

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“RESSURGÊNCIA DO TIFO AVIÁRIO NA AVICULTURA
INDUSTRIAL BRASILEIRA: NOVOS ESTUDOS
EPIDEMIOLÓGICOS DE UMA ENFERMIDADE ANTIGA”**

Anny Lucia del Pilar Celis Estupiñan

Médica Veterinária e Zootecnista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“RESSURGÊNCIA DO TIFO AVIÁRIO NA AVICULTURA
INDUSTRIAL BRASILEIRA: NOVOS ESTUDOS
EPIDEMIOLÓGICOS DE UMA ENFERMIDADE ANTIGA”**

Anny Lucia del Pilar Celis Estupiñan

Orientador: Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto

Coorientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área Patologia Animal.

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

E79r Estupinan, Anny Lucia del Pilar Celis
Ressurgência do tifo aviário na avicultura industrial brasileira: novos estudos epidemiológicos de uma enfermidade antiga / Anny Celis Estupinan. -- Jaboticabal, 2016
xx, 63 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Oliveiro Caetano de Freitas Neto
Banca examinadora: Nilce Maria Soares, Rafael A. C. Penha Filho
Bibliografia

1. Aves. 2. Transmissão. 3. Incubação. 4. *Salmonella* Gallinarum.
5. PFGE. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616-036.22:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESSURGÊNCIA DO TIFO AVIÁRIO NA AVICULTURA INDUSTRIAL
BRASILEIRA: NOVOS ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE UMA
ENFERMIDADE ANTIGA

AUTORA: ANNY LUCIA DEL PILAR CELIS ESTUPIÑAN
ORIENTADOR: OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO
CO-ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO
Departamento de Ciências Veterinárias / UFPB - Paraíba/PB

Pesquisadora NILCE MARIA SOARES
Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento / Instituto Biológico - Bastos/SP

Pós-Doutorando RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 25 de abril de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANNY LUCIA DEL PILAR CELIS ESTUPIÑAN - Nascida em 22 de março de 1986, na cidade de Sogamoso, Boyacá (Colômbia). Formou-se em Medicina Veterinária e Zootecnia em junho do ano de 2009, pela Universidad Cooperativa de Colombia (UCC), em Bucaramanga, Santander (Colômbia). Durante o período de 2009 a 2013, trabalhou para o setor da indústria avícola na região de Santander Colômbia. Em julho de 2013, realizou estágio extracurricular no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior. Em março de 2014, ingressou no curso de Mestrado na FCAV/UNESP Jaboticabal no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na área de Patologia Animal, ênfase em Ornitopatologia e Salmoneloses aviárias, com bolsa do CNPQ.

DEDICO

À minha mãe Ana Lucia Estupiñan Triviño, pelo amor, por acreditar em mim e me ajudar a superar os desafios e seguir adiante.

Aos meus irmãos pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.

E em especial a meu pai que, mesmo ausente, desde o céu contribui para todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, que me deu força e coragem para chegar até aqui e me ajudar a vencer todos os obstáculos.

À faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, especialmente ao Departamento de Patologia Animal pelo aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, pela concessão da bolsa de estudos (processo nº 190778/2013-0 - programa PEC-PG).

Ao Professor Angelo Berchieri por me receber em seu laboratório, oferecendo-me a oportunidade de sua orientação, por confiar em meu trabalho e me transferir ensinamentos acadêmicos, lições da vida e pelo apoio nos momentos de dificuldade.

Ao Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto, pelos valiosos ensinamentos, pela disponibilidade e orientação durante todo meu mestrado, pelo apoio científico nos momentos de dificuldade e pela amizade nesses anos.

Ao Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho pelos ensinamentos e pelas sugestões para a melhoria da dissertação.

A Dra. Marita Vedovelli Cardozo pelos ensinamentos a disponibilidade, apoio no meu experimento com PFGE e pelas sugestões para a melhoria da dissertação.

Aos funcionários do departamento de patologia, Mabel, Marcolino, Edgar e em especial à Adriana Maria de Almeida pela paciência e ensinamentos durante meu estágio e pelo auxílio e dedicação durante todos os meus experimentos no laboratório de ornitopatologia.

Aos colegas do laboratório de ornitopatologia, Fernanda, Marcela, Andrei, Lucas, Diego, Janine e Angélica pelo companheirismo pela paciência, amizade e por estarem sempre tão dispostos a ajudar.

Agradeço às amigadas maravilhosas que conquistei aqui em especial Kassia, Natalia, Nataly, Giovanni, Fernanda, Marita, Marcela, Mayara e Alisson, a companhia de vocês tornou esse tempo mais divertido e produtivo.

À os amigos colombianos, estrangeiros e brasileiros que conheci nesse período e que me acompanharam em todos os momentos dessa caminhada.

À Fiocruz, Lanagro, Instituto biológico, Hy-line do Brasil, Planalto pelo suporte fornecido durante a realização dos meus experimentos.

Ao Sr. Antonio Murakami, Dr. Luiz Matoguma, Dr. Marcelo Ortega que me auxiliaram na realização deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca pela sugestões feitas para melhoria do trabalho.

Agradeço a CAPES, FAPESP, CNPq e ao programa de Medicina Veterinária pelo suporte financeiro concedido para a realização desse projeto.

Agradeço a companhia de Baileys meu anjo de quatro patas, pelo amor em todos os momentos dessa caminhada.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aspectos gerais do gênero <i>Salmonella</i>	3
2.2 Salmoneloses Aviárias	3
2.3. Tifo aviário.....	4
2.3.1 Distribuição.....	5
2.3.2 Epidemiologia	6
2.3.2.1 Hospedeiros naturais.....	6
2.3.2.2 Resistência genética	7
2.3.2.3 Transmissão	8
2.3.3 Patogenia	9
2.3.4 Ferramentas moleculares para investigação epidemiológica	10
2.3.4.1 PFGE.....	11
2.3.5 Métodos de controle e prevenção	11
2.2.6 Tratamento	12
3. OBJETIVOS	14
3.1 Geral.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15

4.1. Bactérias	15
4.2. Preparo dos inóculos.....	16
4.3. Experimentos in vivo	16
4.3.1 Experimentos com aves	16
4.3.1.1 Experimento 01: Avaliação da patogenicidade de SG Nalr 1035 para aves de linhagens comerciais utilizadas atualmente no Brasil.....	16
4.3.1.1.1 Avaliações dos sinais clínicos e mortalidade.....	17
4.3.1.1.2. Exames bacteriológicos.....	18
4.3.1.2. Experimento 02: Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade e pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos de poedeiras comerciais de variedades vermelha (tratadas com enrofloxacina) e branca, ambas desafiadas com SG Nalr 1035	18
4.3.1.2. 1. Avaliação dos sinais clínicos e mortalidade.....	18
4.3.1.2.2. Pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos.....	19
4.3.1.3. Experimento 03: Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade e pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos de matrizes de linhagem de corte, desafiadas com SG Nalr 1035 e tratadas com antibióticos (enrofloxacina e canamicina)	1919
4.3.2 Experimentos de incubação de ovos férteis	21
4.3.2.1 Experimento 04: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de matrizes de linhagem de postura comercial das variedades vermelha e branca	21
4.3.2.1.1. Inoculação de ovos férteis.....	21
4.3.2.1.2. Avaliação do desenvolvimento embrionário e nascimento de aves.....	22
4.3.2.1.3. Embriodiagnóstico	22
4.3.2.1.4. Exame bacteriológico para isolamento de SG Nalr 1035	23
4.3.2.2 Experimento 05: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de matrizes pesadas	23

4.3.2.3 Experimento 06: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de avós de linhagem pesada	24
4.3.2.3.1. Inoculação de ovos férteis no experimento 06	24
4.4. Experimento in vitro: Comparação dos perfis genéticos de estirpes de SG isoladas no Brasil por meio da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	25
4.4.1. Bactérias	25
4.4.1.2. Análise por PFGE	27
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6. RESULTADOS	29
6.1 Experimentos com aves	29
6.1.1 Experimento 01: Avaliação da patogenicidade de SG Nalr 1035 para aves de linhagens comerciais utilizadas atualmente no Brasil	29
6.1.1.1 Avaliações dos sinais clínicos e mortalidade	29
6.1.1.2 Análises bacteriológicas	30
6.1.2 Experimento 02: Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade e pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos de poedeiras comerciais de linhagens vermelha (tratadas com enrofloxacin) e branca desafiadas com SG Nalr 1035	32
6.1.2.1 Avaliação dos sinais clínicos e mortalidade	32
6.1.2.2 Avaliação das alterações macroscópicas	33
6.1.2.3 Produção de ovos	34
6.1.2.4 Análises bacteriológicas	34
6.1.3 Experimento 03: Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade e pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos de matrizes de linhagem de corte, desafiadas com SG Nalr 1035 e tratadas com antibióticos (enrofloxacin e canamicina).	35
6.1.3.1 Avaliações dos sinais clínicos e mortalidade	35
6.1.3.2 Análises bacteriológicas	35

6.2 Experimentos de incubação de ovos férteis	35
6.2.1 Experimento 04: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de matrizes de linhagem de postura comercial das variedades vermelha e branca.....	35
6.2.2 Experimento 05: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de matrizes pesadas.....	37
6.2.3 Experimento 06: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de avós de linhagem pesada.....	38
6.3 Experimento in vitro.....	40
6.3.1 Comparação dos perfis genéticos de estirpes de SG isoladas no Brasil por meio da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	40
7. DISCUSSÃO	42
8. CONCLUSÕES	47
9. REFERÊNCIAS.....	48

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 04233/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Ressurgência do Tifo aviário na avicultura industrial brasileira: Novos estudos epidemiológicos de uma enfermidade antiga"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de abril de 2014.

Jaboticabal, 02 de abril de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

Diego Felipe Alves Batista

09/04/14

RESSURGÊNCIA DO TIFO AVIÁRIO NA AVICULTURA INDUSTRIAL BRASILEIRA: NOVOS ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE UMA ENFERMIDADE ANTIGA

RESUMO - *Salmonella Gallinarum* (SG) é o agente etiológico do tifo aviário (TA), uma doença sistêmica grave responsável por perdas econômicas para a indústria avícola em todo o mundo. TA foi considerado sob controle no Brasil e em países desenvolvidos. No entanto, nos últimos anos, inúmeros surtos dessa enfermidade têm sido identificados em lotes de aves de vários estados do Brasil. Com intuito de investigar fatores que pudessem ajudar a compreender a epidemiologia destes surtos, o presente estudo foi realizado. Foram avaliadas: (i) as possíveis alterações na patogenicidade de uma estirpe de SG isolada de um dos surtos recentes de TA, para as aves de linhagens comerciais utilizadas atualmente no Brasil; (ii) as possibilidades de transmissão de SG por via vertical e durante a incubação de ovos; (iii) a influência do uso antimicrobianos na persistência de SG na ave e consequente transmissão vertical; (iv) os perfis genéticos das estirpes isoladas anteriormente e, recentemente, por PFGE. No presente estudo, aves de linhagens mais suscetíveis infectadas por SG apresentaram alterações patológicas de maior intensidade e altas taxas de mortalidade, enquanto que as aves de linhagens mais resistentes apresentaram a mortalidade e sinais clínicos de forma mais branda. No entanto, foram capazes de manter SG por períodos mais longos que as aves de linhagens susceptíveis. SG não foi recuperada dos ovos produzidos por aves suscetíveis ou resistentes. A transmissão vertical não foi observada, embora aves recém-eclodidas foram infectadas por contato durante a incubação. Antibióticoterapia foi eficaz na redução da mortalidade, mas não foi capaz de eliminar a infecção e nem favoreceu a transmissão de SG via ovo. Estirpes de SG exibiram perfis genéticos muito semelhantes, sugerindo que eles vêm circulando nos lotes brasileiros há mais de 20 anos. Falhas em componentes do programa de biossegurança, provavelmente, podem ser responsáveis pela propagação FT no Brasil.

Palavras-chave. Aves, Incubação, PFGE, *Salmonella Gallinarum*, surto, transmissão.

RESURGENCE OF FOWL TYPHOID IN BRAZILIAN POULTRY INDUSTRY: NEW EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF AN OLD DISEASE

ABSTRACT - *Salmonella Gallinarum* (SG) causes fowl typhoid (FT) a severe systemic disease responsible for economic losses to the poultry industry worldwide. FT was considered under control in Brazil and in developed countries. Nonetheless, in recent years has been identified on farms in several states of Brazil. In order to investigate the epidemiological reasons behind this large FT outbreak, the present study was carried out to assess: (i) possible changes in the pathogenicity of a strain of SG isolated from a recent outbreak to chickens of white and brown lines of layers; (ii) transmission through eggs and hatching; (iii) the interference of antibiotic to the persistence of SG in the bird and to vertical transmission; (iv) the genetic profiles of strains isolated previously and recently by PFGE. Susceptible lines showed extensive pathological changes and high mortality rates, whereas in resistant lines mortality and clinical signs were almost absent. Although, they could maintain SG for longer periods than the susceptible lines did. SG was not recovered from any egg laid by birds from susceptible or resistant either. Vertical transmission was not observed although newborn chicks were infected due the contact during incubation. Antibiotic therapy was effective at reducing mortality but was not able to clear the infection and neither to favour vertical transmission. Strains did exhibit very similar genetic profiles, suggesting they have been circulating in Brazilian flocks for more than 20 years. Failures in components of biosecurity programs, probably, would be the responsible for the FT spread in Brazil.

Key words. Chicken, hatchery, PFGE, *Salmonella Gallinarum*, outbreak, transmission.

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI - Agar “Brain and Heart Infusion”

C - Celsius

DNA - “Deoxyribonucleic acid”

dpi - dias pós infecção

et al. - Colaboradores do autor

ERIC - “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”

h - horas

kg - Kilograma

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg - Miligrama

mL - Mililitro

OIE - Organização Internacional de Epizootias

PBS - Tampão fosfato salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PCR-RFLP - Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

PFGE - Eletroforese em gel de campo pulsado

pH - potencial Hidrogeniônico

PNSA - Programa Nacional de Sanidade Avícola

pv - Peso vivo

RAPD - “Random amplified polymorphic”

SFM - Sistema fagocítico mononuclear

SG - *Salmonella enterica subespécie enterica sorotipo Gallinarum ntéric Gallinarum*

SG NaI^r - *Salmonella* Gallinarum resistente ao ácido nalidíxico

SNNov - Selenito-novobiocina

SP - *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo *Gallinarum* ntéric
Pullorum

TA - Tifo aviário

UFC - Unidade formadora de colônia

UPGMA - "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean"

UV - Ultravioleta

μL – Microlitro

VBNal – Ágar Verde brilhante com Ácido nalidíxico

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Delineamento do experimento 01.....	17
Tabela 2. Delineamento do experimento 02.....	19
Tabela 3. Distribuição de inóculos e tratamentos do experimento 03.....	20
Tabela 4. Delineamento do experimento 04.....	21
Tabela 5. Delineamento do experimento 05.....	23
Tabela 6. Delineamento do experimento 06.....	24
Tabela 7. Dados gerais das estirpes de <i>S. Gallinarum</i>	25
Tabela 8. Mortalidade de aves para postura comercial de linhagens susceptíveis e resistentes desafiadas no dia 27 de vida com SG NaI ^r 1035.....	31
Tabela 9. Recuperação de SG NaI ^r 1035 em fígado e baço de aves para postura comercial de diferentes linhagens de variedades vermelhas e brancas, infectadas experimentalmente.....	32
Tabela 10. Produção de ovos (porcentagem de ovos produzidos / número de galinhas) durante as duas semanas antes e cinco depois da infecção com SG NaI ^r 1035.....	34

Tabela 11.	Embriodiagnóstico do experimento 04.....	36
Tabela 12.	Resultados do isolamento de SG NaI ^r 1035 após incubação de ovos de matrizes de postura de variedades vermelha e branca (experimento 04).....	36
Tabela 13.	Embriodiagnóstico do experimento 05.....	37
Tabela 14.	Resultados do isolamento de SG NaI ^r 1035 após incubação dos ovos de matrizes de linhagem pesada (experimento 05).....	37
Tabela 15.	Embriodiagnóstico referente ao experimento 06.....	39
Tabela 16.	Resultados do isolamento de SG NaI ^r 1035 após incubação dos ovos de avós de linhagem de corte (experimento 06).....	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Embriodiagnóstico. (A) infértil (B) mortalidade precoce, (C) mortalidade intermediária, (D) mortalidade tardia, (E) bicado não nascido.....	23
Figura 2. Alterações macroscópicas em fígado e baço de galinhas vermelhas (susceptíveis), 45 dpi com SG Nal ^r 1035. (A) Note hepatomegalia e presença de pontos esbranquiçados (seta). (B) Notar esplenomegalia.....	33
Figura 3. Alterações macroscópicas em fígado e baço de pintainhos de corte 10 dias após eclosão. (A) Note hepatomegalia e presença de pontos esbranquiçados (seta). (B) Notar esplenomegalia.....	38
Figura 4. Dendrograma construído a partir do padrão de bandas obtidas por PFGE em isolados de SG.....	41

1. INTRODUÇÃO

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorovar *Gallinarum* biovar *Gallinarum* (SG) é o agente causador do tifo aviário (TA), uma enfermidade sistêmica grave observada principalmente em aves adultas. Esta enfermidade tem relevante importância econômica, pois pode atingir diferentes ramos da avicultura industrial, incluindo aves de corte, galinhas poedeiras e aves reprodutoras. Em poedeiras comerciais, SG leva à diminuição da produção de ovos e pode provocar até 80% de mortalidade.

As aves infectadas param de se alimentar, apresentam sonolência, fraqueza, penas eriçadas, depressão, febre, diarreia amarelo esverdeada e mortalidade entre quatro e dez dias após exposição. Durante o quadro agudo são observadas alterações hepáticas, esplênicas e renais. Nas manifestações crônicas do TA é possível notar hidropericárdio e a presença de processos inflamatórios visíveis como pontos esbranquiçados nos órgãos.

As galinhas são hospedeiros naturais de SG, no entanto a susceptibilidade varia entre as linhagens comerciais. Sendo que as leves são consideradas resistentes, enquanto que as semipesadas e pesadas são susceptíveis às manifestações clínicas. Contudo aves de linhagens leves podem desenvolver um quadro subclínico do TA, podendo albergar a bactéria por longos períodos e servir como fontes de infecção no do plantel.

Geralmente, o sistema imune das aves que se recuperam do TA destrói todos os micro-organismos dos tecidos. Não há persistência, ao que tudo indica a infecção persistente com consequente transmissão vertical seria observada apenas na pulrose. Apesar de estudos realizados há vários anos mencionarem que SG poderia ser transmitida pelas vias vertical e horizontal. Até o momento, a comprovação experimental da transmissão vertical do TA não pode ser constatada reproduzida.

O TA é de difícil tratamento e por esta razão, o controle é feito com base na identificação de aves infectadas e posterior sacrifício. Na maioria dos países da Europa e da América do Norte, o TA tem sido considerado sobre controle

como resultado de uma política eficaz baseada em vigilância e abate sanitário dos lotes de aves infectadas.

Conforme dados da Organização Internacional de Epizootias (OIE), o TA continua sendo um problema para a indústria avícola em muitos países da América do Sul, Ásia e África Central. No Brasil, a enfermidade estava aparentemente controlada, mas voltou a ser identificada em aves de granjas de diversas regiões. Dados recentes publicados pela OIE demonstram que em 2012 houve 14 casos no Brasil. Já em 2013 e 2014, não houve relatos de TA, embora a doença estivesse classificada como presente no país.

Os motivos envolvidos nos recentes surtos do TA ainda não estão claros. Por isso, algumas hipóteses que pudessem explicar a sua ressurgência foram aventadas. Linhagens alteradas geneticamente para resistência ao TA poderiam não estar desenvolvendo a doença clínica, porém se tornariam persistentemente infectadas, viabilizando a transmissão vertical. (ii) A antibióticoterapia utilizada para tratar os surtos de TA poderia estar favorecendo a infecção, persistência e transmissão vertical de SG. Por fim, (iii) seria possível que uma estirpe de SG de perfil genético distinto e com características peculiares de patogenicidade tenha ressurgido e se disseminado nos plantéis brasileiros.

O presente estudo foi dedicado a encontrar explicações epidemiológicas para elucidar a propagação contínua do TA no Brasil. Os objetivos foram (i) avaliar a patogenicidade de uma estirpe de SG isolada em um caso recente de TA para linhas comerciais de aves (vermelhas e brancas) usadas atualmente no Brasil; (ii) avaliar se o uso de antimicrobianos para tratamento de aves com TA poderia favorecer a transmissão de SG via ovos; (iii) verificar a possibilidade de transmissão vertical através de uma série de experimentos de incubação e (iv) comparar e analisar os perfis genéticos de uma estirpe de SG recentemente isolada com aqueles recuperados em anos diferentes e em diferentes regiões do Brasil através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativos curtos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, que podem causar doenças tanto em humanos como em animais (GAST, 1997; RICHARDSON et al., 2011). A nomenclatura do gênero segue o esquema proposto por Popoff et al. (1996), no qual o mesmo é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* com seis subespécies (enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica) e vários sorovares; e *Salmonella bongori*. Atualmente estão identificados mais de 2.610 sorovares, dos quais, 1547 pertencem à subespécie enterica da espécie enterica (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

O ambiente ideal para a multiplicação desses micro-organismos varia entre 35 a 43 °C e potencial Hidrogeniônico (pH) entre 7,0 e 7,5 em caldo nutriente simples e em meios seletivos para enterobactérias, como caldo selenito e ágar verde brilhante (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

2.2 Salmoneloses Aviárias

Salmonelose aviária é o termo utilizado para designar três doenças provocadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* em aves: a pulorose, causada por *Salmonella Pullorum* (SP); o tifo aviário (TA), cujo agente etiológico é *Salmonella Gallinarum* (SG); e o paratifo aviário, causado pelos demais sorovares de *Salmonella*. (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Atualmente, SG e SP são classificados como biovares do sorovar Gallinarum, portanto, a nomenclatura correta seria *Salmonella enterica* subsp. enterica sorovar Gallinarum biovar Gallinarum e *Salmonella enterica* subsp.

enterica sorovar Gallinarum biovar Pullorum, respectivamente (POPOFF; LE MINOR, 2005). Ambas são imóveis devido à ausência de flagelos e hospedeiro-específicas, provocando doenças clínicas com características distintas que podem acarretar grandes prejuízos na avicultura mundial (SHIVAPRASAD, 2000).

SG e SP provocam doenças sistêmicas, podendo ocasionar a morte da ave sem causar comprometimento intestinal severo, sendo poucos os relatos de envolvimento desses micro-organismos em infecções alimentares em seres humanos (BARROW et al., 1987; PASCOPELLA et al., 1995). Já os sorovares causadores do paratifo aviário não possuem hospedeiros específicos, são móveis devido à síntese de flagelos peritríquios, realizam extensa colonização intestinal, podem ou não causar infecção sistêmica e estão comumente envolvidos em infecções alimentares em seres humanos (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008).

SP causa septicemia, quadro de diarreia branca, alta morbidade e mortalidade em aves infectadas nos primeiros dias de vida. Pode provocar infecção persistente em parte das aves que se recuperam da infecção. Por isso, pode ser transmitida tanto pela via vertical como pela horizontal, (GAST, 1997; WIGLEY et al., 2001).

O TA, embora seja causado por uma *Salmonella* muito semelhante ao agente da pulrose, apresenta uma relação parasita-hospedeiro com a ave bastante diferente. SG é altamente patogênica, podendo desencadear doença sistêmica, com alta morbidade e mortalidade em aves de qualquer idade, entretanto sua ocorrência é mais comum entre aves adultas (POMEROY; NAGARAJA, 1991; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

2.3. Tifo aviário

A história do TA teve início na Inglaterra em 1889, quando Klein, com base na observação post-mortem de galinhas doentes, descreveu uma enfermidade caracterizada por enterite catarral, hepatoesplenomegalia e diarreia amarela esverdeada. Klein também conseguiu isolar pequenos bacilos

Gram-negativos imóveis a partir do sangue das galinhas acometidas. As aves, inoculadas com o bacilo por via subcutânea, adoeciam em cinco a seis dias, e morriam dois a três dias depois (POMEROY, 1978).

No Brasil os primeiros registros datam de 1919 com ocorrência no estado de Minas Gerais e no ano de 1939 em São Paulo. O TA tem ocorrido com maior intensidade em alguns períodos, como nos anos 80 e início dos anos 90 do século passado (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

2.3.1 Distribuição

O TA é uma enfermidade de distribuição mundial, que tem estado sob controle em aves comerciais de muitos países desenvolvidos da Europa, nos Estados Unidos da América, Canada, Austrália e Japão, como resultado de uma política eficaz baseada em vigilância e abate sanitário (OIE, 2015; CHRISTENSEN et al., 1992).

Os dados da ocorrência do TA registrados nos últimos 10 anos demonstram que essa enfermidade ainda é problema em países que industrializaram a produção avícola recentemente, ou em países tropicais, os quais apresentam dificuldade na aplicação de medidas de controle e manejo sanitário (SHIVAPRASAD, 2000; KIM et al., 2007; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Surtos esporádicos de TA também têm sido diagnosticados na última década em alguns países europeus acometendo aves de todas as idades, inclusive pintos nos primeiros dias de vida (IVANICS et al., 2008).

Conforme dados da Organização Internacional de Epizootias (OIE), o TA atualmente está presente em muitas regiões do mundo, incluindo África, Ásia, na América Central e do Sul (OIE, 2015). O TA ocorre com frequência na avicultura asiática, na China, por exemplo, foram relatados mais de 590 casos entre 2012 e 2014. Na Coreia onde o TA tem se espalhado por todo o país, ocorreram mais de 130 casos entre o 2012 e 2015 (OIE, 2015). Na América do Sul, tem sido relatados surtos na Colômbia, Argentina e Brasil (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009; PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2014). Neste

último, o TA é diagnosticado em diversos estados do país, tendo sido identificado em granjas de postura, corte e de aves reprodutoras para corte (SESTI, 2013). Segundo os registros da OIE em 2012 houve 14 casos no Brasil, entretanto, em 2013 e 2014, não houve relatos de TA, embora a doença estivesse classificada como presente no país (OIE, 2015).

2.3.2 Epidemiologia

A epidemiologia do TA tem sido muito relacionada com a da pulorose (SHIVAPRASAD, 1997). No entanto ao contrário de SP, SG pode provocar infecção em aves de qualquer idade e ser transmitida pela via horizontal. Quadro de infecção persistente com consequente transmissão vertical, comumente vistos na pulorose, não é observado no TA (BUMSTEAD; BARROW, 1993; BERCHIERI JUNIOR et al., 2001).

2.3.2.1 Hospedeiros naturais

A doença induzida por SG acomete principalmente galinhas (*Gallus gallus*) e perus (*Melleagris gallopavo*), (JEONG et al., 2008). Outras aves, como faisões, codornas, pardais, avestruz e pavão também são suscetíveis a esta doença (SHIVAPRASAD, 2000). A suscetibilidade de patos, gansos e pombos é variável, mas de um modo geral essas aves parecem ser resistentes (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009; BARROW et al., 1999).

O TA é geralmente observado em aves adultas, no entanto, o micro-organismo pode acometer aves de qualquer idade (BUMSTEAD; BARROW, 1993; BERCHIERI JUNIOR et al., 2000). Quando infecta em aves jovens, pode ser confundido com a pulorose. A susceptibilidade varia de acordo com as linhagens de aves, sendo as aves leves consideradas resistentes, enquanto que as semi-pesadas e pesadas são consideradas suscetíveis à doença (POMEROY, 1978; OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005; WIGLEY et al., 2002).

Surtos severos de TA podem ocorrer em granjas de postura comercial quando há substituição das linhagens brancas (leves) pelas linhagens vermelhas (semi-pesadas). Uma vez que as linhagens vermelhas são mais suscetíveis ao TA, podem manifestar clinicamente a enfermidade em granjas onde SG estava provocando infecção sub-clínica em aves brancas (SHIVAPRASAD, 1997; BUMSTEAD; BARROW, 1993).

2.3.2.2 Resistência genética

Diferentes estudos têm sido realizados para comparar diferenças na resistência genética de variedades de aves comerciais à infecção por SG. Tais estudos indicam que esta diferença está relacionada com a capacidade de controle da multiplicação bacteriana no interior das células do SFM, principalmente macrófagos (WIGLEY et al., 2002).

Macrófagos de aves adultas de linhagens resistentes conseguem eliminar (clearance) o patógeno no prazo de 24 horas, enquanto que nas linhagens suscetíveis, a bactéria persistiu no interior dos macrófagos das aves da linhagem suscetível por pelo menos 48 horas (WIGLEY et al., 2002).

A resistência genética à salmoneloses sistêmicas em galinhas está relacionada à diversos fatores, incluindo a síntese da proteína de macrófago, associada à resistência natural 1 (Nramp1). Essa proteína, atualmente conhecida como soluto transportadora 11a membro 1 (Slc11a1), conduz a um aumento da atividade dos macrófagos contra os patógenos intracelulares (BUMSTEAD; BARROW, 1988; WIGLEY et al., 2002; LIU; KAISER; LAMONT, 2003; CALENGE et al., 2010). Este mecanismo é importante para a defesa dessas células contra parasitos invasores, pois sequestra íons, impedindo que estes sejam utilizados para a multiplicação bacteriana no interior de fagócitos (BLACKWELL et al., 2001; FORBES; GROS, 2001).

2.3.2.3 Transmissão

Estudos realizados há vários anos mencionam que SG poderia ser transmitida pelas vias vertical e horizontal. (BEACH; DAVIS, 1927; BEAUDETTE, 1930; HALL et al., 1949; POMEROY; NAGARAJA, 1991). No entanto, até o momento, a comprovação experimental do envolvimento da via vertical não pode ser reproduzida (OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005).

Observa-se que aves gravemente acometidas pelo TA, geralmente aumentam a excreção da bactéria, a qual se espalha por todo o corpo do animal, principalmente na fase em que a ave está indo a óbito (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). O contato destas aves doentes com as aves saudáveis, o canibalismo e a presença de aves mortas na granja, são fatores que contribuem na disseminação de SG (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO 2009). Aves que se recuperam do TA destroem todos os micro-organismos dos tecidos; não há persistência (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Ao que tudo indica, a infecção persistente com consequente transmissão vertical seria observada apenas na pulrose (BERCHIERI JUNIOR et al., 2001).

Falhas nos programas de limpeza e desinfecção das instalações, no controle de moscas e pragas nas criações de aves também favorecem a disseminação de SG (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009; OIE 2012).

Além disso, o transporte de aves infectadas provenientes de lotes com histórico de TA, bem como o transporte de esterco, ovos e até mesmo as pessoas que trabalham ou transitam nas granjas ou propriedades avícolas, podem atuar como meios eficientes de disseminação de SG (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Criações de aves em pequenas propriedades, próximas a áreas de criações comerciais, também podem ser fontes de infecção de salmoneloses (SHIVAPRASAD, 2000).

O aumento e intensificação das criações de aves soltas (free-range ou caipiras) nos últimos permitiu maior contato entre aves e o meio ambiente, fato que pode ter contribuído para o reaparecimento de doenças antes controladas, como o TA (COBB et al., 2005; PARMAR; DAVIES, 2007; BARROW, 2012).

2.3.3 Patogenia

Em aves, a principal porta de entrada de *Salmonella* é o trato digestivo. No caso da SG, após a infecção oral, barreiras químicas e físicas impedem ou combatem a infecção. O ácido clorídrico, por exemplo, presente no pró-ventrículo e moela, reduz o pH, o que pode inviabilizar a sobrevivência do micro-organismo ou reduzir a carga infectante. No entanto, logo após a ingestão do alimento, ocorre elevação do pH e essa barreira química deixa de existir (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009; CHAPPELL et al., 2009).

A maioria dos sorovares invade o organismo na região entérica, atingindo o íleo distal e o ceco, replicando-se na submucosa e placas de Peyer (KAISER et al., 2000; JONES et al., 2001). Embora SG não seja um bom colonizador, provavelmente, devido à ausência de flagelos, consegue invadir os enterócitos, penetrando no epitélio intestinal ou no tecido linfoide, localizado nas placas de Peyer e tonsilas cecais (CHAPPELL et al., 2009; BARROW; FREITAS NETO, 2011; SETTA et al., 2012). SG é fagocitada por leucócitos, principalmente heterófilos e macrófagos residentes (CHAPPELL et al., 2009).

A bactéria invade e sobrevive dentro de células do sistema imune do hospedeiro, os macrófagos são as principais células infectadas. Os fagócitos contendo a bactéria atingem a circulação linfática e migram dos tecidos epiteliais para órgãos como baço, fígado, ovário e pulmões das aves, atuando como transportadores de SG (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). SG induz resposta inflamatória de menor intensidade no intestino, favorecendo o desencadeamento de doença sistêmica severa (KAISER et al., 2000). Durante a fase aguda da infecção, ocorre acelerada multiplicação da SG no sistema fagocítico mononuclear (SMF), produzindo uma reação anafilática de hipersensibilidade, provocando sintomatologia e morte (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

As manifestações clínicas, geralmente são apresentadas nas aves adultas. As aves param de se alimentar e ficam prostradas, apresentam diarreia amarelo-esverdeada e queda na postura. O curso da doença pode ser de cinco a sete dias e as taxas de mortalidade de 40 a 80% do lote no campo

(SHIVAPRASAD, 2000; OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005; FREITAS NETO, et al., 2007).

As alterações anatomopatológicas observadas são decorrentes de falhas na modulação da resposta imune que induzem um quadro agudo de septicemia com grave comprometimento dos órgãos internos, os quais ficam congestos. Além disso, há destruição de hemácias pelo sistema retículo endotelial, resultando em anemia (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Em casos agudos, o volume do fígado e do baço pode aumentar até quatro vezes. O fígado torna-se friável, esverdeado ou amarelo-esverdeado a bronzeado e repleto de pontos esbranquiçados e hemorrágicos (EZEMA; ONUOHA; CHAH, 2009). Outras lesões incluem hidropericárdio e inflamação, com nódulos esbranquiçados no coração, baço, pulmões, rins, moela, pâncreas, duodeno e ceco (SMITH, 1955; ASSOKU et al., 1970; CHRISTENSEN et al., 1996). Quando a doença apresenta um curso mais longo, podem ser observados ovários hemorrágicos ou peritonite, devido à ruptura do ovário e hemorragia do trato intestinal (POMEROY, 1978).

Em infecções experimentais realizadas em aves susceptíveis, foi observado que o desencadeamento da enfermidade e a morte dependem da dose infectante (OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005). Já em estudos realizados em linhagens leves, observou-se que apesar das aves não desenvolverem sinais clínicos, alguns órgãos internos apresentaram alterações macroscópicas e SG foi isolada do baço e do fígado, quatro semanas após a infecção (BERCHIERI JÚNIOR et al., 2000).

2.3.4 Ferramentas moleculares para investigação epidemiológica

Métodos moleculares capazes de discriminar diferentes estirpes de SG estão disponíveis para auxiliar a investigação epidemiológica dos casos de TA. Técnicas como PFGE, “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC-PCR) e “Random amplified polymorphic DNA” (RAPD) que são métodos

propostos para essa finalidade (OLSEN et al., 1996; DODSON et al., 1999; SEO et al., 2006; KWON et al., 2010; YU et al., 2011).

2.3.4.1 PFGE

O método de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) desenvolvido em 1984 por David Schwartz e Charles Cantor, com o fim de separar grandes moléculas de DNA (SCHWARTZ; CANTOR, 1984) tem sido considerado o padrão ouro para a comparação dos perfis genéticos de *Salmonella* spp. durante as investigações epidemiológicas (LINDSTEDT et al., 2004; BOXRUD et al., 2007; DAVIS et al., 2009; VAN IMMERSEEL et al., 2013). Esta técnica permite avaliar alterações ocorridas no genoma, ocasionadas por mutações, inserções e deleções de fragmentos de DNA (TENOVER et al., 1995).

No trabalho de Seo et al. (2006) realizado na Coreia, foram utilizados PFGE e RAPD para avaliar a relação genética entre as 38 estirpes de SG isoladas de 29 regiões diferentes no período de 1992 a 2001. Como resultado, verificou-se que o PFGE teve um maior poder discriminatório que o RAPD, tendo-se em vista que os padrões de PFGE eram mais numerosos que os de RAPD. Neste caso, o RAPD demonstrou ser menos confiável que o PFGE. O PFGE também é o método empregado na investigação epidemiológica de outros surtos de TA (KWON et al., 2010; VAN IMMERSEEL et al., 2013).

2.3.5 Métodos de controle e prevenção

Não existe um programa de prevenção do TA para se aplicado em todas as granjas avícolas, mas algumas medidas básicas tais como limpeza, higiene e desinfecção dos galpões, controle de roedores, armazenamento adequado dos ovos férteis, eliminação de aves reagentes e destino correto e rápido dos animais mortos, desinfecção dos veículos que transportam as aves, ração e suas matérias-primas entre outras podem ser obedecidas para evitar a disseminação do TA (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A prevalência do TA foi reduzida em alguns países devido à aplicação de medidas baseadas em programas de erradicação (SHIVAPRASAD, 2000). Porém, a doença continua sendo um problema em outros países que ainda não conseguiram implantar estratégias de controle e erradicação do TA, principalmente países da América do Sul, Ásia e África.

No Brasil, onde o crescimento da indústria avícola tem sido constante, existe o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) que preconiza o monitoramento nos plantéis de reprodução para certificação de núcleos e granjas avícolas como livres de *Salmonella* (BRASIL, 2003). O controle é realizado com base na identificação de aves infectadas, por meio de provas sorológicas e confirmação microbiológica, com posterior sacrifício dos lotes positivos (KISIELA et al., 2005; BARROW; FREITAS NETO, 2011; BRASIL, 2003).

Outra medida para prevenção e controle de SG consiste na vacinação de aves suscetíveis, dentre as vacinas vivas, a mais conhecida e utilizada é a estirpe rugosa SG 9R que foi originada da lisa 9S (SMITH, 1956; GORDON; LUKE, 1959; GORDON et al., 1959). A experiência de alguns países demonstrou que programas de vacinação apresentam bons resultados na redução do TA (KWON et al., 2010). Porém, a prevenção não é completamente satisfatória, dado que, surtos significativos, foram relatados no Reino Unido e na Europa continental nos últimos anos (BARROW, 2012).

Merece ser lembrado que o programa de vacinação não substitui outros componentes do programa de biossegurança como limpeza e desinfecção das instalações, controle de pragas e correto descarte de aves mortas (DAVIES; BRESLIN, 2003).

2.2.6 Tratamento

O tratamento de TA é difícil, pois os fármacos disponíveis não são capazes de eliminar completamente SG de aves acometidas (SEO et al., 2006; BARROW; FREITAS NETO, 2011). A utilização de antibióticos no tratamento do TA pode diminuir as perdas por mortalidade, quando são usados nas duas

primeiras semanas de vida, estes reduzem a mortalidade, no entanto ela volta a ocorrer após a retirada dos mesmos (MOORE, 1948; WILSON, 1956; GORDON; TUCKER, 1957). Numerosos antibióticos têm sido utilizados no tratamento do TA entre esses as sulfonamidas como o trimetoprim-sufadiazina administrado por via oral 30-50 mg/kgpv durante três ou cinco dias (POMEROY, 1978). As quinolonas e fluoroquinolonas como enrofloxacinas e ciprofloxacinas respectivamente tem sido administradas a 10 mg/kgpv durante três a cinco dias, e outros tipos de antibióticos como a fosfomicina a 40mg/kgpv via oral, canamicina 25mg/kgpv por tres a cinco dias (SUMANO; GUTIERREZ, 2010).

No entanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos e a adição de promotores de crescimento em rações animais, contribuíram para a emergência da resistência entre estirpes de *Salmonella* e de outras bactérias (BERCHIERI JUNIOR; BARROW, 1998). Além disso, fatores como a qualidade da água em que estes produtos são administrados, bem como falhas na dosagem e associações incorretas de antibióticos contribuem para ineficácia dos tratamentos (PULIDO; MANTILLA, 2008). Segundo Barrow (1999), na maioria dos casos, após a retirada do agente terapêutico, as aves se tornam novamente suscetíveis à infecção. Por isso, mesmo durante os surtos de TA, o maior aliado do tratamento é a eliminação rápida e correta das aves mortas (OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar fatores que pudessem explicar a ressurgência do tifo aviário na avicultura industrial brasileira.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar possíveis alterações de patogenicidade em uma estirpe de SG, isolada de um dos casos recentes de TA, para aves de linhagens comerciais utilizadas atualmente no Brasil.
- Analisar se o uso de fluoroquinolonas e aminoglicosídeos para o tratamento de aves com TA poderia favorecer a transmissão de SG por meio de ovos
- Verificar a possibilidade de transmissão vertical por meio de experimentos de incubação
- Comparar os perfis genéticos de SG isolados recentemente e em anos anteriores em diferentes regiões brasileiras por meio do “Gel de Eletroforese em Campo Pulsado” (PFGE).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, São Paulo (FCAV-Unesp). Foram realizados três experimentos com desafio em aves e três com inoculação em ovos embrionados. Para isso, foram utilizadas aves de linhagens comerciais de variedades vermelhas e brancas para postura de ovos de mesa, com diferentes idades, e matrizes para produção de aves de corte. Nos experimentos de incubação foram utilizados ovos férteis provenientes de matrizes para produção de aves de postura das variedades vermelha e branca, ovos férteis de matrizes de corte e ovos de avós para a produção de matrizes pesadas. Além disso, realizou-se um experimento para comparação dos perfis genéticos de isolados de *Salmonella* enterica subsp. enterica sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) por meio da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (“Pulsed Field Gel Electroforese” - PFGE). Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV-Unesp (CEUA – No. 04233 /14).

4.1. Bactérias

Para desafio das aves e inoculação dos ovos utilizou-se uma estirpe de *Salmonella* enterica subsp. enterica sorovar Gallinarum biovar Gallinarum, na qual foi induzida resistência ao ácido nalidíxico na concentração de 100 µg/mL (SG Nal^r 1035). Essa estirpe foi isolada de órgãos de galinhas provenientes de um lote apresentando mortalidade por TA, recebidas em 2013 pelo Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV- Unesp, Câmpus de Jaboticabal. A tipificação foi realizada pelo Instituto Adolfo Lutz – SP.

A bactéria foi inoculada em ágar LB (DIFCO, França - Ref. 240110), o qual foi incubado a 37 °C/24 horas. Em seguida, as colônias obtidas foram colhidas com o auxílio de alça bacteriológica estéril e transferidas para criotubo

contendo um mililitro de caldo LB (Invitrogen, USA - Ref. 12795-027) suplementado com 30 % de glicerol (Glicerina - MERCK – Ref. k30402394) e armazenado a -80 °C.

4.2. Preparo dos inóculos

Os inóculos contendo a estirpe SG Nalr 1035 foram preparados em caldo LB (Invitrogen, USA) a partir da cultura armazenada a -80 °C e incubados a 37 °C/24 horas em agitação constante (150 rpm). A contagem de SG Nalr 1035 na cultura foi feita segundo Miles, Misra e Irwin (1938). Uma alíquota da mesma foi diluída decimalmente em solução salina fosfatada (“phosphate buffered saline” - PBS) (pH 7,4) até a sexta diluição. Dispersou-se 0,1 mL de cada diluição sobre a superfície de ágar verde brilhante (VB - OXOID® RU - Ref. CMO263) contendo ácido nalidíxico na concentração de 100 µg/mL (VBNal). Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C/24 horas e então submetidas à contagem de micro-organismos viáveis (UFC/mL).

4.3. Experimentos in vivo

4.3.1 Experimentos com aves

4.3.1.1 Experimento 01: Avaliação da patogenicidade de SG Nalr 1035 para aves de linhagens comerciais utilizadas atualmente no Brasil

Foram utilizadas 300 aves comerciais para postura de ovos de mesa, com uma semana de vida, sendo 150 pertencentes a três linhagens de aves vermelhas (semi-pesadas) consideradas susceptíveis ao TA, e 150 pertencentes à três linhagens de aves brancas (leves) consideradas resistentes ao TA. No momento da chegada, foram realizados suabes de fundo de caixa

para a pesquisa de *Salmonella* spp., conforme a metodologia descrita por Zancan et al. (2000).

As aves foram alojadas em baterias de cria e receberam aquecimento elétrico, água e ração ad libitum e foram distribuídas em 12 grupos, detalhados na Tabela 1. No 27º dia de vida, os animais foram infectados, por via oral, com 0,5 mL de cultura de SG Nal^r 1035 em duas concentrações. Aves de seis grupos receberam 6×10^8 UFC. Enquanto que as aves dos outros grupos receberam cerca de 6×10^6 UFC cada.

Tabela 3. Delineamento do experimento 01.

	*Variedades	Número de aves	Concentração do inóculo de SG Nal ^r 1035
Aves vermelhas	A ₁	26	6×10^8 UFC
	B ₁	25	6×10^8 UFC
	C ₁	23	6×10^8 UFC
	A ₂	30	6×10^6 UFC
	B ₂	25	6×10^6 UFC
	C ₂	25	6×10^6 UFC
Aves brancas	D ₁	27	6×10^8 UFC
	E ₁	24	6×10^8 UFC
	F ₁	25	6×10^8 UFC
	D ₂	25	6×10^6 UFC
	E ₂	25	6×10^6 UFC
	F ₂	25	6×10^6 UFC

*Variedades A1, 2, B1,2 e C1,2, aves vermelhas consideradas susceptíveis ao TA; variedades D1,2, E1,2 e F1,2, aves brancas consideradas resistentes ao TA.

4.3.1.1.1 Avaliações dos sinais clínicos e mortalidade

As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se diariamente os sinais clínicos e a mortalidade. No 28º e 35º dia pós-infecção (dpi), as aves remanescentes foram abatidas para a pesquisa de SG Nal^r 1035 em amostras colhidas de fígado e baço.

No exame post-mortem, a superfície ventral da ave foi umedecida com álcool 70 %, em seguida a carcaça foi aberta e as amostras de órgãos colhidas em condições assépticas (BARROW; LOVELL, 1991).

4.3.1.1.2. Exames bacteriológicos

Os suabes de fígado e baço foram colocados em frascos contendo dois mililitros de caldo selenito (OXOID® RU – Ref. CM0395), adicionados de quatro mg/mL de novobiocina (SNNov), homogeneizados e incubados a 37 °C/24 horas. Após a incubação, utilizando-se alça bacteriológica, a cultura foi semeada, em placa contendo ágar VBNaI (OXOID® RU) e foi incubada a 37 °C/24 horas. Em seguida, foi realizada a leitura das placas visando identificar colônias de SG NaI^r 1035.

4.3.1.2. Experimento 02: Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade e pesquisa de SG NaI^r 1035 em ovos de poedeiras comerciais de variedades vermelha (tratadas com enrofloxacina) e branca, ambas desafiadas com SG NaI^r 1035

Para este ensaio, foram utilizadas 30 galinhas, com cinquenta semanas de vida, de duas linhagens comerciais para postura de ovos de mesa. Uma de variedade vermelha, considerada susceptível ao TA e outra de variedade branca considerada resistente à doença. No momento da chegada das aves, foram colhidos suabes cloacais conforme a metodologia descrita por Wray e Davies (1994) para a pesquisa de *Salmonella* spp. As galinhas foram distribuídas, conforme a linhagem, em dois grupos de 15, conforme descrito na tabela 2. Foram alojadas em gaiolas metálicas acondicionadas em sala climatizada (26 °C). As aves receberam água e ração ad libitum e foram examinadas por sete semanas, registrando-se diariamente, produção de ovos, sinais clínicos e a mortalidade.

4.3.1.2. 1. Avaliação dos sinais clínicos e mortalidade

Na 52^a semana de vida, os animais foram infectados, por via oral, com dois mL de inóculo contendo 2×10^9 UFC de SG NaI^r 1035. No 3^o dpi, grupo H

(galinhas vermelhas) foram tratadas com Enrofloxacina 10 % (Enrotec 100 – FATEC S.A - Brasil), administrada por via oral na concentração de 20 miligramas para cada quilograma de peso vivo (mg/kpv) por cinco dias, conforme descrito na tabela 2. No 44^o dpi, as aves foram submetidas à eutanásia para avaliação das alterações macroscópicas e pesquisa de SG Nalr 1035 no fígado, baço e ovário.

Tabela 2. Delineamento do experimento 02.

Grupos	Inóculo*	Antibiótico	Dias de tratamento
G	2 x 10 ⁹ UFC	Sem antibiótico	-
H	2 x 10 ⁹ UFC	Enrofloxacina 10%	3 ^o ao 8 ^o dpi

Grupo G galinhas brancas, grupo H galinhas vermelhas.

* Inóculo da estirpe SG Nalr 1035.

4.3.1.2.2. Pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos

A colheita das amostras para análise de ovos seguiu as recomendações de Wray e Davies (1994) com algumas modificações. Os ovos de aves de cada grupo foram colhidos separadamente durante sete semanas e analisados em “pool” contendo cinco amostras, tendo-se a precaução de processar separadamente cascas e conteúdos internos.

O conteúdo dos ovos foi colocado em frascos plásticos estéril de 500 mL e homogeneizados, enquanto que as cascas foram colocadas em um segundo frasco plástico estéril, maceradas com um pistilo estéril e imersas em 200 mL SNNov (OXOID® RU).

Ambos foram incubados a 37 °C/24 horas. Após o enriquecimento, as amostras foram semeadas em ágar VBNAI (OXOID® RU) e incubadas a 37 °C/24 horas. Decorrido esse período, a leitura das placas foi realizada.

4.3.1.3. Experimento 03: Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade e pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos de matrizes de linhagem de corte,

desafiadas com SG Nalr 1035 e tratadas com antibióticos (enrofloxacina e canamicina)

Foram utilizadas vinte matrizes de linhagem de corte com 36 semanas de vida, as quais foram previamente vacinadas na 12^a semana de idade com vacina inativada contra *S. Enteritidis*. No momento da chegada, foram colhidos suabes cloacais, conforme a metodologia descrita por Wray e Davies (1994) para pesquisa de *Salmonella* spp. As galinhas foram distribuídas em dois grupos de 10 aves cada, conforme descrito na Tabela 3. Foram alojadas em gaiolas metálicas em ambiente climatizado (26 °C), recebendo água e ração ad libitum. Na 36^a semana de vida as aves foram infectadas, por via oral, com 3 mL de inóculo de SGNalr 1035, em duas concentrações. Aves do grupo I receberam inóculo contendo 2×10^4 UFC. Enquanto que as aves do grupo J receberam 2×10^6 UFC.

Tabela 3. Distribuição de inóculos e tratamentos do experimento 03.

Grupos	Inóculo*	Antibiótico	Dias de tratamento
I	2×10^4 UFC	Canamicina 25%	6 ^o ao 12 ^o dpi
J	2×10^6 UFC	Enrofloxacina 10%	3 ^o ao 5 ^o dpi
		Canamicina 25%	6 ^o ao 12 ^o dpi

* Inóculo da estirpe SG Nalr 1035.

As galinhas foram observadas durante quatro semanas, registrando-se diariamente os sinais clínicos e mortalidade. As aves do grupo J correspondentes ao inóculo concentrado (2×10^6 UFC), foram tratadas oralmente com 20 mg/kpv de enrofloxacina 10 % (Enrotec 100 – FATEC S.A - Brasil) do 3^o ao 5^o dpi, e do 6^o ao 12^o dpi, com canamicina 25 % (Kanainjecto 250 – FATEC S.A - Brasil), administrada por via intramuscular (0,2 mL/Kgpv) no músculo peitoral profundo. Enquanto que os animais do grupo I foram tratados somente com canamicina 25 % (0,2 mL/Kgpv), do 6^o ao 12^o dpi, como descrito acima. Foi realizada a pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos como descrito anteriormente no item (4.3.1.2.2).

No 29º dpi, as aves foram sacrificadas para avaliação das alterações macroscópicas e pesquisa de SG Nalr 1035 em fígado, baço e ovário. As etapas de semeadura em placa foram realizadas como descrito anteriormente no item (4.3.1.1.2).

4.3.2 Experimentos de incubação de ovos férteis

4.3.2.1 Experimento 04: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de matrizes de linhagem de postura comercial das variedades vermelha e branca

Para este experimento foram utilizados 90 ovos provenientes de matrizes de postura de variedades branca e vermelha. A distribuição dos grupos, inóculos e vias de inoculação, está esquematizada na Tabela 4.

Tabela 4. Delineamento do experimento 04.

Grupo	Origem dos ovos	Local de inoculação	Inóculo*	Volume	Número de ovos
L	Matriz branca	Gema	6×10^8 UFC*	0,1 mL	30
M	Matriz vermelha	Gema	6×10^8 UFC*	0,1 mL	30
N	Matriz branca	Gema	PBS	0,1 mL	15
O	Matriz vermelha	Gema	PBS	0,1 mL	15

* Inóculo da estirpe SG Nalr 1035.

4.3.2.1.1. Inoculação de ovos férteis

No momento da chegada, foi realizada a desinfecção da casca dos ovos utilizando-se álcool 70 %. Os ovos foram identificados de acordo com grupo pertencente como descrito no delineamento experimental (Tabela 4). Posteriormente perfurados com um mandril metálico estéril e em seguida os

inóculos foram depositados na gema, utilizado-se seringa de um mL e agulha 25 x 7 mm, contendo o volume de 0,1 mL. Seguindo o mesmo esquema, inoculou-se 0,1 mL de PBS nos ovos dos grupos controle. Posteriormente os orifícios perfurados foram vedados com parafina.

4.3.2.1.2. Avaliação do desenvolvimento embrionário e nascimento de aves

Durante 21 dias, os ovos dos grupos L, M, N e O foram mantidos em incubadora (Premium Ecológica Ltda. - Brasil). A viragem dos ovos era efetuada automaticamente em intervalos de duas horas. Umidade e ventilação foram mantidas constantes. A temperatura de incubação foi ajustada a 37,5 °C até o 18º dia e modificada para 38 °C até o 21º dia.

Após a eclosão, os pintainhos foram alojados em baterias de cria, receberam aquecimento elétrico, água e ração ad libitum. As aves foram observadas durante dez dias para avaliação da transmissão, sinais clínicos e mortalidade, transcorrido o período, foram eutanasiadas para pesquisa de SG Nalr 1035 em fígado e baço.

Os ovos que não eclodiram foram submetidos ao embriodiagnóstico e à análise bacteriológica.

4.3.2.1.3. Embriodiagnóstico

Os ovos que não apresentaram desenvolvimento embrionário foram classificados como de inférteis. Enquanto que aqueles com desenvolvimento embrionário incompleto foram classificados da seguinte forma: mortalidade precoce (até quatro dias de desenvolvimento); mortalidade intermediária (de cinco até dezessete dias de desenvolvimento) e mortalidade tardia (de 18 a 21 dias de desenvolvimento). Ainda houve ovos outros denominados bicados, que são pintainhos que bicaram a casca, mas não conseguiram eclodir e ovos contaminados por fungos ou bactérias (PLANO; DI MATTEO, 2001).

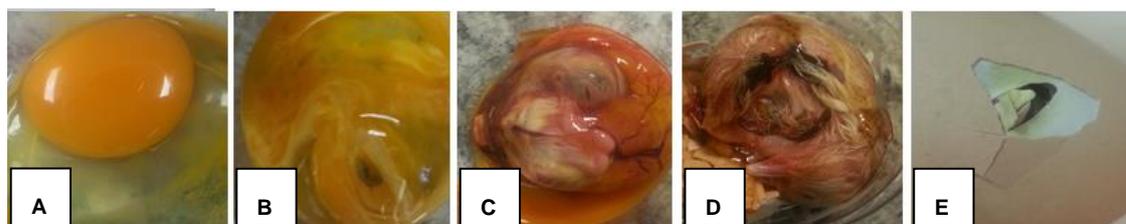


Figura 1. Embriodiagnóstico. (A) infértil (B) mortalidade precoce, (C) mortalidade intermediária, (D) mortalidade tardia, (E) bicado não nascido.

4.3.2.1.4. Exame bacteriológico para isolamento de SG Nalr 1035

Foram realizados “pools” de no máximo três ovos que não apresentaram desenvolvimento embrionário ou com mortalidade precoce. Os conteúdos dos mesmos foram reunidos e incubados a 37 °C / 24 horas. Os embriões classificados com mortalidade intermediária, mortalidade tardia e bicados não nascidos, foram colocados em frascos individuais e submetidos ao enriquecimento seletivo com SNNov (OXOID® RU) e incubados a 37 °C / 24 horas. Transcorrido o período de incubação as amostras foram semeadas em ágar VBNal (OXOID® RU) e incubadas a 37 °C / 24 horas.

4.3.2.2 Experimento 05: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de matrizes pesadas

Foram utilizados 90 ovos provenientes de matrizes de linhagem de corte com trinta e nove semanas de vida, as quais foram vacinadas na 12^a e 21^a semanas de idade com vacina inativada contra *S. Enteritidis*. A distribuição dos grupos, dos inóculos e as vias de inoculação, estão disponíveis na Tabela 5.

Tabela 5. Delineamento do experimento 05.

Grupo	Origem dos ovos	Local de inoculação	Inóculo	Volume	Número de ovos
P	Matriz de corte	Gema	6 x 10 ⁸ UFC*	0,1 mL	45
Q	Matriz de corte	Sem inoculo	-	-	45

* Inóculo da estirpe SG Nalr 1035.

Os procedimentos de inoculação dos ovos férteis, avaliação do desenvolvimento embrionário, nascimento de aves, embriodiagnóstico e exame bacteriológico para isolamento de SG Nalr 1035 seguiram os mesmos descritos para o experimento 04.

4.3.2.3 Experimento 06: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de avós de linhagem pesada

Foram utilizados 90 ovos provenientes de aves avós de uma linhagem pesada para produção de matrizes de corte com trinta e duas semanas de idade. Os ovos foram identificados distribuídos conforme delineamento detalhado na Tabela 6.

Tabela 6. Delineamento do experimento 06.

Grupo	Origem dos ovos	Local de inoculação	Inóculo	Volume	Número de ovos
R	Avó	Sem inoculo	-	-	20
S	Avó	Câmara de ar	6x10 ⁸ UFC* /mL	0,05 mL	35
T	Avó	Superfície trincada	10 ⁹ UFC /mL	0,05 mL	35

* Inóculo da estirpe SG Nalr 1035.

4.3.2.3.1. Inoculação de ovos férteis no experimento 06

Os ovos do grupo R permaneceram sem inóculo (grupo controle). Enquanto que no grupo S, os ovos foram perfurados na região da câmara de ar, evitando perfurar a membrana interna da casca, e 0,05 mL do inóculo foram depositados nesta região. Posteriormente os orifícios foram vedados com fita. No grupo T, os ovos foram trincados e 0,05 mL do inóculo foram espalhados na superfície da casca.

Etapas como avaliação do desenvolvimento embrionário e nascimento de aves, embriodiagnóstico e exame bacteriológico para isolamento de SG Nalr 1035, seguiram o descrito no experimento 04.

4.4. Experimento in vitro: Comparação dos perfis genéticos de estirpes de SG isoladas no Brasil por meio da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

4.4.1. Bactérias

Foram utilizadas 43 estirpes de SG, incluindo a estirpe vacinal SG 9R, a estirpe padrão (ATCC 9184) adquirida do “American Type Culture Collection” e a estirpe SG Nalr 1035 utilizada nos experimentos um a seis. A maioria das estirpes foram isoladas de aves com suspeita de tifo aviário atendidas no laboratório de Ornitopatologia da FCAV/Unesp e, posteriormente, tipificadas pelo Instituto Adolfo Lutz. Outras estirpes foram cedidas por laboratórios nacionais de referência ou credenciados (Lanagro, Fiocruz e Mercolab), tendo sido isoladas nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso. Todas as estirpes foram estocadas em “ultrafreezer”, no laboratório de Ornitopatologia da FCAV/Unesp.

As informações disponíveis sobre as estirpes utilizadas encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Dados gerais das estirpes de *S. Gallinarum*.

Estirpe	Nome original	Fonte	Local / ano
1	287/91 (297)	Fcav-Unesp	1991
2	5441b (37b)	Fcav-Unesp	Sem informação
3	19551/2009	Mercolab	2009
4	29038/2012 (51)	Mercolab	2012
5	24530/2010 (50)	Mercolab	2010
6	22124/2012 (49)	Mercolab	2012

7	31086/2012 (48)	Mercolab	2012
8	02/12 (45) 1911 SB2	IB	SP 2012
9	46 04/12 (46) SB3	IB	SP 2012
10	28814/2012 (47)	Mercolab	2012
11	4850/2009 (62)	Mercolab	Sem informação
12	23172/2010 (57)	Mercolab	2010
13	257/87-9*a	Fcav-Unesp	1987
14	5441-9	*	Sem informação
15	18/11 (44) SB1	IB	SP 2012
16	36 IOC 2003/01	Fiocruz	MATO GROSSO 2001
17	291/90	Fcav-Unesp	1990
18	293/90	Fcav-Unesp	1990
19	292/90	Fcav-Unesp	1990
20	7285-b	Fcav-Unesp	Sem informação
21	21	*	Sem informação
22	10	Lanagro	Sem informação
23	31-IOC3558/99 RS	Fiocruz	RS 1999
24	32	Fiocruz	Sem informação
25	1137/10-14	Lanagro	Sem informação
26	188-2	Lanagro	Sem informação
27	35-IOC4295/02 MG	Fiocruz	MG 2002
28	345/11	Lanagro	2011
29	33- IOC1780/96 SP	Fiocruz	SP 1996
30	2750 10/22	Lanagro	Sem informação
31	ATCC 9184	Fiocruz	ATCC
32	378 CR 350/06	*	Sem informação
33	34-IOC4623/98 MG	Fiocruz	MG 1998
34	1050/14	Fcav-Unesp	SP 2014
35	1049/14	Fcav-Unesp	2014
36	1005/14	Fcav-Unesp	SP 2014
37	1044/13	Fcav-Unesp	SP 2013
38	1047/14	Fcav-Unesp	SP 2014
39	1039/13	Fcav-Unesp	2013
40	1035/12	Fcav-Unesp	2012
41	1006/12	Fcav-Unesp	SP 2012
42	1000/11	Fcav-Unesp	2011
43	SG9R	Cepa vacinal	Smith, 1956

IB: Instituto biológico SP

*Sem informação

4.4.1.2. Análise por PFGE

Para caracterização dos perfis genéticos dos isolados de *Salmonella* Gallinarum por PFGE, seguiu-se o protocolo padrão disponível no PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>), conforme descrito por Ribot et al. (2006), com algumas modificações. As estirpes avaliadas foram cultivadas em ágar Brain Heart infusion BHI (OXOID® - RU Ref. CM1136) e incubadas a 37 °C/24 horas. Uma porção das colônias bacterianas foi transferida para 2 mL de tampão de suspensão de células - TSC (100 mM TRIS: 100 Mn EDTA, Ph 8,0) e, após ajustar a concentração de células em suspensão em um intervalo de 1,3 e 1,4 de densidade ótica (DO) foi transferida para microtubos previamente identificados.

Utilizou-se o sistema CHEF DR-III (Bio-Rad® - EUA). O DNA cromossomal bacteriano foi digerido com a enzima XbaI (Sigma® - EUA Ref. R7260) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose Pulsefield Certified 1 % (Bio-Rad® - EUA Ref. 1620137) submetidos à voltagem de 6V cm⁻¹, em ângulo de 120°, com tempo inicial de mudança de polaridade de 2.2 segundos e tempo final de mudança de polaridade de 54.2 segundos. A estirpe de *Salmonella* Braenderup (H9812) foi utilizada como padrão para o método e os géis submetidos à eletroforese por 21 horas a uma temperatura de 14 °C.

Após a eletroforese, o gel foi corado em 500 mL de água estéril contendo 50 µL de brometo de etídio por 30 minutos e descorados em água durante 20 min. O gel foi então visualizado em fotodocumentador (Fisher Scientific - EUA) e fotografado.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relativos à mortalidade foram analisados pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (GREENWOOD; NIKULIN, 1996). Frequência de isolamento foi calculada com o Teste Exato de Fisher. Os testes foram realizados com auxílio do programa estatístico “R” (CHAMBERS, 2008) e o nível de significância adotado foi de 5 % ($P < 0,05$).

Os padrões das bandas foram comparados utilizando-se o coeficiente de Dice a 1 % de tolerância e 0,5 % de otimização. O dendrograma foi calculado com o método de agrupamento UPGMA (Unweighted-pair group method using arithmetic averages algorithm), utilizando o software BioNumerics, versão 7.1 (Matemática aplicada, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

6. RESULTADOS

6.1 Experimentos com aves

6.1.1 Experimento 01: Avaliação da patogenicidade de SG Nalr 1035 para aves de linhagens comerciais utilizadas atualmente no Brasil

Os suabes de fundo de caixa realizados no momento da chegada das aves apresentaram-se negativos para *Salmonella* spp.

6.1.1.1 Avaliações dos sinais clínicos e mortalidade

Três dias após a infecção, aves vermelhas consideradas suscetíveis ao TA (grupos A1, B1, C1, A2, B2 e C2) apresentaram sinais clínicos como apatia, sonolência, perda de apetite, penas arrepiadas, diarreia amarelo-esverdeada contendo, ocasionalmente, traços de sangue. Não foram observados sinais clínicos nas aves brancas dos grupos D1, E1, F1, D2, E2 e F2, consideradas resistentes ao TA.

Notou-se mortalidade acentuada ($P < 0.05$) em aves das variedades vermelhas, com pico entre 5 e 8 dpi, conforme a Tabela 8. As concentrações dos inóculos não influenciaram as taxas de mortalidade das aves da mesma variedade ($P > 0.05$). Contudo, diferenças nas taxas de mortalidade entre os grupos de aves vermelhas e brancas foram encontradas ($P > 0.05$). As taxas de mortalidade das aves vermelhas variaram de 92 e 100 %. Enquanto que nas aves brancas as taxas de mortalidade variaram entre 0 e 4 %. Houve diferenças estatísticas ($P > 0.05$) somente entre aves de variedades distintas, vermelha e branca.

6.1.1.2 Análises bacteriológicas

SG Nalr 1035 foi recuperada do baço e fígado de aves remanescentes aos 28 e 35 dpi. Aves brancas pertencentes ao grupo F1 apresentaram frequência de isolamento ($P < 0,05$) mais elevada aos 28 e 35 dpi.

Tabela 8. Mortalidade de aves para postura de linhagens vermelhas e brancas desafiadas no dia 27 de vida com SG NaI^r 1035.

Variedade*	Número de aves	Dias após inoculação (dpi)																		Mortalidade **	
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	15	16	17	19	23	24	Total	%	
Aves vermelhas	A ₁	26	-	-	1	5	12	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25 ^a	96
	B ₁	25	1	1	1	6	13	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24 ^a	96
	C ₁	23	-	1	1	11	7	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ^a	100
	A ₂	30	-	1	1	2	11	6	5	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	29 ^a	96
	B ₂	25	-	-	-	2	6	3	5	2	-	1	-	-	1	1	1	-	1	23 ^a	92
	C ₂	25	-	-	-	2	10	6	2	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	23 ^a	92
Aves Brancas	D ₁	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^b	0
	E ₁	24	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 ^b	4
	F ₁	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^b	0
	D ₂	25	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 ^b	4
	E ₂	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^b	0
	F ₂	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^b	0

*Grupos A_{1,2}, B_{1,2} e C_{1,2}, aves vermelhas; D_{1,2}, E_{1,2} e F_{1,2}, aves brancas; aves dos grupos A₁ ao F₁ receberam cultura contendo 6 x10⁸ UFC de SGNaI^r 1035 2013, enquanto que as aves dos grupos A₂ ao F₂ receberam inóculo diluído com 6 x10⁶ UFC.

**Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (χ^2 , $P<0,05$) considerando-se a mesma dose de inóculo.

No entanto, a estirpe também foi isolada, mas em menor frequência de aves das outras linhagens brancas, pertencentes aos grupos D1 e E1 (Tabela 9).

Tabela 94. Recuperação de SG Nalr 1035 em fígado e baço de aves para postura comercial de diferentes linhagens de variedades vermelhas e brancas, infectadas experimentalmente.

Variedade	Grupo	Número de aves avaliadas 28 dpi*	Positivas	Número de aves avaliadas 35 dpi	Positivas
Aves vermelhas	A ₁	1	1	-	-
	B ₁	1	1	-	-
	C ₁	-	-	-	-
	A ₂	1	1	-	-
	B ₂	2	0	-	-
	C ₂	2	0	-	-
Aves brancas	D ₁	17	3	10	1
	E ₁	13	4	10	3
	F ₁	14	11**	10	6**
	D ₂	14	7	10	3
	E ₂	15	4	10	1
	F ₂	15	6	10	4

Dpi= dias pós-infecção

Grupos A_{1,2}, B_{1,2} e C_{1,2}, aves vermelhas; D_{1,2}, E_{1,2} e F_{1,2}, aves brancas; aves dos grupos A₁ ao F₁ receberam cultura contendo 6×10^8 UFC de SGNalr 1035 2013, enquanto que as aves dos grupos A₂ ao F₂ receberam inóculo diluído com 6×10^6 UFC

**Existe diferença entre as taxas de isolamento de SG Nalr 1035 em aves dos grupos D_{1,2}, E_{1,2} e F_{1,2} ($P < 0,05$).

6.1.2 Experimento 02: Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade e pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos de poedeiras comerciais de linhagens vermelha (tratadas com enrofloxacina) e branca desafiadas com SG Nalr 1035

6.1.2.1 Avaliação dos sinais clínicos e mortalidade

Dois dias após a infecção, as galinhas do grupo H (vermelhas) apresentaram-se apáticas, sonolentas e houve redução no consumo de água e ração. Nas galinhas do grupo G (brancas), os mesmos sinais clínicos foram observados, porém de forma mais branda e somente a partir do 5^o dpi.

Entre o 4º e 5º dpi, sete galinhas do grupo H vieram à óbito e as demais, da mesma variedade, apresentavam sinais clínicos. Ao iniciar a antibioticoterapia, a mortalidade cessou, entretanto, seis dias após concluir o tratamento, ocorreram quatro óbitos entre o 16º e 18º dpi. A mortalidade total foi de 11 das 15 galinhas do grupo H (vermelhas) e apenas uma galinha das 15 do grupo G (brancas), sendo que essa última veio a óbito aos seis dpi.

6.1.2.2 Avaliação das alterações macroscópicas

As 14 aves sobreviventes do grupo G (brancas) e as quatro do grupo H (vermelhas) foram eutanasiadas aos 45 dpi e examinadas quanto às alterações macroscópicas em fígado, baço e ovário. Não foram observadas alterações macroscópicas nas galinhas do grupo G. No entanto, notou-se hepatoesplenomegalia com áreas esbranquiçadas em fígado e baço de galinhas do grupo H (Figura 2). Aliado a isso, foi observado que os fígados estavam friáveis e congestionados, sendo que uma ave apresentou atrofia do ovário.

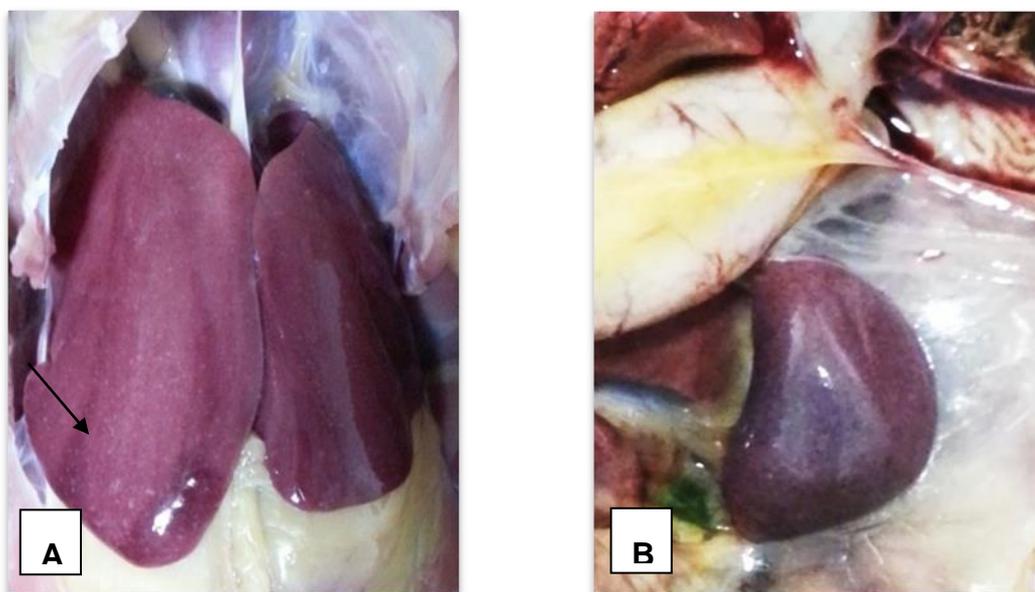


Figura 2. Alterações macroscópicas em fígado e baço de galinhas do grupo H (vermelhas), 45 dpi com SG NaI^r 1035. (A) Note hepatomegalia e presença de pontos esbranquiçados (seta). (B) Notar esplenomegalia.

6.1.2.3 Produção de ovos

Antes das galinhas serem inoculadas, a produção de ovos (correspondente ao número de ovos postos / número de aves / unidade de tempo) estava em torno de 78.7% para ambas as variedades (Tabela 10).

Tabela 10. Produção de ovos (porcentagem de ovos produzidos / número de galinhas) durante as duas semanas antes e cinco depois da infecção com SG NaI^r 1035.

Semanas pré e pós-inoculação	Porcentagem de produção das galinhas do grupo H	Porcentagem de produção das galinhas do grupo G
-2	81,90	80
-1	75,23	78
0	71,42	45,91
+1	-	2
+2	-	14,28
+3	21,42	48,97
+4	39,28	47,95
+5	50	54,08

Uma semana após a infecção, as galinhas do grupo H cessaram completamente a postura e só retomaram a produção na terceira semana pós-inoculação. A produtividade das galinhas do grupo G caiu até atingir 2% do total, uma semana após a inoculação. Entretanto, a produção de ovos foi gradualmente restaurada em ambos os grupos.

6.1.2.4 Análises bacteriológicas

Ao todo, 280 ovos foram examinados durante o experimento e SG NaI^r 1035 não foi isolada de nenhum ovo. Contudo, a bactéria foi detectada no fígado de 2/14, no baço de 2/14 e no ovário de 4/14 galinhas do grupo G. Todavia, a mesma não foi isolada nas galinhas do grupo H.

6.1.3 Experimento 03: Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade e pesquisa de SG Nalr 1035 em ovos de matrizes de linhagem de corte, desafiadas com SG Nalr 1035 e tratadas com antibióticos (enrofloxacina e canamicina).

6.1.3.1 Avaliações dos sinais clínicos e mortalidade

Foram observadas diarreia amarelo-esverdeada e diminuição do consumo de água e alimento nas aves pertencentes ao grupo J. Por outro lado, às aves do grupo I apresentavam-se com depressão, penas eriçadas, olhos fechados, diarreia amarelo-esverdeada e diminuição do consumo de água e alimento.

A mortalidade foi registrada durante 29 dias. Ao todo, quatro aves vieram à óbito, sendo três do grupo I e uma do J.

6.1.3.2 Análises bacteriológicas

Os ovos produzidos durante o experimento foram cultivados em “pool” de, no mínimo, três e SG Nalr 1035 não foi isolada dos mesmos. As aves sobreviventes foram submetidas à eutanásia no 29º dpi e, no exame necroscópico, foram observadas alterações similares em todos os animais avaliados. As alterações mais comuns foram esplenomegalia, fígados congestos e friáveis, ovários hemorrágicos ou atróficos. SGNalr 1035 foi isolada no ovário de uma ave do grupo J.

6.2 Experimentos de incubação de ovos férteis

6.2.1 Experimento 04: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de matrizes de linhagem de postura comercial das variedades vermelha e branca

Após a incubação artificial, os ovos que não eclodiram foram submetidos ao embriodiagnóstico e a posterior análise bacteriológica. A maioria dos embriões morreu precocemente nos grupos infectados. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

SGNalr 1035 foi isolada nos ovos colhidos dos grupos L e M, enquanto que nos grupos controles, N e O, os resultados foram negativos para o isolamento do patógeno (Tabela 12).

Tabela 115. Embriodiagnóstico referente ao experimento 04.

Idade embrionária	L	M	N	O
Número de ovos incubados	30	30	15	15
Infértil	3	7	3	0
Mortalidade precoce (1-4)	18	14	1	1
Mortalidade intermediária (5-17)	9	5	2	6
Mortalidade tardia (18-21)	0	4	6	3
Bicados	0	0	0	0
Total de ovos não eclodidos	30	30	12	10

Grupos L e N, aves brancas; M e O aves vermelhas. L e M receberam inóculo contendo 1×10^8 UFC de SG Nalr 1035 na gema, enquanto que os grupos N e O receberam somente PBS.

No 21º dia de incubação artificial, eclodiram oito pintainhos, sendo três do grupo N e cinco do grupo O. Logo após o nascimento, uma ave do grupo N e uma do grupo O vieram à óbito e foram colhidas amostras de fígado, baço e saco vitelino apresentando resultados negativos para o isolamento de SG Nalr 1035. Do 6º ao 10º dia pós-nascimento, quatro aves vieram a óbito e amostras de fígado, baço e saco vitelino foram negativas para o isolamento de SG Nalr 1035.

Tabela 62. Resultados do isolamento de SG Nalr 1035 após incubação de ovos de matrizes de postura de variedades vermelha e branca (experimento 04).

Amostras	Isolamento	L	M	N	O
Ovos	SG ao final da incubação	30/30	30/30	15/15	15/15
	Número de aves eclodidas	0	0	3	5
Aves	SG ao final da 1ª sem. após a eclosão			0/1	0/1
	SG ao final da 2ª sem. após a eclosão			2/2	2/2
	SG ao final do experimento				2/2

Ovos dos grupos L e N (variedade branca) e ovos dos grupos M e O (variedade vermelha). Ovos dos grupos L e M foram inoculados na gema com 1×10^8 UFC de SGNalr 1035, enquanto que os ovos dos grupos N e O receberam PBS na gema.

As aves remanescentes foram eutanasiadas aos dez dias pós-eclosão e foram observadas alterações patológicas como hepatomegalia, esplenomegalia,

pericardite, além disso, SG Nalr 1035 foi isolada de amostras de fígado, baço e saco vitelino (Tabela 12).

6.2.2 Experimento 05: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de matrizes pesadas

Após a incubação artificial, nasceram 32 aves, sendo todas pertencentes ao grupo Q (não infectado). Os ovos que não eclodiram foram submetidos ao embriodiagnóstico (Tabela 13).

Tabela 73. Embriodiagnóstico referente ao 05

Idade embrionária	P	Q
Número de ovos incubados	45	45
Infértil	0	0
Mortalidade precoce (1-4)	31	3
Mortalidade intermediária (5-17)	12	0
Mortalidadetardía (18-21)	2	8
Bicados	0	2
Total	45	13

Ovos do grupo P foram inoculados na gema com 1×10^8 UFC de SGNalr 1035; em quanto que os ovos do grupo Q não foram infectados.

Após o embriodiagnóstico, as amostras foram submetidas ao exame bacteriológico para isolamento de SG Nalr 1035 (Tabela 14). As amostras colhidas do grupo P apresentaram resultado positivo, enquanto que as do grupo Q foram negativas para o isolamento de SG Nalr 1035. Do 3º ao 10º dia após a eclosão, oito pintainhos morreram e amostras de fígado, baço e saco vitelino foram positivas para SGNalr 1035.

Tabela 14. Resultados do isolamento de SG Nalr 1035 após incubação dos ovos de matrizes de linhagem pesada (experimento 05).

Amostras	Isolamento	P	Q
Ovos	SG ao final da incubação	45/45	0/45
	Número de aves eclodidas	0	32
Aves	SG ao final da 1ª sem. após a eclosão		6/6
	SG ao final da 2ª sem. após a eclosão		2/2
	SG ao final do experimento		12/24

Ovos do grupo P foram inoculados na gema com 1×10^8 UFC/mL de SG enquanto que ovos do grupo Q não foram infectados.

No 10º dia pós-nascimento, as aves remanescentes foram eutanasiadas e submetidas à necropsia. As alterações macroscópicas observadas foram hepatoesplenomegalia (Figura 3). Colheram-se amostras de fígado e baço de cada ave para análise bacteriológica. Seis de doze amostras apresentaram resultados positivos para SGNalr 1035 (Tabela 14).

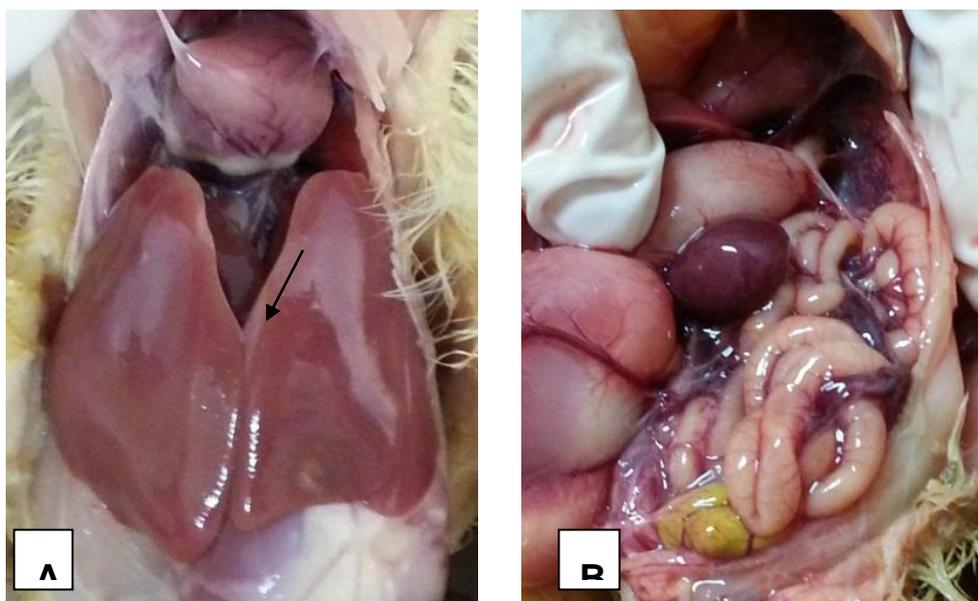


Figura 3. Alterações macroscópicas em fígado e baço de pintainhos de corte 10 dias após eclosão. (A) Note hepatomegalia e presença de pontos esbranquiçados (seta). (B) Notar esplenomegalia.

6.2.3 Experimento 06: Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos oriundos de avós de linhagem pesada

Aos 21 dias de incubação, nasceram 29 pintainhos, sendo sete do grupo do grupo R (não infectados), 17 do grupo S (inoculados na câmara de ar) e 11 do grupo T (inoculados na superfície da casca). Os ovos não-eclodidos foram submetidos ao embriodiagnóstico (Tabela 15). Após o exame, as amostras foram submetidas a análise bacteriológica (Tabela 16).

Tabela 8. Embriodiagnóstico referente ao experimento 06

Idade embrionária	R	S	T
Número de ovos incubados	20	35	35
Infértil	2	3	1
Mortalidade precoce (1-4)	0	7	6
Mortalidade intermediária (5-17)	2	1	0
Mortalidadetardía (18-21)	0	2	8
Bicados	9	5	9
Total	13	18	24

Ovos do grupo R não foram infectados enquanto que os ovos do grupo S receberam inóculo com 1×10^3 UFC de SGNaI^r 1035 na câmara de ar e os do grupo T receberam 1×10^8 UFC de SGNaI^r 1035 na superfície da casca trincada.

Amostras provenientes de aves do grupo R foram negativas para SG NaI^r 1035. Entretanto, o patógeno foi isolado de amostras dos grupos S e T. Durante os dez dias após a eclosão, os principais sinais observados foram apatia, prostração, penas eriçadas, diarreia amarelo-esverdeada e diminuição do consumo de água e alimento. Os dados referentes à mortalidade dos pintainhos foram registrados na tabela 16.

Tabela 16. Resultados do isolamento de SG NaI^r 1035 após incubação dos ovos de avós de linhagem de corte (experimento 06).

Amostras	Isolamento	R	S	T
Ovos	SG ao final da incubação	0/20	35/35	35/35
	Número de aves eclodidas	7	17	11
Aves	SG ao final da 1ª sem. após a eclosão	0/1	5/5	
	SG ao final da 2ª sem. após a eclosão		6/6	
	SG ao final do experimento	0/6	6/6	6/11

Ovos do grupo R não foram infectados; ovos do grupo S receberam inóculo com 10^3 UFC de SG NaI^r 1035 na câmara de ar e os do grupo T receberam 10^8 UFC de SGNaI^r 1035 na superfície da casca trincada.

Apenas uma ave do grupo R veio a óbito. No grupo S, a mortalidade teve início a partir do 3º dia pós-eclosão, estendendo-se até o 9º dia, com um total de 12 aves mortas. Por outro lado, no grupo T não houve mortalidade. Amostras do grupo S foram positivas para SG NaI^r 1035.

As aves remanescentes foram eutanasiadas e, durante a necropsia, notou-se hidropericárdio, hepatomegalia e esplenomegalia em aves do grupo S. Foram colhidas amostras de fígado, baço e saco vitelino de cada ave para análise bacteriológica e SG NaI^r 1035 foi isolada em seis amostras do grupo S. No grupo T,

seis de 11 foram positivas para SG Nalr 1035. Amostras adicionais de superfície e da água da incubadora foram colhidas e os resultados foram negativos para *Salmonella* spp.

6.3 Experimento in vitro

6.3.1 Comparação dos perfis genéticos de estirpes de SG isoladas no Brasil por meio da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

O dendrograma apresentado na Figura 4 contém a relação de distância genética entre as 43 estirpes de SG testadas por PFGE. Ao se traçar o ponto de corte em ≥ 70 % de similaridade, obteve-se 20 perfis de PFGE (A ao L). O perfil D agrupou 44 % das estirpes testadas, dentre elas, as estirpes SG 1035 (40) e SG 287 / 91 (1). Esses micro-organismos (perfil D) foram isolados nas regiões sudeste e no sul do país, entre 1990 e 2014. Para análise mais detalhada, o perfil D foi subdividido em nove subperfis (D1-D9).

O perfil D1 e o D2 demonstraram ter 90% de similaridade entre si, sendo compostos por estirpes isoladas no sul do país e no estado de São Paulo, respectivamente. Além disso, o perfil D2 agrupou estirpes isoladas entre o ano 2014 com a estirpe 291 / 90 (17), isolada em 1990. No perfil I foi observada alta similaridade entre a estirpe vacinal SG9R (43) e as estirpes 8, 9 e 15, sendo as últimas isoladas em surtos de TA no estado de São Paulo.

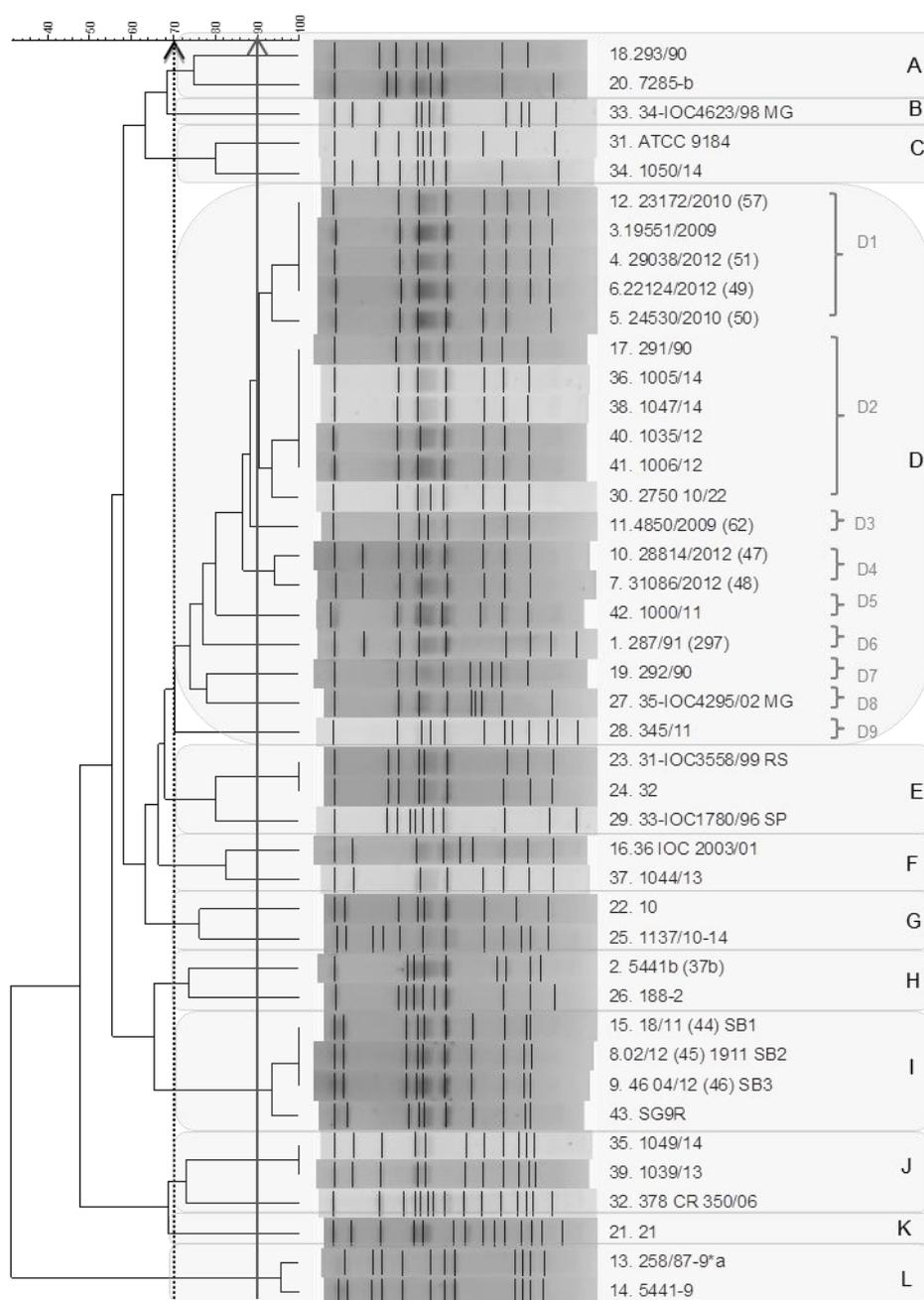


Figura 4. Dendrograma construído a partir do padrão de bandas obtidas por PFGE em isolados de SG.

7. DISCUSSÃO

O tifo aviário (TA) foi descrito pela primeira vez há mais de um século (KLEIN, 1889). Desde então, muitas pesquisas envolvendo esta doença vem sendo realizadas. Conseqüentemente, informações sobre a imunobiologia, epidemiologia e sobre as principais medidas para o controle do TA em lotes de aves comerciais são agora conhecidas (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008; BARROW; FREITAS NETO, 2011). Apesar disso, o TA ainda continua a ser diagnosticado em muitas partes do mundo, incluindo o Brasil (OIE, 2015).

Nas bases de dados da OIE, é possível observar que o TA tem estado presente em lotes de aves comerciais criadas no Brasil nas últimas décadas (OIE, 2015). No entanto, os surtos eram geralmente restritos a lotes de galinhas para postura comercial de ovos vermelhos. Nos últimos quatro anos, tem sido relatada a disseminação do TA também em outros tipos de criações que compõem a avicultura industrial brasileira. A enfermidade tornou-se um problema para lotes frangos de corte e até mesmo para lotes de matrizes criadas em várias regiões do Brasil (SESTI, 2013).

A fim de investigar as possíveis causas que levaram à propagação do TA nos planteis avícolas brasileiros, o presente estudo foi realizado. Vários fatores que podem desempenhar um papel crucial na transmissão de SG foram aqui avaliados.

O melhoramento genético das linhas comerciais de aves para postura comercial poderia ter alterado a relação parasito-hospedeiro e favorecido a infecção persistente de SG (i). Neste caso as aves albergariam o patógeno por longos períodos no ambiente de criação. Esta hipótese foi testada por meio de infecção experimental de aves para postura comercial (três variedades de galinhas vermelhas e três de galinhas brancas) atualmente comercializadas no Brasil.

As aves pertencentes às linhagens consideradas suscetíveis (vermelhas) apresentaram sinais comuns de TA, incluindo penas eriçadas, sonolência, apatia, queda no consumo de água e ração e diarreia amarelo-esverdeada. As taxas de mortalidade em aves desses grupos atingiram quase 100 % entre os 5 e 8 dpi. Resultados semelhantes foram relatados em estudos anteriores, nos quais foi avaliada a susceptibilidades de aves para postura comercial de diferentes

variedades frente à infecção experimental por SG (OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005; FREITAS NETO et al., 2007).

No presente estudo, a mortalidade e os sinais clínicos do TA nas aves de variedades brancas foram praticamente ausentes. Resultados diferentes daqueles descritos por Freitas Neto et al. (2007) que relataram sinais de TA e mortalidade entre 7 e 40% em aves de variedades brancas, anteriormente criadas no Brasil. Aparentemente, as poedeiras brancas comercializadas atualmente no Brasil são mais resistentes ao TA do que aquelas avaliadas pelos autores acima citados.

Neste trabalho, cerca de 70 % das aves das variedades brancas (grupos D1, E1, F1, D2, E2 e F2) ainda continuavam infectadas com SG aos 28 dias pós-infecção (dpi). Esta percentagem foi mais elevada que a observada em aves das variedades vermelhas (grupos A1, B1, C1, A2, B2 e C2) ($P < 0,5$) e também mais elevada do que o descrito por Freitas Neto et al., (2007). Esse achado indica que aves das variedades brancas (D1, E1, F1, D2, E2 e F2), embora pareçam saudáveis, ainda sim poderiam albergar SG por longos períodos, atuando como fontes de infecção (BERCHIERI JUNIOR et al., 2000). Portanto, a substituição de plantéis de aves para postura comercial de ovos vermelhos por lotes de aves consideradas resistentes a SG (brancas) não seria uma boa estratégia a ser adotada no controle do TA (BUMSTEAD; BARROW, 1993).

A quimioterapia tem sido empregada no controle do TA há várias décadas (MOORE, 1948; WILSON, 1956; GORDON; TUCKER, 1957). No entanto, o método não é completamente satisfatório, uma vez que os surtos da enfermidade podem voltar a ocorrer após cessar o tratamento. Aliado a isso, a administração prolongada de quimioterápicos pode ser tóxica para as aves e elevar as taxas de mortalidade (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Apesar dessas informações, a quimioterapia ainda é comumente adotada para tratar os surtos de TA em aves de postura comercial no Brasil. Entretanto, essa prática não é legalmente autorizada para lotes de aves reprodutoras (BRASIL, 2003). Estaria a quimioterapia favorecendo a manutenção de SG nos plantéis de aves brasileiros e com isso sua disseminação (ii)? Esta hipótese foi investigada no presente estudo em aves adultas de variedades branca e vermelha para postura comercial e também em matrizes de

corde. O tratamento com antibióticos nas doses adotadas reduziu, mas não foi suficiente impedir a mortalidade e a morbidade provocada por SG nas matrizes vermelhas e nas matrizes de corte. As aves da variedade branca de postura comercial também apresentaram sinais clínicos do TA, sendo que a antibióticoterapia não foi capaz de eliminar a infecção destas aves.

Estes resultados estão de acordo com os de estudos anteriores os quais demonstraram que vários agentes quimioterápicos foram eficazes na redução da mortalidade, mas não conseguiram eliminar SG das aves (MOORE, 1948; WILSON, 1956; GORDON; TUCKER, 1957).

A antibioticoterapia para tratamento do TA não favoreceu a excreção de SG nos ovos. À semelhança do que tem sido relatado em estudos anteriores, SG não foi recuperado a partir dos ovos examinados (BERCHIERI JUNIOR et al., 2000; OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005).

Durante os quadros agudos de TA, é observada a queda da postura em aves susceptíveis (IBRAHIM et al., 2003; EZEMA; ONUOHA; CHAH, 2009). No presente trabalho, esse achado foi constatado também nas aves brancas, nas quais a postura foi reduzida de 45 % para 2 %, retornando de forma lenta aos 14 % duas semanas após a inoculação de SG. Enquanto que as aves susceptíveis apresentaram interrupção total da postura. Sendo que a mesma atingiu gradualmente 6 % apenas três semanas após o desafio. Achado semelhante foi observado por Ezema, Onuoha e Chah (2009) os quais relataram que poedeiras com TA tratadas com flumequina recuperavam gradualmente a produção de ovos.

A propagação do TA a nível nacional sugere o envolvimento da transmissão vertical e de incubadoras como fatores de disseminação (iii). Na tentativa de simular a transmissão vertical e a disseminação de TA na incubação, SG foi inoculada em ovos férteis de diferentes linhagens de aves (provenientes de matrizes para produção de aves de postura das variedades vermelha e branca, matrizes e avós de frangos de corte). Após o período de incubação SG ainda era viável e foi recuperada a partir dos ovos infectados de todas as linhagens. Apesar de todos os embriões infectados por SG não terem sido capazes de se desenvolver, aves provenientes de ovos não desafiados foram infectadas após a eclosão. Portanto, se de alguma forma

SG atingir a gema ou câmara de ar de ovos férteis, esta pode ser transmitida para aves recém-eclodidas no interior da máquina de incubação. Possíveis materiais contaminados, tais como (casca, albúmen, gema e embriões mortos) que permaneceram na incubadora seriam a fonte de SG no presente estudo. Com o advento da incubação comercial, a transmissão e disseminação de patógenos tornou-se uma das mais importantes. A exemplo disso, tem-se a transmissão e disseminação da pulorose via incubatório nos anos de 1910, episódio que praticamente inviabilizou a avicultura industrial no referido período (BULLIS, 1977).

Portanto, embora este seja o primeiro relato que comprove a possibilidade de transmissão de SG durante o processo de incubação dos ovos, não é novidade que devidas precauções de biossegurança são necessárias nesta fase da produção avícola (VAN ROEKEL et al., 1951; STUART; KEENUM, 1970).

Os cuidados com a qualidade da incubação se iniciam em etapas anteriores a essa. Por exemplo, com a ausência de patógenos nos lotes de matrizes. O que estaria relacionado com a adoção de medidas de biossegurança que incluem a limpeza e desinfecção das instalações, descarte de lotes infectados por SG e também com a prevenção de fatores de risco que podem prejudicar a qualidade física e microbiológica dos ovos (GAST, 2008; KIM; KIM, 2010). Portanto, é provável que falhas na execução de componentes de programas de biossegurança ocorridas em granjas de aves reprodutoras seriam responsáveis pela propagação do TA no Brasil.

Também foi aventada a hipótese de que uma estirpe de SG apresentando um perfil genético distinto, patogenicidade reduzida (levando a infecção persistente) e capacidade de ser transmitida verticalmente tivesse se disseminado nos plantéis avícolas brasileiros (IV). Esta hipótese foi testada e prontamente rejeitada quando os perfis genéticos de 43 estirpes de SG foram gerados por PFGE e comparados. O isolado (40) SG 1035/2012 recuperado de um surto recente que ocorreu no estado de São Paulo foi agrupado em conjunto com outras 18 estirpes com 90 % de similaridade (perfil D). Entre as quais estão a estirpe (1) 287/1991 também isolada no estado de São Paulo em 1991 e ainda estirpes isoladas em outros estados das regiões Sul e Sudeste entre os anos de 1990 e 2014. Portanto, os resultados

apresentados indicam que estirpes, com perfis genéticos muito parecidos aos daquelas isoladas no passado, estão aparentemente envolvidas nos surtos de TA recentes diagnosticados no Brasil. Estes dados revelam que um padrão clonal dos isolados de SG têm circulado nos lotes de aves dessas regiões há mais de 20 anos.

A técnica do PFGE também foi aplicada com sucesso em investigações epidemiológicas de surtos de TA relatados em outros países (KWON et al., 2010; SEO et al., 2006; VAN IMMENSEEL et al., 2013). Na Coreia, vários perfis genéticos de SG foram encontrados, mas nenhum deles parecia estar geograficamente limitado a uma região específica (SEO et al., 2006).

De acordo com os resultados do presente trabalho não há indícios de que as alterações genéticas em linhagens comerciais de aves ou uma nova estirpe de SG seriam responsáveis pelos surtos de TA que aconteceram nos últimos anos no Brasil. Além disso, a transmissão vertical de SG não foi reproduzida nos experimentos realizados com incubação. No entanto, aves recém-eclodidas foram infectadas por contato após a incubação conjunta com ovos contaminados. Novos estudos deverão ser realizados para avaliar os fatores de risco, tais como a melhorias nos métodos de monitoria de SG em lotes de aves reprodutoras, a manipulação e destino das aves mortas e resíduos das incubadoras e o transporte de lotes de descarte de matrizes e de poedeiras comerciais destinadas ao abate.

8. CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente estudo foi realizado concluiu-se que:

- A estirpe de SG (1035) isolada de um surto recente de TA não apresenta alterações de patogenicidade.
- O uso de antibióticos para o tratamento de aves com TA não favorece a excreção/transmissão de SG por meio de ovos.
- Não foi possível simular a transmissão vertical de SG por meio de incubação de ovos férteis inoculados. Porém, aves recém-eclodidas originárias de ovos não inoculados foram infectadas por contato durante e após a eclosão.
- Os pulsotipos de estirpes de SG isoladas de surtos recentes de TA não diferem daqueles de estirpes isoladas nos últimos 20 anos.

9. REFERÊNCIAS

ASSOKU, R.; PENHALE, W. J. An immunological basis for the anaemia of acute *Salmonella* Gallinarum infection of chicken. II. The relationship of the immune response to the development of the haemolytic anaemia. **Clinical & Experimental Immunology**, Chichester, v. 7, n. 6, p. 875-883, 1970.

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid – new thoughts on old disease: a review. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2011.

BARROW, P. A.; JONES, M. A.; SMITH A. L.; WIGLEY P. The long view: *Salmonella* – the last forty years. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 41, n. 5, p. 413-420, 2012.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A. Experimental infection of egg laying hens with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 20, n. 2, p. 339–352, 1991.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A.; MURPHY, C. K.; PAGE, K. *Salmonella* infection in a commercial line of ducks; experimental studies on virulence, intestinal colonisation and immune protection. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.123, n. 1, p. 121–132, 1999.

BARROW, P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A.; BINNS, M. M. Contribution of *Salmonella* gallinarum large plasmid toward Virulence in fowl typhoid. **Infection and Immunity**, Washington, v. 55, n. 2, p. 388–392, 1987.

BEACH, J. R.; DAVIS, D. E. Acute infection in chicks and chronic infection of the ovaries of hens caused by the fowl typhoid organisms. **Hilgardia**, v. 2, n. 12, p. 411-424, 1927.

BEAUDETTE, R. F. Fowl typhoid and bacillary white diarrhea. In: INTERNATIONAL VETERINARY CONGRESS, 11., 1930, Londres. **Proceedings...** Londres: [s.n.], 1930. p. 705-723.

BEAUDETTE, F. R. Fowl typhoid and bacillary white diarrhea. In: INTERNATIONAL VETERINARY CONGRESS, 11., London, 1930. **Proceedings...** London UK: [s.n.], 1930. p. 705-723.

BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P. A. O desenvolvimento da microbiota intestinal em pintos de corte: prós e contras. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1998, p. 183-190.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 435-454.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella* enterica serovars Pullorum and Gallinarum in chickens effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 30, n. 3, p. 221-231, 2001.

BERCHIERI JUNIOR, A.; OLIVIERA, G. H.; PINHEIRO, L. A. S.; BARROW, P. A. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hens. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 50-52, 2000.

BLACKWELL, J. M.; GOSWAMI, T.; EVANS, C. A.; SIBTHORPE, D.; PAPO, N.; WHITE, J. K.; SEARLE, S.; MILLER, E. N.; PEACOCK, C. S.; MOHAMMED, H.; IBRAHIM, M. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. **Cellular Microbiology**, Chichester, v. 3, n. 12, p. 773-784, 2001.

BOXRUD, D.; PEDERSON-GULRUD, K.; WOTTON, J.; MEDUS, C.; LYSZKOWICZ, E.; BESSER, J.; BARTKUS, J. M. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella* enterica Serotype Enteritidis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 2, p. 536–543, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de legislação**: Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil. Manual Técnico. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/Aniamal/Manual%20de%20Legisla%C3%A7%C3%A3o%20-%20Sa%C3%BAde%20Animal%20-%20low.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2016.

BULLIS, K. L. The history of avian medicine in the U.S. II. Pullorum disease and fowl typhoid. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 21, n. 3, p. 422-429, 1977.

BUMSTEAD, N.; BARROW, P. A. Genetics of resistance to *Salmonella* Typhimurium in newly hatched chicks. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 521-529, 1988.

BUMSTEAD, N.; BARROW, P. Resistance to *Salmonella* Gallinarum, *S. pullorum*, and *S. enteritidis* in inbred lines of chickens. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 37, n. 1, p. 189-193, 1993.

CALENGE, F.; KAISER, P.; VIGNAL, A.; BEAUMONT, C. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. **Genetics Selection Evolution**, London, v. 42, p. 11, 2010.

CHAMBERS, J. M. **Software for data analysis: programming with R**. New York: Springer, 2008.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 53-59, 2009.

CHRISTENSEN, J. P.; SKOV, K. N.; HINZ, K. H.; BISGAARD, M. *Salmonella enterica* serovar Gallinaum biovars Gallinarum in layers: Epidemiological investigations of a recent outbreak in Denmark. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 23, n. 3, p. 489–501, 1992.

CHRISTENSEN, J.; BARROW, P.; OLSEN, J.; POULSEN, J.; BISGAARD, M. Correlation between viable counts of *Salmonella* Gallinarum in spleen and liver and the development of anaemia in chickens as seen in experimental fowl typhoid. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 25, n. 4, p. 769-783, 1996.

COBB, S. P.; MCVICAR, C. M.; DAVIES, R. H.; AINSWORTH, H. Fowl typhoid in caged layer birds. **Veterinary Record**, London, v. 157, n. 9, p. 268, 2005.

DAVIES, R. H.; BRESLIN, M. Persistence of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty freerange chicken farm. **Environmental Microbiology**, Addlestone, v. 5, n. 2, p. 79–84, 2003.

DAVIS, M. A.; BAKER, K. N.; CALL, D. R.; WARNICK, L. D.; SOYER, Y.; WIEDMANN, M.; GRÖHN, Y.; MCDONOUGH, P. L.; HANCOCK, D. D.; BESSER, E. T. Multilocus variable-number tandem-repeat method for typing *Salmonella enterica* serovar Newport. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 4, n. 7, p. 1934–1938, 2009.

DODSON, S. V.; MAURER, J. J.; HOLT, P. S.; LEE, M. D. Temporal changes in the population genetics of *Salmonella pullorum*. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 43, n. 4, p. 685–695, 1999.

EZEMA, W. S.; ONUOHA, E.; CHAH, K. F. Observations on an outbreak of fowl typhoid in commercial laying birds in Udi, South Eastern Nigeria. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 18, n. 4, p. 395-398, 2009.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. **Trends in Microbiology**, Kidlington, v. 9, n. 8, p. 397-403, 2001.

FREITAS NETO, O. C.; ARROYAVE, W.; ALESSI, A. C.; FAGLIARI, J. J.; BERCHIERI JUNIOR, A. Infection of comercial laying hens with *Salmonella Gallinarum*: clinical, anatomopathological and haematological studies. **Poultry Science**, Cary, v. 9, n. 2, p.133-141, 2007.

GAST, R. K. Paratyphoid infections. In: SAIF, M. Y.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Disease of poultry**. Ames: Blackwell, 2008. p. 619-674.

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

GORDON, R. F.; GARSIDE, J. S.; TUCKER J. F. The use of living attenuated vaccines in the control of fowl typhoid. **Veterinary Record**, London, v. 71, p. 300-305, 1959.

GORDON, R. F.; TUCKER, J. F. The treatment of chronic carriers of *Salmonella* pullorum with furazolidone. **The British Veterinary Journal**, Cambridge, v. 113, p. 99-111, 1957.

GORDON, W. A. M.; LUKE, D. A. note on the use of the 9R fowl typhoid vaccine in poultry breeding flocks. **Veterinary Record**, London, v. 71, n. 145, p. 926-927, 1959.

GREENWOOD, P. E.; NIKULIN, M. S. **A guide to chi-squared testing**. New York: John Wiley & Sons, 1996. 280 p.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In:_____. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***. 9. ed. Paris, 2007. 166 p.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. A.; WEILL, F. X. Supplement 2003–2007 (No. 47) to

the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Issy les Moulineaux, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

HALL, W. J.; LEGENHAUSEN, D. H.; MACDONALD, A. D. Studies on fowl typhoid. 1. Nature and dissemination. **Poultry Science**, Cary, v. 28, p. 344-362, 1949.

IBRAHIM, N. D. G.; ABDU, P. A.; NJOKV, C. O.; ADEKEYE, J. O. Fowl typhoid in three commercial poultry farms in Zaria. Nigeria. **Nigerian Veterinary Journal**, Abuja, v. 24, n. 2, p. 63-66, 2003.

IVANICS, E.; KASZANYITZKY, E.; GLAVITS, R.; SZEREDI, L.; SZAKALL, S.; IMRE, A.; KARDOS, G.; NAGY, B. Acute epidemic disease in laying hen flocks, caused by *Salmonella* Gallinarum. **Magyar Allatorvosok Lapja**, Budapest, v. 130, n. 10, p. 611–617, 2008.

JEONG, J. H.; SONG, M.; PARK, S. I.; CHO, K. O.; RHEE, J. H.; CHOY, H. E. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 19, p. 6340-6350, 2008.

JONES, M. A.; WIGLEY, P.; PAGE, K. L.; HULME, S. D.; BARROW, P. A. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5471-5476, 2001.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by

Salmonella typhimurium, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. **Microbiology**, Reading, v. 146, pt. 12, p. 3217-3226, 2000.

KIM, A.; LEE, Y. J.; KANG, M. S.; KWAG, S. I.; CHO, J. K. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 8, n. 2, p. 155–161, 2007.

KIM, J. H.; KIM, K. S. Hatchery hygiene evaluation by microbiological examination of hatchery samples. **Poultry Science**, Cary, v. 89, n. 7, p. 1389-1398, 2010.

KISIELA, D.; KUCZKOWSKI, M.; KICZAK, L.; WIELICZKO, A.; UGORSKI, M. Differentiation of *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum from *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum by PCR-RFLP of the *fimH* gene. **Journal of Veterinary Medicine**, New York, v. 52, n. 5, p. 214-218, 2005.

KLEIN, E. Über eine epidemische Krankheit der Hu"hner, verursacht durch einen Bacillus, Bacillus gallinarum. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, Stuttgart, v. 5, p.689-693, 1989.

KWON, Y. K.; KIM, A.; KANG, M. S.; HER, M.; JUNG, B. Y.; LEE, K. M.; JEONG, W.; AN, B. K.; KWON, J. H. Prevalence and characterization of *Salmonella* Gallinarum in the chicken in Korea during 2000 to 2008. **Poultry Science**, Cary, v. 89, n. 2, p. 236-242, 2010.

LINDSTEDT, B. A.; VARDUND, T.; AAS, L.; KAPPERUD, G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 163–172, 2004.

LIU, W.; KAISER, M. G.; LAMONT, S. J. Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms and response to vaccine against or challenge with *Salmonella* Enteritidis in young chicks. **Poultry Science**, Cary, v. 82, n. 2, p. 259-266, 2003.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **The Journal of Higiene**, London, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

BRASIL. Instrução normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 nov. 2003, seção 1, p. 3. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 17 jun. 2009.

MOORE, E. N. The efficacy of recently developed sulfonamides against fowl typhoid. **Poultry Science**, Cary, v. 25, p. 307-311, 1948.

MORENG, R. E.; AVÉNS, J. S. **Ciência e Produção de Aves**. São Paulo: ROCA, 1990. p. 212-213.

OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH). Fowl typhoid and Pullorum disease. In: _____ **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris, 2012. Chap. 2.3.11, p. 538–548.

OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH). **Wahis Interface**: disease information, 2015. Paris, 2013. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail>. Acesso em: 18 mar. 2015.

OLIVEIRA, G.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, A. experimental infection of laying hens with *Salmonella Enterica* Serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 51-56, 2005.

OLSEN, J.; SKOV, M. N.; CHRISTENSEN, J.; BISGAARD, M. Genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 45, n. 6, p. 413-418, 1996.

OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; SKOV, M. N.; CHRISTENSEN, J. P. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. **The Veterinary Quarterly**, Abingdon, v. 15, n. 4, p. 125-35, 1993.

PARMAR, D.; DAVIES, R. M. Fowl typhoid in a small backyard laying flock. **Veterinary Record**, London, v. 160, n. 10, p. 348, 2007.

PASCOPELLA, L.; RAUPACH, B.; GLORI, N.; MONACK, D.; FALKOW, S.; SMALL, P. L. Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4329–4335, 1995.

PLANO, C. M.; DI MATTEO, A. M. **Atlas de patología de la incubación del pollo**. Buenos Aires: [s.n.], 2001. 119 p. Disponível em: <http://www.guzlop-editoras.com/web_des/ing01/ingzoo/pld1179.pdf>. Acesso em: 30 maio 2016.

POMEROY, B. S. Fowl typhoid. In: HOFSTAD, M. S.; CALNEK, B. W.; HELMBOLT, C. F.; REID, W. M.; YODER, JR. H. W. **Diseases of poultry**. 7th ed. Ames: Iowa State University Press, 1978. p. 100-116.

POMEROY, B. S.; NAGARAJA, K. V. Fowl typhoid. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER JUNIOR, H. W. **Diseases of Poultry**. 9th ed. London: Wolfe Publishing, 1991. p. 87-99.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Kauffmann- White Scheme. **Research in Microbiology**, Issy les Moulineaux, v. 147, n. 39, p. 765-769, 1996.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR; L. E. Genus XXIII. *Salmonella* Lignères 1900, 389AL. In: GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York, 2005. p. 764-799.

PULIDO, M.; MANTILLA, J. Tifoidea aviar en ponedoras comerciales: diagnóstico y propuesta de control de una enfermedad emergente. In: Convención Anual ANECA, 33., 2008, Puerto Vallarta. **Memorias...** Puerto Vallarta: 57th Western Poultry Disease Conference, 2008.

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; DO NASCIMENTO, V. P. Presence of *Salmonella* enteritidis and *Salmonella* gallinarum in commercial laying hens diagnosed with fowl typhoid disease in Colombia. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 58, n. 1, p. 165-170, 2014.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRET, T. J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

RICHARDSON, E. J.; LIMAYE, B.; INAMDAR, H.; DATTA, A.; MANJARI, K. S.; PULLINGER, G. D.; THOMSON, N. R.; JOSHI, R. R.; WATSON, M.; STEVENS, M. P. Genome sequences of *Salmonella enterica* serovar typhimurium, choleraesuis, dublin, and gallinarum strains of well-defined virulence in food-producing animals. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, n. 12, p. 3162-3163, 2011.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, R. C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, v. 37, n. 1, p. 67-75, 1984.

SEO, Y. S.; LEE, S. H.; SHIN, E. K.; KIM, S. J.; JUNG, R.; HAHN, T. W. Pulsed-field gel electrophoresis of *Salmonella gallinarum* and comparison with random amplified polymorphic DNA. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 4, p. 349-357, 2006.

SETTA, A. M.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars enteritidis, infantis, pullorum and gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 397- 410, 2012.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Pullorum disease and fowl typhoid. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 12. ed. Ames: Iowa State Press, 2008. p. 620-636.

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

SMITH, H. W. The use of live vaccines in experimental *Salmonella* gallinarum infection in chickens with observations on their interference effect. **The Journal of hygiene**, London, v. 54, n. 3, p. 419-432, 1956.

SMITH, H. W. Observations on experimental fowl typhoid. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 65, p. 37–54, 1955.

STUART, E. E.; KEENUM, R. D. Preincubation treatment of chicken hatching eggs infected with *Salmonella* Pullorum. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 14, n. 1, p. 87-95, 1970.

SUMANO, L. H.; GUTIERREZ, O. L. **Farmacología clínica en aves**. 4th ed. **Cidade:** Mc Graw Hill, 2010. p. 104-109.

TENOVER, F. C.; ARBELIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2233–2239, 1995.

VAN IMMERSEEL, F.; STUDHOLME, D. J.; EECKHAUT, V.; HEYNDRICKX, M.; DEWULF, J.; DEWAELE, I.; VAN HOOREBEKE, S.; HAESEBROUCK, F.; VAN MEIRHAEGHE, H.; DUCATELLE, R.; PASZKIEWICZ, K.; TITBALL, R.W. *Salmonella* Gallinarum field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. **Vaccine**, Amsterdam, v. 31, n. 43, p. 4940-4945, 2013.

VAN ROEKEL, H.; BULLIS, K. L.; SNOEYNBOS, G. H.; CLARKE, M. K.; FLINT, O. S. Significant observations in pullorum disease eradication. **Journal of Veterinary Medicine**, New York, v. 46, n. 2, p. 18-19, 1951.

WIGLEY, P.; BERCHIERI JUNIOR, A.; PAGE, K. L.; SMITH, A. L.; BARROW, P. A. *Salmonella enterica* serovar Pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens. **Infection and immunity**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7873-7879, 2001.

WIGLEY, P.; JONES, M. A.; BARROW, P. A. *Salmonella enterica* serovar Pullorum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system for virulence and carriage in the chicken. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 69, n. 9, p. 501–506, 2002.

WILSON, J. E. The treatment of carriers of *Salmonella pullorum* and *Salmonella Gallinarum* with furazolidone. **The Veterinary Record**, London, v. 68, p. 748-751. 1956.

WRAY, C.; DAVIES, R. H. **Guideline on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference to *Salmonella* Enteritidis**. Graz: WHO, 1994. p. 8-17.

YU, L.; YAN-HONG, F.; HENG-WEN, Z.; PEI, S.; JIAN-ZHONG, W.; ZHONG JUN, Y. The Analysis of ERIC-PCR Genomic Polymorphism of *Salmonella* Isolated Strains in Pig Carcass. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, n. 13, p. 1694-1698, 2011.

ZANCAN, F. B.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella spp* investigation in transport box of day old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 230-232, 2000.