícolas. Diversos vetores biológicos incluindo o homem, animais domésticos e silvestres, roedores e insetos podem disseminar e manter o agente por longos períodos de tempo no ambiente

(KOPANIC et al., 1994; McCALLISTER et al, 1994; ANDREATTI FILHO, 2007b).

Galinhas e perus são altamente suscetíveis ao agente, no entanto, salmonelas paratíficas já foram isoladas de outras espécies aviárias como pombos, gansos e pássaros em geral (ANDREATTI FILHO, 2007b; BARROW et al., 2010).

Aves adultas raramente apresentam sinais clínicos ou mortalidade em decorrência de infecções paratíficas. Após a colonização do intestino, algumas salmonelas paratíficas conseguem invadir o epitélio intestinal e disseminar-se para vários órgãos internos, incluindo-se fígado, baço, ovário, oviduto, e peritônio (SHIVAPRASAD et al., 1990). Embora a inoculação de altas doses de *S. Enteritidis* em poedeiras frequentemente possa resultar em disseminação sistêmica, as aves podem permanecer clinicamente normais com breves períodos de diarreia leve (GAST, 2008). Dessa forma, mesmo sem manifestações clínicas aparentes, aves maduras podem permanecer produzindo ovos contaminados e excretando a bactéria nas fezes por longos períodos (GAST, BEARD, 1990a; GAST, BEARD, 1990b; BACK, 2004).

Paratifo aviário acomete principalmente aves jovens. Estudos têm demonstrado alta suscetibilidade de pintos recém-nascidos a infecções por *Salmonella*. (GAST; BEARD, 1989; GORHAM et al., 1994; DESMIDT et al., 1997). A maior suscetibilidade de aves recém-eclodidas está relacionada ao fato de apresentarem um sistema imune imaturo e uma microbiota intestinal não formada (BARROW, 1999). A aquisição de microflora protetora compete com *Salmonella* pelos receptores intestinais permitindo assim o desenvolvimento de resistência à bactéria (STAVIRIC et al., 1987).

Geralmente, infecções paratíficas em pintinhos envolvem três estágios. Após a ingestão ocorre a aderência da bactéria à mucosa intestinal resultando em persistente excreção através das fezes (GAST, 2008). O segundo passo envolve a invasão do trato gastrintestinal e multiplicação da *Salmonella* em fagócitos, o que pode prover acesso à circulação sanguínea e eventual disseminação para vários órgãos (BARROW et al., 1987). Na última etapa, ocasionalmente, ocorre extensiva bacteremia levando à alta mortalidade (GAST, 2008).

Na maior parte das vezes, os sinais clínicos do paratifo aviário estão presentes apenas em aves jovens e são semelhantes aqueles causados na pulorose, no tifo aviário ou em qualquer outra doença bacteriana que cause septicemia aguda (BERCHIERI JÚNIOR, FREITAS NETO, 2009). Elevada morbidade e mortalidade podem ser observadas nas duas primeiras semanas de vida com retardo no crescimento e baixo ganho de peso (DHILLON et al., 2001). Os pintinhos apresentam sonolência, asas

caídas, penas arrepiadas, anorexia, amontoamento próximo a fontes de calor, diarreia e empastamento da cloaca (BACK, 2004).

Em muitos casos, infecções paratíficas em pintinhos podem desenvolver quadros agudos de septicemia com elevada mortalidade, porém com pouca ou nenhuma lesão aparente. Em casos onde a doença persiste por mais tempo é possível encontrar enterite severa acompanhada de focos necróticos na mucosa intestinal, cecos com conteúdo caseoso, baço e fígado aumentados, congestos e com pontos necróticos (BERCHIERI JÚNIOR, FREITAS NETO, 2009). O'Brien (1988) e Rampling et al. (1989) relatam a presença de pericardite, fígado com pontos necróticos e saco da gema coagulado e não absorvido após infecção natural por *S. Enteritidis* em pintos com duas semanas de idade. Segundo Gast (2008), hepatite e peritonite fibrinopurulenta, onfalite, tiflites serosa, aerossaculite, pneumonia, panofthalmia, artrite purulenta e rins aumentados e congestos são ocasionalmente observadas.

## **2.6 Patogenicidade de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em aves jovens**

A habilidade em causar lesões em aves pode diferir amplamente entre as cepas de salmonelas paratíficas, resultando em disparidades na frequência em que causam mortalidade e doença clínica em aves jovens (GAST, 2008). Estudos experimentais demonstram que infecções causadas tanto por *S. Enteritidis* quanto *S. Typhimurium*, na primeira semana de vida das aves, estão associadas a elevadas taxas de mortalidade e maior severidade das lesões, sendo observada a colonização do trato gastrointestinal e infecção de órgãos viscerais (GAST; BEARD, 1989; GORHAM et al., 1994; DESMIDT et al., 1997).

Salmonelose sistêmica em aves geralmente são caracterizadas através de estudos de morbidade e mortalidade seguindo a inoculação oral de diferentes sorotipos (BARROW et al., 1999). Variações na patogenicidade podem ser observadas também entre os fagotipos de um determinado sorovar ou ainda entre isolados do mesmo fagotipo (GAST, 2008). Diferenças na patogenicidade entre vários fagotipos de *S. Enteritidis* têm sido amplamente investigadas.

Barrow (1991) observou considerável variação na virulência dos fagotipos (FT) 4, 6, 8 e 13a de *S. Enteritidis* através da inoculação oral de  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em pintinhos recém-nascidos. O percentual de mortalidade variou de 96% para o FT4 a 20% produzida pelo FT13a. As aves apresentaram saco da gema não



absorvido e uma poliserosite evidente, incluindo pericardite e perihepatite, quando foi observada elevada mortalidade com a inoculação de duas cepas do fagotipo FT4.

Diferenças na virulência de isolados classificados dentro dos fagotipos FT 4, 5A e 8 de *S. Enteritidis* também foram reportadas por Dhillon et al. (2001) após inoculação oral de aves *Specific-pathogen-free* (SPF) de um dia de idade com inóculo contendo  $10^6$  UFC de *Salmonella*. Mortalidade entre 15 e 7% foram observadas para os fagotipos FT 5A e FT 4. Entre as lesões macroscópicas, destacaram-se severa inflamação do saco da gema, perihepatite, pericardite, peritonite, aerossaculite e pneumonia induzidas por isolados dos fagotipos FT 4 e FT 8.

Akhtar e colaboradores (2011) demonstraram que isolados de *S. Enteritidis* FT 3A e 35 podem causar leve à moderada patogenicidade em pintos SPF de um dia de idade quando inoculados por via oral. Neste trabalho, o ganho de peso não foi afetado, entretanto, a mortalidade variou entre 10 e 5%, respectivamente. As lesões encontradas na necropsia incluíram presença de fibrina no fígado e coração, aumento dos rins, esplenite e saco da gema não absorvido demonstrando o potencial desses isolados em causar doença clínica e infecção sistêmica.

Ainda que mecanismos importantes de virulência possam estar presentes mais frequentemente em alguns fagotipos do que em outros, nem todos os isolados de um particular fagotipo expressam esses atributos. Em estudo conduzido por Gast e Benson (1995), aves SPF foram inoculadas oralmente com a dose de  $10^8$  UFC de diferentes amostras do FT 4 e outros fagotipos frequentemente isolados nos Estados Unidos (tais como FT 8, 13a, e 14b). A frequência com que as aves apresentaram sinais severos de doença e mortalidade foi significativamente maior com o fagotipo 4. No entanto, alterações relevantes na virulência também foram observadas entre os isolados do mesmo fagotipo.

Variações na patogenicidade de diferentes sorovares de *Salmonella* foram investigadas por Roy e colaboradores (2001) em pintos SPF de um dia de idade oralmente infectados com  $10^7$  UFC de *Salmonella*. Entre os sorotipos avaliados (*S. Pullorum*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Montevideo*, *S. Kentucky* e *S. Enteritidis*), o sorovar *S. Pullorum* apresentou a maior taxa de mortalidade (66,66%), seguido por *S. Typhimurium* (33,33%), *S. Heidelberg* (12,5%) e *S. Enteritidis* FT 4 (8,3%). Esses mesmos sorovares, foram os principais responsáveis por induzir lesões como peritonite, perihepatite, onfalite, tiflíte, pneumonia e enterite nos animais.

Alguns autores classificam as lesões septicêmicas em leves, moderadas e severas

após observar alterações em órgãos internos como fígado, coração, pulmões, intestino e saco da gema (DHILLON et al., 2001; ROY et al., 2001). No entanto, os critérios utilizados para essa classificação não são claros.

Embora a via oral seja amplamente utilizada por mimetizar a rota de infecção natural, diferenças na virulência parecem ser independentes da via de inoculação (GAST, 2008). Em geral, é aceito que três fatores interferem na virulência de *Samonella*: capacidade de adesão aos enterócitos, invasão através da mucosa intestinal e sobrevivência intracelular. Teoricamente, a via parenteral não serviria para testar os dois primeiros fatores, ao contrário da via oral. No entanto, Millemann e colaboradores (2005) demonstraram que o modelo intravenoso levou à mesma classificação na virulência de isolados de *S. Typhimurium* do que o modelo oral, com a vantagem de apresentar uma resposta mais rápida.

Em outros estudos, a via intramuscular tem sido usada para determinar a dose letal para 50% dos animais inoculados (DL50). Este modelo foi utilizado por Guillot et al. (1995) para comparar a suscetibilidade de diferentes linhagens avícolas após inoculação oral e intramuscular de *S. Enteritidis* FT4 em aves com idade de um dia. Os resultados do desafio intramuscular mostraram a mesma posição das linhagens para mortalidade e presença de *Salmonella* spp. em órgãos internos, tais como aqueles obtidos após inoculação oral.

Barrow (1991) também utilizou a via intramuscular para o cálculo da DL50 desses isolados ao analisar a virulência dos FT 4, 6, 8 e 13a de *S. Enteritidis* em pintinhos recém-nascidos infectados por via oral. . Dessa forma, o autor verificou que a cepa do FT 13a foi menos patogênica em ambas as vias de inoculação, o que pode estar relacionado à menor capacidade desse isolado em multiplicar-se nos tecidos após inoculação por via parenteral.

Em estudo conduzido por Martins (2010), a patogenicidade de nove cepas de *S. Typhimurium* foi testada em pintos SPF de um dia através da inoculação de  $10^5$  a  $10^6$  UFC de *Salmonella* pelas vias oral e subcutânea. Observou-se que a infecção por via subcutânea provocou maior mortalidade nos pintinhos, entretanto, a amostra mais patogênica manteve a mesma discriminação entre os dois modelos estudados.

Por conseguinte, os modelos *in vivo* utilizando pintos de um dia de idade variam quanto ao número de animais inoculados, tempo de observação, via de inoculação, presença de lesões e mortalidade, mas não diferenciam as cepas de *Salmonella* individualmente em escores de acordo com a patogenicidade apresentada. Essa

classificação é frequentemente utilizada em testes que avaliam a patogenicidade de *Eschericia coli* em aves. Souza (2006) desenvolveu um teste de avaliação da patogenicidade de *Eschericia coli* em pintinhos de um dia, com inoculação de  $10^8$  UFC por via subcutânea. As aves foram observadas por sete dias quanto à presença de lesões e tempo de mortalidade chegando assim a um escore de zero a dez para cada cepa inoculada.

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Submissão à Comissão de Ética**

O projeto de pesquisa foi conduzido mediante aprovação prévia pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO). Protocolo de número 23/2012 (ANEXO A).

#### **3.2 Local de estudo**

O estudo foi realizado no setor de isolamento avícola do Laboratório de Saúde das Aves do IPVDF localizado no município de Eldorado do Sul, no estado do Rio Grande do Sul.

#### **3.3 Aves**

Frangos de corte com um dia de idade da linhagem Cobb obtidos de uma empresa avícola localizada no sul do Brasil foram utilizados para o experimento. As aves eram provenientes de matrizes de corte comerciais imunizadas contra *S. Enteritidis* com a vacina inativada Salenvac<sup>®</sup> (Laboratório MSD - Saúde Animal), por via intramuscular, nas idades de 14 e 20 semanas. Desta forma, optou-se pela aquisição de aves provenientes de lotes de matrizes a partir de 58 semanas de idade.

As aves foram mantidas em ambiente aquecido a 32° C, de acordo com a zona de conforto térmico para idade, e alojadas em caixas isoladas com as seguintes dimensões: 30 cm de comprimento x 55 cm de altura x 35 cm de largura. Água potável e ração comercial livre de antibióticos eram fornecidas *ad libitum*. Amostras da ração comercial utilizada no estudo foram analisadas quanto à presença de aflatoxina através do teste de ELISA (*Enzyme – Linked Immunosorbent Assay*). Foi constatado um nível médio de 6,65 ppb (partes por bilhão) na ração durante o período de criação das aves.

#### **3.4 Amostras bacterianas**

Foram utilizadas 130 cepas de *Salmonella* Enteritidis e 70 cepas de *Salmonella*

Typhimurium de origem aviária pertencentes à bacterioteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Laboratório de Saúde das Aves do IPVDF. As amostras estavam estocadas em glicerol a 25% e conservadas sob congelamento a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Testes bioquímicos (Ágar Tríplice Açúcar Ferro, meio Motilidade Indol Sulfeto, Ágar Lisina Ferro e caldo ureia) foram realizados para confirmar que todos os isolados eram *Salmonella*. O sorovar de cada amostra, assim como a sua origem e identificação constam no APÊNDICE A.

### 3.5 Preparo do inóculo

Os micro-organismos foram descongelados e cultivados *overnight* em caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI - Oxoid<sup>®</sup>) a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram semeadas em Ágar Xylose-Lisina-Desoxicolato (XLD - Oxoid<sup>®</sup>) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Três colônias de cada cepa foram selecionadas e transferidas para 10 mL de caldo BHI e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para obtenção de culturas contendo aproximadamente  $10^9$  UFC / mL.

### 3.6 Determinação das curvas de crescimento

Para estimar a concentração de células bacterianas em cada cultura, foi estabelecida a correlação entre as leituras de absorvância e a curva de crescimento bacteriano de três cepas de *S. Enteritidis* (SE ATCC 13076, SE 86 IPV e 223 LSA) e duas cepas de *S. Typhimurium* (28 CDPA e 96 LSA) através da contagem em placa ao longo de 24 horas. Quatro colônias características e isoladas em Ágar XLD, de cada uma das amostras, foram transferidas para um frasco erlenmeyer estéril contendo 40 mL de caldo BHI. A cada quatro horas, 3 mL foram retirados para medição da massa celular em espectrofotômetro (SP22, Bioespectro), com comprimento de onda de 600nm, e 1 mL para realização das diluições seriadas em solução salina estéril a 0,85%. A quantificação de UFC/mL foi realizada através do método da gota, segundo MILES e MISRA (1938). Cinco gotas (20  $\mu\text{L}$ ) das diluições a serem quantificadas foram colocadas sobre a superfície de Ágar Nutriente (Oxoid<sup>®</sup>), deixadas para secar em câmara de fluxo laminar e, posteriormente, incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. As medições foram realizadas durante o período de 24 horas de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  para

cada amostra. As colônias foram contadas e expressas em UFC / mL.

### **3.7 Delineamento experimental**

Cada amostra foi inoculada em um grupo de aves formado por 10 pintinhos de frango de corte com 01 dia de idade. Foram realizadas seis baterias de inoculação em que foram testadas entre 32 e 35 cepas, acompanhadas de um grupo controle negativo de 10 animais. Após a recepção e o alojamento em cada bateria, 10 aves eram selecionadas aleatoriamente a fim de se detectar o título de anticorpos para *Salmonella* Enteritidis através do teste de ELISA e para a pesquisa de *Salmonella* spp. através de isolamento bacteriano convencional (BORSOI et al., 2009). Após a coleta de 2 mL de sangue através de punção cardíaca, as aves foram eutanasiadas por meio de desarticulação cervical. Amostras de fígado e de baço foram coletadas para o isolamento bacteriano com o intuito de descartar contaminação prévia dos pintinhos por *Salmonella* spp. O Kit de ELISA *Salmonella* Enteritidis Antibody Test Kit (IDEXX SE – Laboratories, Inc. Westbrook, USA) foi utilizado para os testes sorológicos.

### **3.8 Inoculação**

Os pintinhos com 01 dia de idade foram inoculados com uma solução de 0,2 mL de cada cepa, contendo aproximadamente  $2 \times 10^8$  UFC de *Salmonella* Enteritidis ou de *Salmonella* Typhimurium. As aves foram inoculadas por via intraperitoneal, na porção abdominal esquerda. O grupo controle negativo foi inoculado através da mesma via com 0,2 mL de solução salina 0,85% estéril.

### **3.9 Observação dos animais**

O índice de patogenicidade elaborado neste estudo foi baseado no trabalho desenvolvido por Souza (2006), com algumas modificações. Todas as aves foram observadas durante sete dias consecutivos. Os animais mortos a cada turno eram retirados da sala de isolamento, necropsiados e avaliados quanto à presença das seguintes lesões: aerossaculite, peritonite, onfalite, perihepatite, pericardite e celulite. Em razão de ser conferido um peso cinco à presença das seis lesões observadas, foi

atribuído o valor “0,833” quando a lesão estava presente e o valor “0” quando ausente. Os animais sobreviventes até o sétimo dia foram eutanasiados por deslocamento cervical, necropsiados e avaliados conforme explicado anteriormente.

Além dos critérios descritos previamente, o tempo de morte foi utilizado para determinação de um índice de patogenicidade seguindo a mesma metodologia descrita por Souza (2006). Dessa forma, animais mortos nas primeiras 24 horas após a inoculação receberam a pontuação máxima para todos os itens observados totalizando 10, o que representa o índice máximo. Do segundo ao sétimo dia, houve uma diminuição proporcional da pontuação, e a correção foi calculada da seguinte forma: dividindo o fator 1 por 7, obtém-se o número 0,14 e esse número foi subtraído de 1 a cada dia que o animal sobrevivia. O valor obtido para o tempo de morte foi multiplicado por cinco para dar um peso cinco vezes maior à mortalidade em comparação com as outras lesões citadas anteriormente. Este valor de 0,14 foi denominado Fator de Bonificação da Sobrevivência (FBS).

O índice de patogenicidade individual foi calculado da seguinte forma:

$$\text{IPI} = (\text{TM} \times 5) + \text{A} + \text{Pt} + \text{O} + \text{Ph} + \text{Pc} + \text{C}$$

Onde:

IPI = Índice de Patogenicidade Individual

TM = Tempo de Morte

A = Aerossaculite

Pt = Peritonite

O = Onfalite

Ph = Perihepatite

Pc = Pericardite

C= Celulite

Para calcular o índice de patogenicidade da amostra inoculada em 10 pintinhos, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$IP = \frac{\sum(IPI)}{N}$$

Onde:

N = número de pintos inoculados

No APÊNDICE B é apresentado um exemplo do comportamento de uma das cepas de *Salmonella* Enteritidis quando submetida aos critérios descritos anteriormente.

### 3.10 Isolamento bacteriano

Foram coletados o fígado e o baço de cada ave morta durante o primeiro dia de observação, assim como das aves que sobreviveram até o sétimo dia. O material foi inoculado em caldo BHI e incubado a 37° C por 24 horas. Após este período, 100 µL da solução foram transferidos para 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e incubados a 42° C por 24 horas. Posteriormente, cada amostra foi plaqueada em Ágar XLD e Ágar Verde Brilhante (suplementado com novobiocina a 4%) e incubados novamente por 24 horas a 37° C. Duas colônias características de *Salmonella* foram submetidas a provas bioquímicas e a reação de aglutinação com soro polivalente somático para *Salmonella* (BORSOI et al., 2009).

### 3.11 Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através do software *GraphPad Prism® for Windows*, versão 6,03. Nesse programa, os dados foram submetidos a testes de estatística não paramétrica (teste de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Qui-Quadrado e Wilcoxon Signed Rank) em razão dos dados não seguirem uma distribuição normal.



Para formular a equação de regressão polinomial foi utilizado o software Stata® versão 12.1.

#### 4 RESULTADOS

Na Tabela 1 estão descritos os valores obtidos para o número de células bacterianas viáveis por mL de meio de cultura ao longo de 24 h de incubação a 37° C. A partir desses dados, observa-se que os isolados SE 86 IPV e 223 CDPA atingiram a concentração máxima de bactérias após 16 horas de crescimento ( $2,8 \times 10^9$  e  $3,0 \times 10^9$  UFC/mL, respectivamente). O mesmo ocorreu com as cepas SE ATCC 13076, 28 CDPA e 96 LSA após 20 horas de incubação, apresentando o equivalente a  $2,1 \times 10^9$ ,  $2,0 \times 10^9$  e  $1,8 \times 10^9$  UFC/mL, na devida ordem.

Tabela 1 - Número de células viáveis das amostras testadas ao longo de 24 horas de incubação em caldo BHI a 37° C

Tempo (h)	SE ATCC 13076	SE 86 IPV	223 CDPA	28 CDPA	96 LSA
0	$2,5 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$
4	$1,7 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$
8	$1,3 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,1 \times 10^8$
12	$1,5 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
16	$2,0 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
20	$2,1 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
24	$2,1 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$

Nas Figuras 1 e 2 estão representadas as curvas de crescimento das cepas testadas em função do  $\text{Log}_{10}$  do número de células viáveis por mL e da densidade óptica, respectivamente. Todos os micro-organismos testados atingiram a fase estacionária dentro de oito horas de cultivo, sendo que a mesma apresentou duração de pelo menos 24 horas mantendo a concentração bacteriana em  $10^9$  UFC/mL (Figura 1). A densidade óptica observada acompanhou o aumento do número de células microbianas viáveis de forma semelhante entre as amostras testadas (Figura 2).

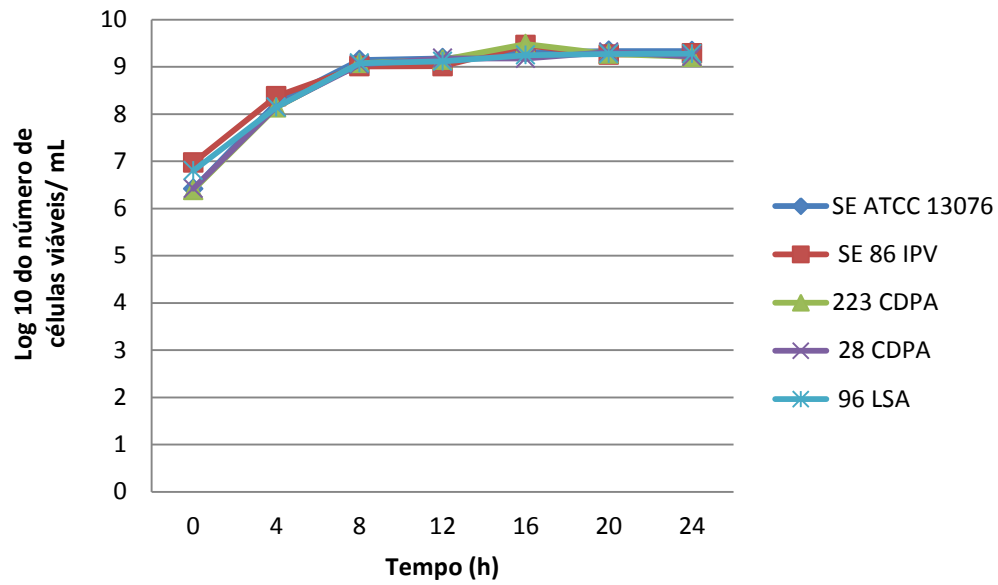


Figura 1 - Curva de crescimento das cepas de *Salmonella* incubadas em caldo BHI a 37°C, em função de Log<sub>10</sub> do número de células viáveis por mL.

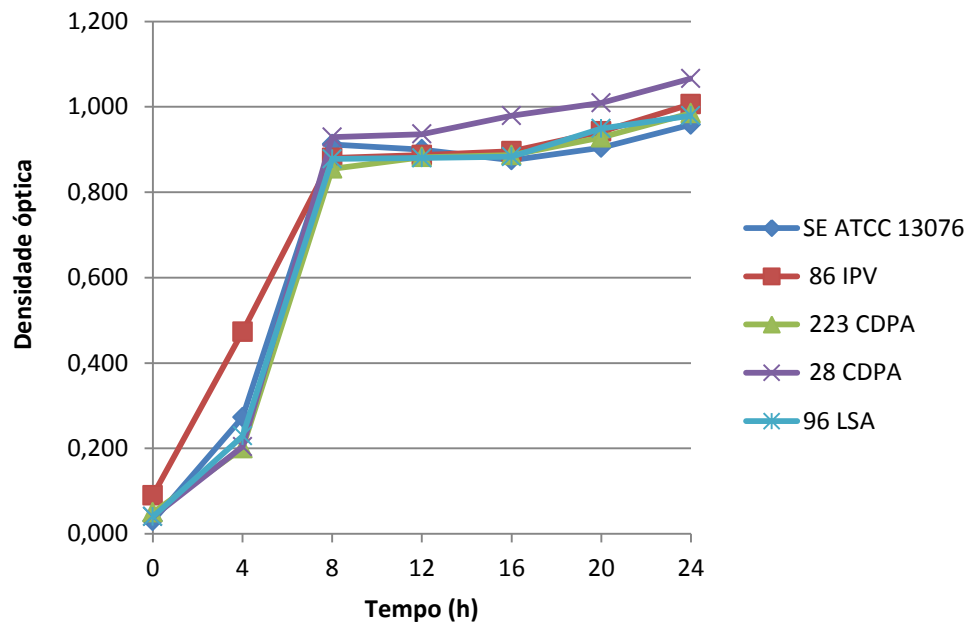


Figura 2 - Curva de crescimento das cepas de *Salmonella*, incubadas em caldo BHI a 37°C, em função da densidade óptica com comprimento de onda de 600 nm.

A partir dos dados descritos na Tabela 1 e dos valores obtidos para densidade óptica (Figura 2), foi possível formular uma equação de regressão polinomial ( $R^2 = 0,99$ ), capaz de estimar a concentração do número de bactérias viáveis existentes após 24 horas de incubação, por mL de meio de cultura, sendo ela:

$$Y^{24} = 8,83 + 40,85 (X^{24})$$

A Figura 3 exibe a distribuição do total de amostras de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* classificadas no experimento de acordo com o índice de patogenicidade. Observa-se uma distribuição relativamente homogênea com predominância de amostras com índices de patogenicidade entre 5 e 8.

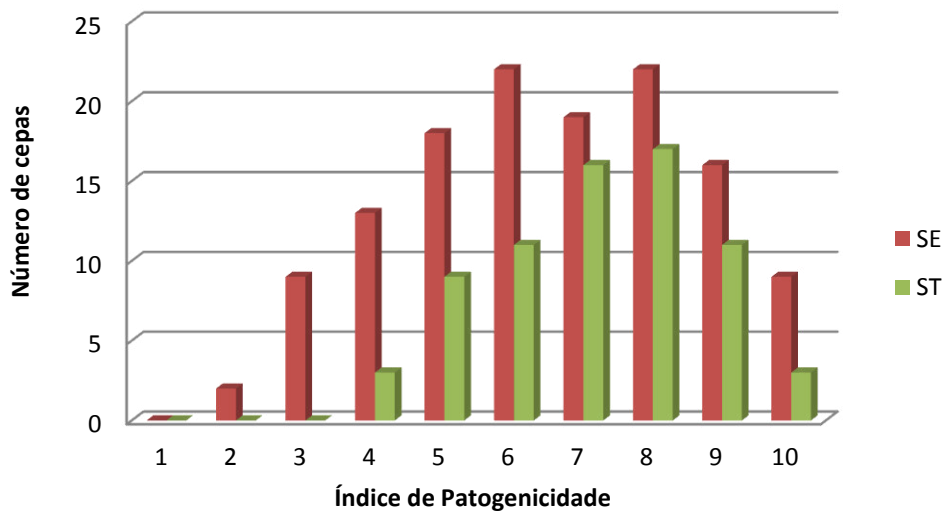


Figura 3 - Distribuição das cepas de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium conforme o índice de patogenicidade classificatório.

A Tabela 2 mostra que não houve diferença estatística entre as médias dos índices de patogenicidade dos isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, embora essas últimas cepas apresentassem uma média superior.

Tabela 2 – Média dos índices de patogenicidade das cepas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* analisadas.

Sorovar	Número de cepas	Índice de Patogenicidade*
<i>S. Enteritidis</i>	130	6,55 ± 1,97 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i>	70	7,08 ± 1,56 <sup>a</sup>

Mann-Whitney Test

Letras iguais na mesma coluna significam diferença não significativa (P= 0,082)

\*média ± desvio padrão

As cepas analisadas neste estudo foram ajustadas em três diferentes grupos de acordo com o índice de patogenicidade classificatório (1 a 10). As categorias foram divididas em: baixa patogenicidade, para cepas com o índice variando entre 1 e 4, intermediária patogenicidade, entre 5 e 7, e alta patogenicidade quando o índice permaneceu entre 8 e 10. Dessa forma, foi possível observar diferenças estatísticas entre os grupos de acordo com o sorovar estudado, conforme mostram as Tabelas 3 e 4. Uma exceção ocorreu entre os grupos de baixa e intermediária patogenicidade das cepas de *S. Typhimurium*, os quais não demonstraram diferença significativa possivelmente em razão do pequeno número de amostras presentes nessa classificação (Tabela 4).

Tabela 3 – Classificação das cepas de *Salmonella* Enteritidis em grupos de baixa (B), intermediária (I) e alta (A) patogenicidade.

Grupo	Número de cepas	Índice de Patogenicidade*
A	47	8,72 ± 0,77 <sup>a</sup>
I	59	6,01 ± 0,80 <sup>b</sup>
B	24	3,46 ± 0,66 <sup>c</sup>

Kruskal - Wallis Test

\* Média ± desvio padrão

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa (P<0,0001)

Tabela 4 – Classificação das cepas de *Salmonella* Typhimurium em grupos de baixa, intermediária e alta patogenicidade.

Grupo	Número de cepas	Índice de Patogenicidade*
A	31	8,55 ± 0,68 <sup>a</sup>
I	36	6,19 ± 0,82 <sup>b</sup>
B	3	4 ± 0 <sup>b, c</sup>

Kruskal - Wallis Test

\* Média ± desvio padrão

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa (P<0,0001)

A Figura 4 demonstra que as lesões de maior ocorrência foram aerossaculite, peritonite e onfalite, independente do sorovar inoculado. No entanto, observa-se que celulite foi a lesão menos frequente para os isolados de *S. Enteritidis*, enquanto que para as cepas de *S. Typhimurium* foi a pericardite.

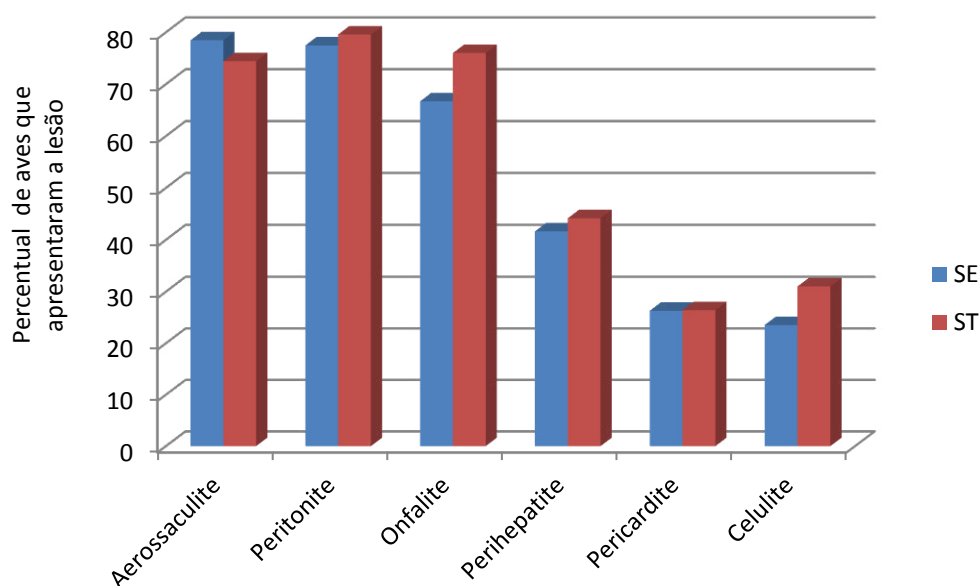


Figura 4 – Frequência das lesões apresentadas pelos isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* inoculados em pintinhos de um dia.

As Tabelas numeradas de 5 a 10 mostram a comparação entre os valores de mediana de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* obtidos para cada lesão, as quais foram analisadas separadamente. Nesse caso, a mediana representa o número de aves que exibiram a lesão em um grupo de 10 animais. Nota-se que não houve diferença significativa entre os sorotipos no desenvolvimento das lesões avaliadas.

Tabela 5 – Presença de aerossaculite induzida pelas cepas de *Salmonella* de acordo com o sorovar.

Sorovar	Nº cepas	Aerossaculite*
<i>S. Enteritidis</i>	130	8 ± 1,79 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i>	70	7 ± 1,62 <sup>a</sup>

Kruskal – Wallis Test

Letras iguais na mesma coluna representam diferença não significativa ( $P > 0,05$ )

\* Mediana ± desvio padrão

Tabela 6 – Presença de peritonite induzida pelas cepas de *Salmonella* de acordo com o sorovar.

Sorovar	Nº cepas	Peritonite*
S. Enteritidis	130	8 ± 1,63 <sup>a</sup>
S. Typhimurium	70	8 ± 1,32 <sup>a</sup>

Kruskal – Wallis Test

Letras iguais na mesma coluna representam diferença não significativa (P > 0,05)

\* Mediana ± desvio padrão

Tabela 7 – Presença de onfalite induzida pelas cepas de *Salmonella* de acordo com o sorovar.

Sorovar	Nº cepas	Onfalite*
S. Enteritidis	130	7 ± 1,67 <sup>a</sup>
S. Typhimurium	70	8 ± 1,45 <sup>a</sup>

Kruskal – Wallis Test

Letras iguais na mesma coluna significam diferença não significativa (P > 0,05)

\* Mediana ± desvio padrão

Tabela 8 – Presença de perihepatite induzida pelas cepas de *Salmonella* de acordo com o sorovar.

Sorovar	Nº cepas	Perihepatite*
S. Enteritidis	130	4 ± 2,59 <sup>a</sup>
S. Typhimurium	70	4 ± 2,16 <sup>a</sup>

Kruskal – Wallis Test

Letras iguais na mesma coluna representam diferença não significativa (P > 0,05)

\* Mediana ± desvio padrão

Tabela 9 – Presença de pericardite induzida pelas cepas de *Salmonella* de acordo com o sorovar.

Sorovar	Nº cepas	Pericardite*
S. Enteritidis	130	2 ± 1,94 <sup>a</sup>
S. Typhimurium	70	3 ± 1,79 <sup>a</sup>

Kruskal – Wallis Test

Letras iguais na mesma coluna representam diferença não significativa (P > 0,05)

\* Mediana ± desvio padrão

Tabela 10 – Presença de celulite induzida pelas cepas de *Salmonella* de acordo com o sorovar.

Sorovar	Nº cepas	Celulite*
S. Enteritidis	130	2 ± 1,94 <sup>a</sup>
S. Typhimurium	70	3 ± 2,02 <sup>a</sup>

Kruskal – Wallis Test

Letras iguais na mesma coluna representam diferença não significativa (P > 0,05)

\* Mediana ± desvio padrão

Na tabela 11 são apresentados os percentuais médios de mortalidade obtidos para os isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* durante o período de observação. Embora maior mortalidade tenha sido observada entre as cepas de *S. Typhimurium*, não houve diferença estatística quando os dados foram comparados entre os dois grupos.

Tabela 11 – Percentual médio de aves mortas durante o período de observação, de acordo com o sorotipo inoculado.

Sorovar	% Mortalidade
S. Enteritidis	69,5 (904/1300) <sup>a</sup>
S. Typhimurium	74,9 (524/700) <sup>a</sup>

Teste do Qui-Quadrado

Letras iguais na mesma coluna representam diferença não significativa (P > 0,05)

Os valores de média da mortalidade diária entre os dois sorovares são comparados na Tabela 12. É possível observar que a média de aves encontradas mortas a cada dia não apresentou diferença significativa entre os dois grupos. Outra observação constatada é que houve uma diminuição gradativa na mortalidade diária no transcorrer dos setes dias de acompanhamento das aves. Esse comportamento foi semelhante para os dois sorotipos.

Tabela 12 – Comparação entre as médias da mortalidade diária apresentada pelos isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

Sorovar	Nº cepas	Dia de morte						
		1	2	3	4	5	6	7
SE	130	3,99 ± 2,4 <sup>a</sup>	1,75 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,2 <sup>a</sup>
ST	70	4,47 ± 2,6 <sup>a</sup>	1,77 ± 1,5 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,2 <sup>a</sup>

Mann – Whitney Test

Letras iguais na mesma coluna representam diferença não significativa (P ≥ 0,122)

Média ± desvio padrão



*Salmonella* spp. foi detectada em todas as amostras de fígado e de baço coletadas das aves que morreram no primeiro dia pós-inoculação. O mesmo não ocorreu com as aves que sobreviveram até o sétimo dia pós-inoculação, as quais apresentaram menores taxas de reisolamento, conforme demonstra a Tabela 13. Não houve detecção de *Salmonella* spp em nenhum dos animais pertencentes aos grupos do controle negativo.

Tabela 13 – Percentual de reisolamentos de *Salmonella* observados no primeiro e no sétimo dia pós-inoculação (DPI).

DPI	Recuperação de <i>Salmonella</i> a partir do fígado e do baço	
	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
1	100 (518 / 518) <sup>a</sup>	100 (313 / 313) <sup>a</sup>
7*	94,9 (376 / 396) <sup>b</sup>	90,3 (158 / 175) <sup>b</sup>

Wilcoxon Signed Rank Test

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

\* Aves sobreviventes no sétimo DPI.

As amostras de soro coletadas das aves de 01 dia antes do desafio com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram negativas para presença de anticorpos para *S. Enteritidis*. Nenhuma lesão foi observada nestas aves durante a necropsia, e os espécimes de fígado e de baço foram negativos para o isolamento de *Salmonella* spp.

## 5 DISCUSSÃO

Quando inoculadas em um meio de cultura líquido, grande parte das bactérias apresenta uma curva de crescimento padrão, a qual pode ser representada graficamente pelo logaritmo do número de bactérias em função do tempo. Essa curva é composta por quatro fases distintas: fase lag, fase exponencial de crescimento, fase estacionária e fase de declínio (KONEMAN et al., 2001). No presente trabalho, embora a concentração máxima de células tenha sido alcançada em tempos diferentes durante o período de incubação, todas as cinco amostras testadas atingiram a fase estacionária a partir de 8 horas de cultivo. Durante essa fase, a qual teve duração de pelo menos 24 horas, todas as cepas apresentaram uma concentração de  $10^9$  UFC/mL. Dessa forma, sugere-se que, partindo da diluição de uma colônia pura de *Salmonella* em 10 mL de caldo BHI e posterior incubação à 37° C por 24 horas, é possível obter um inóculo contendo aproximadamente  $10^9$  UFC/mL.

Segundo Tortora et al. (2012) o crescimento bacteriano pode ser estimado de forma indireta através da turbidimetria, ou seja, pela medição da turbidez de um meio líquido em espectrofotômetro. Seguindo essa técnica, foi possível estabelecer a correlação existente entre as leituras de absorbância e o número de bactérias viáveis observadas ao longo de 24 horas. Resultado semelhante foi obtido por Santiago (2010), a qual desenvolveu uma equação de regressão para estimar a concentração bacteriana de *Corynebacterium Pseudotuberculosis* após correlacionar a curva de crescimento com os valores de densidade óptica obtidos ao longo de 48 horas. A estimativa do número de células viáveis de *Salmonella* a partir da análise das curvas de crescimento no presente estudo tornou mais prática e rápida a quantificação dos inóculos previamente ao desafio das aves.

Infecções por *Salmonella* spp são frequentemente subclínicas, resultando em portadores crônicos, enquanto que outros hospedeiros podem desenvolver doença septicêmica. Além de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, os quais são adaptados às aves, outros sorovares como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* podem frequentemente causar manifestações clínicas severas e elevada mortalidade, principalmente em aves recém-nascidas (POPPE et al., 1993; BARROW et al., 1994).

Diversos trabalhos têm caracterizado a salmonelose sistêmica em galinhas através de estudos que avaliam a morbidade e a mortalidade causada pelos diferentes sorovares e fagotipos de *Salmonella* (BARROW et al., 1999). Em geral, esses estudos

avaliam a presença de sinais clínicos, lesões e taxa de mortalidade como resultados isolados o que não permite a classificação das cepas de acordo com a sua patogenicidade. Nesse sentido, o experimento realizado possibilitou mensurar a intensidade de virulência das amostras testadas e agrupá-las de acordo com a patogenicidade apresentada.

Os valores médios dos índices de patogenicidade de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* não diferiram significativamente entre si. No entanto, quando as amostras foram agrupadas conforme o índice classificatório (de 1 a 10) em categorias de baixa, intermediária e alta patogenicidade, foi possível estabelecer diferenças estatísticas entre os grupos. A única exceção ocorreu entre os grupos de intermediária e de baixa patogenicidade das cepas de *S. Typhimurium*, os quais não apresentaram diferença estatística. É possível que esse resultado seja consequência do pequeno número de cepas classificadas no último grupo.

O agrupamento das amostras em diferentes categorias de acordo com o índice de patogenicidade demonstra que houve variação na virulência seguindo a inoculação pela via intraperitoneal. Possivelmente, tais variações estejam relacionadas à capacidade desses patógenos em sobreviver e replicar nos tecidos do hospedeiro, particularmente dentro de células da linhagem fagocítica. (BARROW et al., 1987; SUZUKI, 1994; THOMPSON et al., 2011). Segundo BARROW et al. (1994), após inoculação intravenosa, a localização primária dos micro-organismos foi observada em órgãos do sistema reticuloendotelial. Nesses órgãos, o local exato da multiplicação bacteriana é controverso, entretanto, os macrófagos são tradicionalmente apontados como o principal tipo celular alvo no hospedeiro (BERCHIERI et al., 2001). Esta possibilidade foi sugerida por Barrow et al. (1987) que, ao determinar a virulência de *S. Typhimurium* em aves jovens, isolou a bactéria principalmente de órgãos do sistema reticuloendotelial logo após a infecção.

Após a captação da bactéria pela célula fagocítica, a *Salmonella* inibe o processamento e a apresentação de antígenos, além de produzir enzimas que inativam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (OCHO, RODRÍGUEZ; 2005). Esses mecanismos são induzidos por sistemas multifatoriais de virulência codificados por genes presentes nas ilhas de patogenicidade (LUCAS; LEE, 2000; OSMAN et al., 2010; THOMPSON et al., 2011). Dessa forma, alterações nos fenótipos de virulência das amostras de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* testadas no presente trabalho podem ser resultado de uma possível diversidade em seus genótipos.

Gast e Beard (1989) sugerem que o desenvolvimento de doença sistêmica requer mais que a simples passagem do micro-organismo através da barreira intestinal, já que uma elevada taxa de reisolamento de *S. Typhimurium* foi obtida do fígado e do baço dos animais inoculados, mesmo em grupos que apresentaram baixas ou nenhuma mortalidade. Possivelmente, alguns fatores de virulência atuam após invasão, interagindo com as defesas do organismo para determinar o subsequente curso da infecção e a taxa de eliminação do patógeno dos órgãos internos (GAST; BEARD 1989; PORTER; CURTIS III; 1997).

Entre as lesões observadas nesse estudo, aerossaculite, peritonite e onfalite foram as mais frequentes para ambos os sorotipos estudados. Esses achados são similares àqueles descritos por diversos autores após infecção experimental de *S. Enteritidis* (GORHAM et al., 1994; DESMIDT et al., 1997; DHILLON et al., 1999; ALISANTOSA et al., 2000; DHILLON et al., 2001; AKTHAR et al., 2011; AKTHAR et al., 2013) e *S. Typhimurium* (ROY et al., 2001) em aves SPF entre um e 28 dias de idade.

Por outro lado, a lesão de menor frequência entre os isolados de *S. Typhimurium* foi a pericardite. De forma semelhante, Dhillon et al. (2001) reportam que pericardite não foi um aspecto consistente entre as aves encontradas mortas após inoculação de diferentes fagotipos de *S. Enteritidis*. No entanto, esses achados diferem daqueles observados por Roy e colaboradores (2001) os quais descrevem a presença de exsudato fibrinoso no pericárdio entre as principais alterações macroscópicas observadas em aves SPF 14 dias após inoculação de  $10^7$  UFC de *S. Typhimurium* por via oral.

Em relação às cepas de *S. Enteritidis*, a celulite foi a lesão menos frequente. Esse resultado está de acordo com o esperado, uma vez que bactérias do gênero *Salmonella* spp não são descritas na literatura entre os agentes etiológicos dessa patologia sob condições naturais (KUMOR et al., 1998; FALLAVENA, 2009). Segundo Norton et al (1999), para que ocorra a celulite aviária, é indispensável que a pele esteja lesada. Nesse sentido, é possível que a ocorrência dessa lesão no presente estudo esteja relacionada a via de inoculação utilizada, a qual permitiu ao patógeno invadir e multiplicar-se no tecido subcutâneo com conseqüente produção das placas fibrinopurulentas observadas no local.

Ao analisar as lesões individualmente, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de mediana obtidos para o grupo de isolados de *S. Enteritidis* e de *S. Typhimurium*. A partir disso, sugere-se que ambos os sorotipos têm o

potencial de causar lesões septicêmicas, da mesma forma que os sorovares específicos das aves. Essa hipótese é sugerida por autores que encontraram as mesmas alterações macroscópicas após infecção experimental de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Pullorum* (GAST; BENSON, 1995; ALISANTOSA et al., 2000; DHILLON et al., 2001; ROY et al., 2001).

A mortalidade induzida pelos sorovares de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em aves de um dia após infecção experimental apresenta grande variação na literatura. Roy et al. (2001) reportaram um percentual de mortalidade igual a 33,33% para *S. Typhimurium*, 12,5% para *S. Enteritidis* FT4 e 8,5% para o FT8. Osman e colaboradores (2010) também observaram maior mortalidade causada pelo mesmo sorovar, porém com valores percentuais superiores: 88% para *S. Typhimurium* e 72% para os isolados de *S. Enteritidis*. Já Milleman et al. (2005) reportaram uma mortalidade variando entre 0 e 36% para cepas de *S. Typhimurium* e entre 6 e 17% para os isolados de *S. Enteritidis*, demonstrando que a mortalidade não está relacionada apenas ao sorovar. Embora a maior mortalidade no estudo tenha sido observada entre os isolados de *S. Typhimurium* (74,9%) do que entre aqueles pertencentes ao grupo da *S. Enteritidis* (69,5%), os dados não apresentaram diferença significativa quando comparados estatisticamente. Com base nesses achados e nos resultados obtidos no atual trabalho, sugere-se que a virulência não é determinada apenas pelo sorotipo ou fagotipo de *Salmonella* spp, mas especialmente por características individuais de cada cepa (SMITH; TUCKER, 1980). Além disso, a severidade ou mesmo a ausência de sinais clínicos estão relacionados a uma série de outros fatores como dose, via de inoculação, idade, linhagem e estado imune do hospedeiro (GAST; BEARD, 1989; GORHAM et al., 1991; DESMIDT et al., 1997; AKTHAR et al., 2011; AKTHAR et al., 2013).

Quando avaliada a mortalidade diária entre os sorovares, observou-se maior número de mortes nos primeiros dias pós-inoculação com gradativa redução até o final do período de acompanhamento. Esse resultado justifica o uso do Fator de Bonificação de Sobrevivência, descrito por Souza (2006), uma vez que a pontuação atribuída ao dia de morte diminui proporcionalmente a cada dia que o animal sobrevive. Dessa forma, quanto mais precoce foi a capacidade do isolado em causar a morte dos animais, maior valor de patogenicidade foi atribuído a ele.

No presente trabalho, *Salmonella* spp foi recuperada de todas as amostras coletadas dos animais mortos nas 24 horas pós-inoculação. De acordo com Duchet-

Suchaux et al.(1995), a detecção de *Salmonella* no fígado e no baço de aves mortas sugere que a morte tenha ocorrido por salmonelose. Segundo Barrow e Lovell (1988), após desafio intramuscular de *S. Pullorum* em aves jovens, os micro-organismos foram rapidamente encontrados no fígado e no baço, principais locais de multiplicação. Posteriormente, o patógeno dissemina-se para outros órgãos resultando em doença sistêmica e consequentemente, em lesões nos tecidos invadidos, além de mortalidade (BARROW et al., 1987; AKTHAR et al., 2011).

Uma redução significativa na taxa de reisolamento bacteriano foi constatada em relação aos espécimes coletados dos animais sobreviventes ao sétimo dia pós-desafio. Similar ao presente estudo, Gorham et al (1991) reportam a recuperação de *S. Enteritidis* a partir de todos os tecidos (pulmões, fígado, baço, órgãos reprodutivos e cérebro) coletados das aves mortas durante o experimento. No entanto, entre os animais eutanasiados no sétimo dia pós-inoculação, o percentual médio de reisolamento variou entre 60 e 80%. A razão para a menor persistência de *Salmonella* nas aves sobreviventes, bem como a queda gradual da mortalidade observada, não está clara.

Ao avaliar o papel do sistema imune humoral na infecção por *S. Enteritidis* FT4, Desmidt et al. (1998), verificaram uma diminuição da quantidade do patógeno presente nos órgãos de aves bursectomizadas durante as primeiras semanas pós-inoculação, apesar da falta de anticorpos. De acordo com os autores, essa observação aponta para o envolvimento de outros mecanismos importantes para a supressão de *Salmonella*, especialmente a imunidade mediada por células. Resultados semelhantes foram encontrados por Beal et al. (2006) após desafio de aves bursectomizadas com *S. Typhimurium*. Segundo os autores, células B e anticorpos não são requeridos na eliminação da infecção primária por *Salmonella*. Conforme Bumstead e Barrow (1993), a habilidade do sistema fagocítico em conter a doença na fase inicial é o principal responsável pela resistência das aves à salmonelose.

O estabelecimento de critérios para avaliar a patogenicidade de diferentes cepas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* permite atribuir a cada isolado um escore, o qual poderá ser utilizado, em trabalhos futuros, para relacionar o perfil fenotípico ao perfil genético de cada cepa através do uso de inteligência artificial. Dessa forma, seria possível monitorar o comportamento a campo destes patógenos, bem como seu impacto na produção avícola. Além disso, a informação gerada a partir desses dados possibilitaria maior respaldo no momento de propor medidas de controle realmente eficazes.

## 6 CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer a correlação existente entre a turbidez do inóculo e o número de células viáveis de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* por mL de meio de cultura.

A metodologia proposta para calcular o índice de patogenicidade refletiu em diferenças significativas quando as cepas foram classificadas em grupos de alta, intermediária e de baixa patogenicidade, permitindo a sua utilização para classificação futura das cepas.

Não houve diferença estatística entre os sorotipos na capacidade de induzir a formação de lesões ou causar mortalidade em pintinhos de um dia. Desta forma concluiu-se que, tanto *S. Enteritidis* quanto *S. Typhimurium*, são potencialmente capazes de causar doença clínica e mortalidade de forma semelhante aos sorovares específicos das aves.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K.M.P.; VIDOTTO, M.C.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.2, 2006. p.414-420

ALISANTOSA, B.; SHIVAPRASAD, H.L.; DHILLON, A.S.; JACK, O.; SCHABERG, D.; BANDLI, D. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* phage types 4, 8 and 23 in specific pathogen free chicks. **Avian Pathology**, v.29, 2000. p.583-592

ALMEIDA, P.F.; SILVA, E.N.; ALMEIDA, R.C.C. Contaminação e disseminação de carcaças de frango em abatedouros. **Higiene Alimentar**, v.7, n.27, 1993. p.12-17

AKHTAR, A.; BEJO, M.H.; ZAKARIA, Z.; OMAR, A.R.; KHAIARANI-BEJO, S. Pathogenicity of *Salmonella Enteritidis* Phage Types 6A and 7 in experimentally infected chicks. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v.23, n.5, 2013. p. 1290-1296

AKHTAR, A.; BEJO, M.H.; OMAR, A.R.; ZAKARIA, Z.; KHAIARANI-BEJO, S. Pathogenicity of *Salmonella Enteritidis* Phage Types 3A and 35 after experimental infection of White Leg Horn Chicks. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v.21, n.4, 2011. p. 770-777

ANDREATTI FILHO, R.L. Prevenção de Doenças: Biosseguridade em Avicultura. In:\_\_\_\_\_. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2007. a

ANDREATTI FILHO, R.L. Paratifo Aviário. In:\_\_\_\_\_. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2007. b

BACK, A. **Manual de Doenças das Aves**. Cascavel: Coluna do Saber, 2004. p.222.



BARROW, P.A.; LOVELL, M.A. Association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of *Salmonella* Pulum. **Journal of General Microbiology**, v.134, 1988. p.2307-2316

BARROW, P.A.; HUGGINS, M.B.; LOVELL, M.A. Host Specificity of *Salmonella* Infection in Chickens and Mice Is Expressed In Vivo Primarily at the Level of the Reticuloendothelial System. **Infection and Immunity**, v.62, n.10, 1994. p.4602-4610.

BARROW, P.A.; HUGGINS, M.B.; LOVELL, M.A.; SIMPSON, J.M. Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella* Typhimurium infection in chickens . **Research in Veterinary Science**, v.42, n.2, 1987. p.194-199

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

BARROW, P.A.; LOVELL, M.A.; MURPHY, C.K.; PAGE, K. *Salmonella* infection in a commercial line of ducks; Experimental studies on virulence, intestinal colonization and immune protection. **Epidemiology and Infection**, v.123, 1999. p. 121-132

BARROW, P.A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4.ed. Blackwell Publishing, 2010. p.231-265

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.2, 2001. p.303-307

BEAL, R.K.; POWERS, C.; DAVISON, T.F.; BARROW, P.A.; SMITH, A.L. Clearance of Enteric *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Chickens Is independent of B-Cell Function. **Infection and Immunity**, 74, n. 2, 2006. p.1442-1444

BERCHIERI JÚNIOR, A.; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C.K.; BARROW, P.A. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian Pathology**, v.30, 2001. p.297-310

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F (Ed). **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 435-454

BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G.H. Salmoneloses Aviárias In: ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2007. BERCHIERI JÚNIOR 328p.

BORSOI, A.; SANTIN, E.; SANTOS, L.R.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v.88, 2009. p.750-758

BRADEN, C. R. *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* and eggs: A national epidemic in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, 2006. p.512–517

BRASIL. Portaria Ministerial, DAS nº 193, de 19 de setembro de 1994. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, 22 set. 1994. Nº182, seção I, p.14309.

BRASIL. Instrução Normativa, SDA nº 70, de 06 de outubro de 2003. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, 10 out. 2003. Nº197, seção I, p.9

BRASIL. Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 – 2009. **Secretária de Vigilância em Saúde**, 2009. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br> >. Acesso em 16 de julho de 2012.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R.G; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Georgia, v. 38, n.7, 2000. p.2465-2467

BUMSTEAD, N.; BARROW, P. Resistance to *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* and *S. enteritidis* in Inbred Lines of Chickens. **Avian Diseases**, v.37, 1993. p.189-193

CARVALHO, A.C.F.B; CORTEZ, A.L.L. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. **Ars Veterinaria**, v. 19, n.1, 2003. p.057-062

CHAI, S.J.; WHITE, P.L.; LATHROP, S.L.; SOLGHAN, S.M.; MEDUS, C.; McGLINCHEY, B.M.; D'ANGELOM.T.; MARCUS, R.; MAHON, B.E. *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis: increasing incidence of domestically acquired infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 5, 2012. p.488-497

CRUMP, J.A.; GRIFFIN, P.M.; ANGULO, F.J. Bacterial Contamination of Animal Feed and Its Relationship to Human Foodborne Illness. **Clinical Infectious Diseases**, v.35, 2002. p.859-865

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, 1999. p.405-428

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

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.56, 1997. p.99-109.

DHILLON, A.S.; ALISANTOSA, B.; SHIVAPRASAD, H.L.; JACK, O.; SCHABERG, D.; BANDLI, D. Pathogenicity of *Salmonella Enteritidis* Phage Types 4, 8 and 23 in Broiler Chicks. **Avian Diseases**, v.43, 1999. p. 506-515

DHILLON, A.S.; SHIVAPRASAD, H.L.; ROY, P.; ALISANTOSA, B.; SCHABERG, D.; BANDLI, D.; JOHNSON, S. Pathogenicity of Environmental Origin Salmonellas in Specific Pathogen-Free Chicks. **Poultry Science**, v.80, 2001. p.1323-1328

DUCHET-SUCHAUX, M.; LÉCHOPIER, P.; MARLY, J.; BERNARDET, P.; DELAUNAY, R.; PARDON, P. Quantification of Experimental Salmonella enteritidis Carrier State in B13 Leghorn Chicks. **Avian Diseases**, v.39, 1995. p-796-803

FALLAVENA, L.C.B. Fisiopatologia do sistema tegumentar. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F (Ed). **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009. p.191-211

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. Salmonella. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 329-338

FIGUEIREDO, D. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos/RS. **Centro Estadual de Vigilância em Saúde/ RS**, 2008. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> >. Acesso em 08 de novembro de 2013.

GAST, R.K. Salmonella infections. In: SAIF, Y. M. (Ed.). **Disease of Poultry**. 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p.619-631.

GAST, R.K.; BEARD, C.W. Age-Related Changes in the Persistence and Pathogenicity of *Salmonella typhimurium* in Chicks. **Poultry Science**, v.68, 1989. p.1454-1460.

GAST, R.K.; BEARD, C.W. Production of Salmonella enteritidis-Contaminated Eggs by Experimentally Infected Hens. **Avian Diseases**, v.34, 1990. p.438-446 a

GAST, R.K.; BEARD, C.W. Isolation of Salmonella enteritidis from Internal Organs of Experimentally Infected Hens. **Avian Diseases**, v.34, 1990. p. 991-993 b

GAST, R.K.; BENSON, S.T. The Comparative Virulence for Chicks of Salmonella enteritidis Phage Type 4 Isolates and Isolates of Phage Types Commonly Found in Poultry in the United States. **Avian Diseases**, v.39, 1995. p. 567-574

GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; VAUGHAN, E.; LAMBERT, H.; ABEL, J.; PERT, B. Gross and Microscopic Lesions in Young Chickens Experimentally Infected with *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v.38, 1994. p.816-821

GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; LAMBERT, H.; VAUGHAN, E.; PERT, B.; ABEL, J. Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens. **Avian Pathology**, v.20, 1991. p.433-437

GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, n. 1, 2008. p.22-26

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella***. France: Institute Pasteur, 2007.

GUILLOT, J.F.; BEAUMONT, C.; BELLATIF, F.; MOULINE, C.; LANTIER, F.; COLIN, P.; PROTAIS, J. Comparison of resistance of various poultry lines to infection by *Salmonella enteritidis*. **Veterinary Research**, v.26, 1995. p. 81-86

HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity island encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, v.3, 2001. p.549-559

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity island of *Salmonella enterica*. **Internacional Journal of Medical Microbiology**, v. 294, 2004. p.95-102

HENZLER, D.J.; OPITZ, H.M.; The role of the mice in the epizootiology of *Salmonella enteritidis* infection on chicken layer farms. **Avian Diseases**, v.36, 1992. p.625-631

HIRSH, D. C. *Salmonella*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 69-73

HIRSH, D.C.; MACLACHLAN, N.J.; WALKER, R.L. **Veterinary Microbiology**. 2.ed. Ames, Iowa: Blackwell, 2004. p. 69-74

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, 2004. p.504-509

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.C.; OKABAYASHI, S.M. Saúde Intestinal em Frangos de Corte. 2007. **Circular Técnica Aviação do Brasil**. Disponível em: <<http://www.agrocerosross.com.br/imagem/noticias/348CircularTecnicaAviagem-200711.pdf>> Acesso em 27 de janeiro de 2010.

JONES, B.D.; FALKOW, S. SALMONELLOSIS: Host Immune Responses and Bacterial Virulence Determinants. **Annual Review Immunology**, v.14, 1996. p.553-561.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p

KOPANIC, R.J.; SHELDON, B.W.; WRIGHT, C.G. Cockroaches as vectors of *Salmonella*: Laboratory and Field trials. **Journal of Food Protection**, v.7, n.2, 1994. p.125-131

KUMOR, L.W.; OLKOWSKI, A.A.; GOMIS, S.M.; ALLAN, B.J. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene and possible human health implications. *Avian Diseases*, v.42, n.2, 1998. p.285-291

LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G. Doenças microbianas de origem alimentar provocadas por enteropatógenos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.17, 1996. p.57-76

LUCAS, R.L.; LEE, C.A. Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v. 36, n.5, 2000. p. 1024-1033

MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, 2010. p.882-889

MARCUS, S.L.; BRUMELL, J.H.; PFEIFER, C.G.; FINLAY, B.B. Salmonella pathogenicity island: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v.2, 2000. p.145-156.

MARTÍNEZ, E.V.; VARELA, M.C.; CEVALLOS, C.; HERNANDEZ-PEZZI, G.; TORRES, A.; ORDOÑES, P. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2004-2007 (excluye brotes hídricos). **Boletín Epidemiológico Semanal**, v.16, n. 12, 2008. p. 241-252.

MARTINS, L.M. **Dissertação de Mestrado**. Estudo de Salmonella Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão. São Paulo: USP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada à Zoonoses, 2010.

McALLISTER, J.C.; STEELMAN, C.D.; SKEELES, J.K. Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleptera: Tenebrionidae) for Salmonella Typhimurium (Eubacteriales, Enterobacteriaceae). **Journal of Medical Entomology**, v.31, 1994. p. 369-372

MILES, A.A.L.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**, v.38, 1938. p. 732-749

MILLEMANN, Y.; MOULINE, C.; LAFONT, J.P.; CHASLUS-DANCLA, E. Bacteraemia assays in chickens as a model for the evaluation of the virulence of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis strains. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.156, n.2, 2005. p. 70-76

NORTON, R.A.; MACKLIN, K.S.; McMURTREY, B.L. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broilers chickens. **Avian Diseases**, v.43, n.2, 1999. p.320-325

O'BRIEN, J.D.P. *Salmonella enteritidis* infection in broilers chickens. **Veterinary Record**, v. 122, 1988. p. 214.

OCHOA, I.M.F; RODRÍGUEZ, A.V. Mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* sp. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.47, 2005. p. 25-42

OLIVEIRA, S. J. **Guia bacteriológico prático: microbiologia veterinária**. 3.ed. Canoas: Ulbra, 2012. p.260

OSMAN, K.M.; MOUSSA, I.M.I.; YOUSEF, A.M.M.; ALY, M.A.; RADWAN, M.I.; ALWATHNANI. Pathogenicity of Some Avian *Salmonella* Serovars in Two Different Animal Models: SPF-Chickens and Balb/c Mice. **Environment and We International Journal of Science and Technology**, v. 5, 2010. p. 65-78

PIAZZA, R.M.F.; MENEZES, C.A.; SONOBE, M.H. Fatores de Virulência II: Toxinas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.149-162

PINTO, U.M.; CARDOSO, R.R.; VANETTI, M.C.D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. **Revista de Nutrição**, v.17, n.3, 2004. p.319-326

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Antigenic Formulas of *Salmonella* Serovars. **WHO Collaboring Center for Reference and Research on Salmonella**. France: Institute Pasteur, 7.ed. 1997.

POPPE, C.; DEMCZUK, W.; McFADDEN, K.; JOHNSON, R.P. Virulence of *Salmonella enteritidis* Phagotypes 4, 8 and 13 and Other *Salmonella* spp. For Day-old Chicks, Hens and Mice. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, 1993. p.281-287

POPPE, C. *Salmonella enteritidis* in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, 1994. p.1-5

PORTER, S.B.; CURTIS III, R. Effect of *inv* Mutations on *Salmonella* Virulence and Colonization in 1-Day-Old White Leghorn Chicks. **Avian Diseases**, v. 41, 1997. p. 45-57



QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.C.; LEONARD, F.C.; MAGUIRE, D. Família *Enterobacteriaceae*. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artemed, 2005. p.115-130

RAMPLING, A.; UPSON, R.; WARD, L.R.; ANDERSON, J.R.; PETERS, E.; ROWE, B. Salmonella Enteritidis phage type 4 infection of broiler chickens: a hazard to public health. **The Lancet**, 1989. p.436-438

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S.H.E. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate Salmonella vaccine strain? **Microbes and Infection**, v.3, 2001. p.1261-1269

REZENDE, C.S.M.; MESQUITA, A.J; ANDRADE, M.A.; LINHARES, G.F.C.; MESQUITA, A.Q.; MINAFRA, C.S. Sorovares de Salmonella isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.100, 2005. p.199-203

ROY, P.; DHILLON, A.S.; SHIVAPRASAD, H.L.; SCHABERG, D.M.; BANDLI, D.; JOHNSON, S. Pathogenicity of Different Serogroups of Avian Salmonellae in Specific-Pathogen-Free Chickens. **Avian Diseases**, v.45, 2001. p. 922-937

RYCHLIK, I.; KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; VOLF, J.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; KUMMER, V.; IMRE, A.; SZMOLKA, A.; NAGY, B. Virulence potencial of five major pathogenicity island (SPI-I to SPI-5) of Salmonella enterica serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology**, v.9, n.268, 2009. p.1-9

SANTIAGO, L.B. **Dissertação de Mestrado**. Avaliação in vitro e in vivo de antisséptico e desinfetantes no controle da linfadenite caseosa. Ceará: Universidade Estadual Vale do Acaraú. Programa de Mestrado em Zootecnia, 2010.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.;TAUXE, R.V.; WINDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L.; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, 2011. p.7-15.

SIRCILI, M.P.; TRABULSI, L.R. Fatores de virulência I: Adesão, Invasão e Sideróforos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 329-338

SHIVAPRASAD, H.L.; TIMONEY, J.F.; MORALES, S.; LUCIO, B.; BAKER, R.C. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in Laying Chickens. I. Studies on Eggs Transmission, Clinical Signs, Fecal Shedding, and Serologic Responses. **Avian Diseases**, v.34, 1990. p.548-557

SMITH, H.W.; TUCKER, J.F. The viulence of *Salmonella* strains for chickens: their excretion by infected chickens. **Journal of Hygiene**, v.84, 1980. p.479-488

SOUZA, G. F. **Dissertação de Mestrado**. Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frango de corte. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2006.

SOUZA, G. F. **Tese de Doutorado**. Estabelecimento de um novo índice de patogenicidade para amostras de *E. coli* e o uso de redes neurais artificiais. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2010.

SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.21, 1994. p.89-105

STAVRIC, S.; GLEESON, T.M.; BLANCHFIELD, B.; PIVNICK, H. Role of adhering microflora in the competitive exclusion of *Salmonella* from young chicks. **Journal of Food Protection**, v. 50, 1987. p.928-932

TAITT, C.R.; SHUBIN, Y.S.; ANGEL, R. Detection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by using a Rapid, Array-Based Immunosensor. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.1, 2004. p.152-158

THOMPSON, J.A.; LIU, M.; HELAINET, S.; HOLDENT, D.W. Contribution of the PhoP/Q regulon to survival and replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in macrophages. **Microbiology**, v. 157, 2011. p. 2084-2093

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Crescimento Microbiano. In:\_\_\_\_\_. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p.156-183

TURNBULL, P.C.B. Food poisoning with special reference to Salmonella – its epidemiology, pathogenesis and control. **Clinical Gastroenterology**, v.8, 1979. p.663-713

UBABEF. **União Brasileira de Avicultura**. Relatório Anual Ubabef 2013. Disponível em: < <http://www.ubabef.com.br/publicacoes> > Acesso em 01 nov. 2013.

UBABEF. **União Brasileira de Avicultura**. Relatório Anual Ubabef 2012. Disponível em: < <http://www.ubabef.com.br/publicacoes> > Acesso em 23 out. 2013.

VAN ASTEN, A.J.A.M.; VAN DIJK, J.E. Distribution of “classic” virulence factor among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, 2005. p.251-259

VIDAL, E.J.; SILVA, P.R.M.; NOGUEIRA, R.S.; BONASSER FILHO, F.; HERNANDEZ, A.V. Liver abscess due to *Salmonella* Enteritidis in a returned traveler with HIV infection: case report and review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.2, 2003. p.115-117

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, 2009. p.406-414

VOETSCH, A.C.; VAN GILDER, T.J.; ANGULO, F.J.; FARLEY, M.M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P.R.; DENEEN, V.C.; TAUXE, R.V. FoodNet estimate of the burden of illness caused by non-typhoidal *Salmonella* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n.3, 2004. p.127-134

WALLIS, T.S.; GALYOV, E.E. Molecular basis of Salmonella-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 36, n.5, 2000. p.997-1005.

ZANCAN, F.T. **Dissertação de Mestrado**. Pesquisa de Salmonella em caixas de transportes de pintos de um dia de vida. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciência de Agronomia e Veterinária do Campus Jaboticabal, 1998.

APÊNDICE A – Amostras de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (ST): identificação e origem.

Identificação bacterioteca	Sorovar	Origem
1 CDPA	SE	Pinto 1d
3 CDPA	SE	SI*
4 CDPA	SE	SI
6 CDPA	SE	SI
11 CDPA	SE	SI
15 CDPA	SE	Fígado
18 CDPA	SE	SI
19 CDPA	ST	SI
20 CDPA	SE	SI
22 CDPA	SE	SI
23 CDPA	SE	SI
24 CDPA	SE	Suabe de arrasto
25 CDPA	SE	SI
28 CDPA	ST	SI
30 CDPA	SE	SI
31 CDPA	SE	Carcaça
35 CDPA	SE	Carcaça
36 CDPA	SE	Carcaça
37 CDPA	SE	SI
39 CDPA	SE	SI
40 CDPA	SE	SI
41 CDPA	SE	SI
43 CDPA	SE	SI
45 CDPA	SE	SI
54 CDPA	SE	Ração
57 CDPA	ST	SI
63 CDPA	ST	Ovo orgânico
64 CDPA	ST	SI
92 CDPA	SE	SI
93 CDPA	SE	SI
94 CDPA	SE	SI
95 CDPA	SE	SI
96 CDPA	SE	SI
98 CDPA	SE	SI
99 CDPA	SE	SI
103 CDPA	SE	Ovos bicados
166 CDPA	SE	SI
167 CDPA	SE	Asa
168 CDPA	SE	Asa
169 CDPA	SE	Peito
170 CDPA	SE	Dorso
171 CDPA	SE	Coxa/Sobre

Identificação da Bacterioteca	Sorovar	Origem
172 CDPA	SE	Asa
173 CDPA	SE	Peito
174 CDPA	SE	Dorso
175 CDPA	SE	Dorso
176 CDPA	SE	Asa
177 CDPA	SE	Dorso
178 CDPA	SE	Dorso
179 CDPA	SE	Dorso
180 CDPA	SE	Dorso
181 CDPA	SE	Asa
182 CDPA	SE	Suabe de arrasto
183 CDPA	SE	Coxa/sobre
184 CDPA	SE	Coxa/sobre
185 CDPA	SE	Suabe de arrasto
186 CDPA	SE	Suabe de arrasto
187 CDPA	SE	Suabe de arrasto
188 CDPA	SE	Suabe de arrasto
189 CDPA	SE	Suabe de arrasto
190 CDPA	SE	Suabe de arrasto
191 CDPA	SE	Suabe de arrasto
192 CDPA	SE	Pinto 1d
193 CDPA	SE	Pinto 1d
194 CDPA	SE	Pinto 1d
195 CDPA	SE	Pinto 1d
196 CDPA	SE	Pinto 1d
197 CDPA	SE	Pinto 1d
198 CDPA	SE	Pinto 1d
199 CDPA	SE	Pinto 1d
200 CDPA	SE	Pinto 1d
201 CDPA	SE	Pinto 1d
202 CDPA	SE	Pinto 1d
203 CDPA	SE	Matriz
204 CDPA	SE	Pinto 1d
205 CDPA	SE	Pinto 1d
206 CDPA	SE	Pinto 4d
207 CDPA	SE	Suabe de arrasto
208 CDPA	SE	Pintos 7d
209 CDPA	SE	Suabe de arrasto
210 CDPA	SE	Suabe de arrasto
211 CDPA	SE	Suabe de arrasto
212 CDPA	SE	Suabe de arrasto
213 CDPA	SE	Suabe de arrasto
214 CDPA	SE	Suabe de arrasto
215 CDPA	SE	Suabe de arrasto
216 CDPA	SE	Ração

Identificação da Bacterioteca	Sorovar	Origem
217 CDPA	SE	Suabe de arrasto
218 CDPA	SE	Suabe de arrasto
219 CDPA	SE	Pintos 1d
220 CDPA	SE	Ceco
221 CDPA	SE	Saco gema
222 CDPA	SE	Pinto 1d
223 CDPA	SE	Pinto1 d
224 CDPA	SE	Pinto1 d
225 CDPA	SE	Pinto1 d
226 CDPA	SE	Pinto 1d
227 CDPA	SE	Pinto1 d
228 CDPA	SE	Suabe de arrasto
229 CDPA	SE	Suabe de arrasto
230 CDPA	SE	Suabe de arrasto
231 CDPA	SE	Suabe de arrasto
232 CDPA	SE	Suabe de arrasto
233 CDPA	SE	Pinto 1d
234 CDPA	SE	Pinto 1d
235 CDPA	SE	Suabe de arrasto
236 CDPA	SE	Suabe de arrasto
237 CDPA	SE	Suabe de arrasto
238 CDPA	SE	Suabe de arrasto
239 CDPA	SE	Fígado 1d
240 CDPA	SE	Ceco 1d
241 CDPA	SE	Ceco 1d
242 CDPA	SE	Suabe de arrasto
243 CDPA	SE	SI
244 CDPA	SE	SI
248 CDPA	ST	SI
249 CDPA	ST	SI
253 CDPA	ST	SI
SE ATCC	SE	ATCC 13076
SE IPV 86	SE	SI
42 LSA	SE	SI
76 LSA	SE	SI
81 LSA	ST	SI
82 LSA	SE	SI
86 LSA	ST	Mecônio
87 LSA	ST	Saco gema
88 LSA	ST	Suabe de arrasto
89 LSA	ST	Suabe de arrasto
90 LSA	ST	Suabe de arrasto
91 LSA	ST	Suabe de arrasto
92 LSA	ST	Mecônio
93 LSA	ST	Saco gema

Identificação da Bacterioteca	Sorovar	Origem
94 LSA	ST	Mecônio
95 LSA	ST	Suabe de arrasto
96 LSA	ST	SI
97 LSA	ST	Suabe de arrasto
98 LSA	ST	Suabe de arrasto
99 LSA	ST	Suabe de arrasto
100 LSA	ST	Suabe de arrasto
101 LSA	ST	Suabe de arrasto
103 LSA	ST	Suabe de arrasto
104 LSA	ST	Suabe de arrasto
105 LSA	ST	Suabe de arrasto
106 LSA	ST	Suabe de arrasto
107 LSA	ST	Suabe de arrasto
108 LSA	SE	Suabe de arrasto
109 LSA	SE	Suabe de arrasto
110 LSA	ST	Suabe de arrasto
112 LSA	SE	Suabe de arrasto
115 LSA	SE	Suabe de arrasto
116 LSA	ST	Suabe de arrasto
117 LSA	SE	Mecônio
118 LSA	SE	Suabe de arrasto
119 LSA	ST	Suabe de arrasto
120 LSA	SE	Mecônio
122 LSA	ST	Suabe de arrasto
123 LSA	ST	Suabe de arrasto
124 LSA	ST	Suabe de arrasto
125 LSA	ST	Suabe de arrasto
126 LSA	ST	Suabe de arrasto
127 LSA	ST	Suabe de arrasto
128 LSA	ST	Suabe de arrasto
129 LSA	SE	Saco gema
130 LSA	ST	Ceco
131 LSA	ST	Baço
132 LSA	ST	Bursa
133 LSA	ST	Intestino
134 LSA	ST	Suabe de arrasto
135 LSA	ST	Suabe de arrasto
136 LSA	ST	Suabe de arrasto
137 LSA	ST	Suabe de arrasto
138 LSA	ST	Suabe de arrasto
139 LSA	ST	Suabe de arrasto
140 LSA	ST	Suabe de arrasto
141 LSA	ST	Suabe de arrasto
142 LSA	ST	Suabe de arrasto
143 LSA	ST	Suabe de arrasto



Identificação da Bacterioteca	Sorovar	Origem
144 LSA	ST	Saco gema
146 LSA	ST	Suabe de arrasto
147 LSA	ST	Suabe de arrasto
148 LSA	ST	Suabe de arrasto
149 LSA	ST	Suabe de arrasto
150 LSA	ST	Saco gema
151 LSA	ST	Farinha vísceras
152 LSA	ST	Suabe de cloaca
153 LSA	ST	Suabe de cloaca
154 LSA	ST	Suabe de cloaca
155 LSA	ST	Suabe de cloaca
156 LSA	ST	Suabe de cloaca
157 LSA	ST	Suabe de cloaca
158 LSA	SE	Suabe de arrasto
164 LSA	SE	Suabe de cloaca
165 LSA	ST	CMS*
166 LSA	ST	CMS
169 LSA	SE	Intestino
170 LSA	ST	Intestino
171 LSA	SE	Intestino
172 LSA	SE	Intestino
173 LSA	SE	Intestino
174 LSA	SE	Fígado/baço

\*SI – Sem informação

\*\* CMS – Carne mecanicamente separada

APÊNDICE B – Exemplo do comportamento de uma das amostras de *S. Enteritidis* quando submetida aos critérios descritos para determinação do índice de patogenicidade.

Amostra	Ave	Dia	TM	A	Pt	O	Ph	Pc	C	IP
Morte										
1	1	1	1	0,8333	0,8333	0,8333	0	0	0	10
1	2	1	1	0,8333	0,8333	0,8333	0,8333	0,8333	0	10
1	3	1	1	0,8333	0,8333	0	0	0	0	10
1	4	2	0,857	0,8333	0,8333	0,8333	0,8333	0	0	8,45
1	5	3	0,714	0	0,8333	0,8333	0,8333	0	0	6,07
1	6	S*	0	0	0	0	0	0	0	0
1	7	S	0	0	0	0,8333	0	0	0	0,83
1	8	S	0	0	0	0,8333	0	0	0	0,83
1	9	S	0	0,8333	0,8333	0,8333	0	0,8333	0,8333	4,17
1	10	S	0	0,8333	0,8333	0,8333	0	0,8333	0	3,33
IP										5,37

S\* - Animais sacrificados no 7º dia pós-inoculação.

APÊNDICE C – Valores dos Índices de Patogenicidade obtidos para as cepas de *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST).

Amostra	Sorovar	Índice de Patogenicidade
01 CDPA	SE	5,77
03 CDPA	SE	8,64
04 CDPA	SE	6,45
06 CDPA	SE	6,11
11 CDPA	SE	6,94
15 CDPA	SE	3,48
18 CDPA	SE	5,37
20 CDPA	SE	7,98
22 CDPA	SE	5,04
23 CDPA	SE	6,54
24 CDPA	SE	3,98
25 CDPA	SE	6,85
30 CDPA	SE	4,51
31 CDPA	SE	5,10
35 CDPA	SE	5,37
36 CDPA	SE	6,36
37 CDPA	SE	3,38
39 CDPA	SE	5,20
40 CDPA	SE	5,05
41 CDPA	SE	4,27
43 CDPA	SE	6,24
45 CDPA	SE	3,13
54 CDPA	SE	8,25
95 CDPA	SE	3,56
223 CDPA	SE	6,42
86 IPV	SE	8,19
SE ATCC 13076	SE	6,19
92 CDPA	SE	7,75
93 CDPA	SE	8,52
94 CDPA	SE	4,04
96 CDPA	SE	7,46
98 CDPA	SE	6,69
99 CDPA	SE	6,96
103 CDPA	SE	6,45
166 CDPA	SE	9,85
167 CDPA	SE	8,51
168 CDPA	SE	3,12
169 CDPA	SE	6,30
170 CDPA	SE	5,94
171 CDPA	SE	6,00
172 CDPA	SE	7,87
173 CDPA	SE	5,39

Amostra	Sorovar	Índice de Patogenicidade
174 CDPA	SE	8,42
175 CDPA	SE	6,64
176 CDPA	SE	5,62
177 CDPA	SE	7,68
178 CDPA	SE	3,93
179 CDPA	SE	3,29
180 CDPA	SE	6,10
181 CDPA	SE	4,14
182 CDPA	SE	4,45
183 CDPA	SE	4,37
184 CDPA	SE	7,08
185 CDPA	SE	4,26
186 CDPA	SE	5,25
187 CDPA	SE	6,49
188 CDPA	SE	7,01
189 CDPA	SE	4,52
190 CDPA	SE	5,86
192 CDPA	SE	5,40
193 CDPA	SE	6,62
194 CDPA	SE	7,79
195 CDPA	SE	2,04
196 CDPA	SE	3,99
197 CDPA	SE	6,08
198 CDPA	SE	7,45
200 CDPA	SE	7,18
201 CDPA	SE	1,99
202 CDPA	SE	5,48
203 CDPA	SE	4,15
204 CDPA	SE	3,32
205 CDPA	SE	4,55
206 CDPA	SE	3,30
207 CDPA	SE	3,23
208 CDPA	SE	5,85
209 CDPA	SE	3,50
210 CDPA	SE	5,74
211 CDPA	SE	6,30
212 CDPA	SE	5,35
213 CDPA	SE	3,88
214 CDPA	SE	5,39
215 CDPA	SE	2,93
216 CDPA	SE	6,68
217 CDPA	SE	4,82
218 CDPA	SE	5,67
219 CDPA	SE	7,51
191 CDPA	SE	7,85

Amostra	Sorovar	Índice de Patogenicidade
199 CDPA	SE	6,96
220 CDPA	SE	8,62
221 CDPA	SE	8,49
222 CDPA	SE	5,19
224 CDPA	SE	8,92
225 CDPA	SE	7,23
226 CDPA	SE	9,15
227 CDPA	SE	8,10
228 CDPA	SE	6,65
229 CDPA	SE	8,56
230 CDPA	SE	8,89
231 CDPA	SE	8,33
232 CDPA	SE	7,51
233 CDPA	SE	6,25
234 CDPA	SE	6,62
235 CDPA	SE	8,48
236 CDPA	SE	7,29
237 CDPA	SE	8,02
238 CDPA	SE	9,61
239 CDPA	SE	7,31
240 CDPA	SE	8,10
241 CDPA	SE	9,12
242 CDPA	SE	8,25
243 CDPA	SE	9,69
244 CDPA	SE	8,58
42 LSA	SE	8,33
76 LSA	SE	8,96
82 LSA	SE	9,13
108 LSA	SE	9,63
109 LSA	SE	10,00
112 LSA	SE	8,82
115 LSA	SE	9,18
117 LSA	SE	9,54
118 LSA	SE	5,31
120 LSA	SE	8,61
129 LSA	SE	9,08
158 CDPA	SE	9,64
164 LSA	SE	9,93
169 LSA	SE	9,93
171 LSA	SE	8,21
172 LSA	SE	8,14
173 LSA	SE	8,37
174 LSA	SE	5,88
19 CDPA	ST	7,68
28 CDPA	ST	8,17

Amostra	Sorovar	Índice de Patogenicidade
57 CDPA	ST	8,25
63 CDPA	ST	6,17
248 CDPA	ST	8,25
249 CDPA	ST	9,04
253 CDPA	ST	6,67
81 LSA	ST	7,89
86 LSA	ST	9,17
87 LSA	ST	9,93
88 LSA	ST	9,01
89 LSA	ST	7,65
90 LSA	ST	7,04
91 LSA	ST	5,67
92 LSA	ST	8,51
93 LSA	ST	8,65
95 LSA	ST	4,77
96 LSA	ST	7,70
97 LSA	ST	7,65
98 LSA	ST	7,73
99 LSA	ST	7,30
100 LSA	ST	7,00
101 LSA	ST	6,69
103 LSA	ST	7,76
104 LSA	ST	8,92
105 LSA	ST	8,48
106 LSA	ST	3,71
107 LSA	ST	7,38
110 LSA	ST	8,42
116 LSA	ST	9,42
119 LSA	ST	10,00
122 LSA	ST	7,23
123 LSA	ST	9,42
124 LSA	ST	8,90
125 LSA	ST	8,93
64 CDPA	ST	8,08
94 CDPA	ST	8,94
126 LSA	ST	5,48
127 LSA	ST	5,24
128 LSA	ST	7,44
130 LSA	ST	6,63
131 LSA	ST	5,90
132 LSA	ST	6,08
133 LSA	ST	4,02
134 LSA	ST	4,74
135 LSA	ST	6,83
136 LSA	ST	8,02

Amostra	Sorovar	Índice de Patogenicidade
137 LSA	ST	4,54
138 LSA	ST	5,56
139 LSA	ST	6,87
140 LSA	ST	7,04
141 LSA	ST	5,15
142 LSA	ST	7,52
143 LSA	ST	5,10
144 LSA	ST	5,63
146 LSA	ST	6,04
147 LSA	ST	6,69
148 LSA	ST	4,85
149 LSA	ST	6,00
150 LSA	ST	4,83
151 LSA	ST	6,96
152 LSA	ST	9,54
153 LSA	ST	7,99
154 LSA	ST	5,79
155 LSA	ST	5,9
156 LSA	ST	5,98
157 LSA	ST	3,73
165 LSA	ST	6,80
166 LSA	ST	7,15
170 LSA	ST	7,68

## ANEXO A – Parecer favorável à pesquisa concedido pela CEUA – IPVDF.

Ofício n.º 26/12 – CEUA/IPVDF

Eldorado do Sul, 20 de julho de 2012.

Senhor Pesquisador:

Com relação ao Projeto de Pesquisa – *Estabelecimento de um índice de patogenicidade para amostras de Salmonella paratíficas de origem avícola* – sob orientação do Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle e colaboradora Dra. Kelly Cristina Tagliari de Brito, protocolado para análise e parecer sob nº 23/2012 pela mestranda Diane Alves de Lima, em 27 de junho de 2012, cabe referir o seguinte:

A Comissão de Ética no Uso de Animais – IPVDF reuniu-se ordinariamente em 05 de julho de 2012, no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e subsequentemente emitiu **PARECER FAVORÁVEL** à pesquisa a ser desenvolvida.

É o parecer.

Atenciosamente,



FERNANDO SÉRGIO CASTILHOS KARAM  
Presidente CEUA - IPVDF