

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE
Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal



Dissertação

Título

Genotipificação de *Salmonella* Gallinarum isolada de casos de tifo aviário em Santa Catarina e associação à fatores predisponentes para ocorrência

Autor

Diogo Luiz Gadotti

Concórdia, 2018

Autor

Diogo Luiz Gadotti

Título

Genotipificação de *Salmonella* Gallinarum isolada de casos de tifo aviário em Santa Catarina e associação à fatores predisponentes para ocorrência

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Diogenes Dezen

Coorientador (es): Sabrina Castilho Duarte

Jalusa Deon Kich

Priscila Belleza Maciel

Concórdia, 2018

Gadotti, Diogo Luiz

Genotipificação de *Salmonella* Gallinarum isolada de casos de tifo aviário em Santa Catarina e associação à fatores predisponentes para ocorrência -2018.

Páginas 35.

Orientador	Diogenes Dezen
Co-orientador	Sabrina Castilho Duarte
	Jalusa Deon Kich
	Priscila Belleza Maciel

Dissertação (Mestrado Profissional) / Instituto Federal Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal.

1. avicultura; biosseguridade; epidemiologia; biologia molecular; genotipagem.

Autor

Diogo Luiz Gadotti

Título

Genotipificação de *Salmonella* Gallinarum isolada de casos de tifo aviário em Santa Catarina e associação à fatores predisponentes para ocorrência.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

Data da Defesa: 09/08/2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Diogenes Dezen (Orientador)

Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Sabrina Castilho Duarte

Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás

Prof. Dra. Teane Milagres Augusto Gomes

Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Paulo Augusto Esteves

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha esposa Jociele, amor e porto seguro, sempre ao meu lado incentivando-me a ser uma pessoa e um profissional melhor.

Agradecimentos

À DEUS, por me conceder saúde e sabedoria para concluir mais uma etapa de minha caminhada neste mundo;

A minha esposa Jocielle, que me incentivou a fazer o mestrado e apoiou-me de forma incondicional em todos os momentos desta jornada;

A minha colega de trabalho na CIDASC Priscila Maciel, com quem compartilhei o interesse na realização deste curso e forneceu o esboço da ideia de projeto, além de viabilizar o suporte financeiro e contatos para que a pesquisa fosse realizada;

A Doutora Sabrina Castilho Duarte, pesquisadora da EMBRAPA-Concórdia, que desde o contato inicial, se mostrou solícita e viabilizou, sem medir esforços, que a pesquisa fosse realizada, através do auxílio na redação do pré-projeto de pesquisa, da utilização da estrutura laboratorial da EMBRAPA Suínos e Aves-Concórdia, utilização de reagentes, além das valiosas orientações para que esta pesquisa se tornasse realidade;

A Raquel Rebelatto, analista do laboratório de sanidade animal da Embrapa Suínos e Aves, que, com todo cuidado, paciência e experiência, realizou toda a parte de bancada desta pesquisa, a qual não seria possível chegarmos aos resultados que foram alcançados.

Ao Professor Doutor do IFC Concórdia, Diogenes Dezen, que acreditou neste projeto de pesquisa, aceitou ser meu orientador e, através de seus ensinamentos, colaborou de forma decisiva para que a pesquisa ocorresse;

A Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola do Estado de Santa Catarina-CIDASC, que aportou parte dos recursos para aquisição de reagentes necessários a realização de técnica de diagnóstico de biologia molecular;

E por fim, à EMBRAPA Suínos e Aves-Concórdia, que cedeu sua estrutura física, equipamentos e corpo técnico para realização da pesquisa.

Epígrafe

“O essencial, com efeito, na educação, não é a doutrina ensinada, é o despertar.”

(Ernest Renan)

Resumo

GADOTTI, Diogo Luiz. **Genotipificação de *Salmonella Gallinarum* isolada de casos de tifo aviário em Santa Catarina e associação à fatores predisponentes para ocorrência.** 2018. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2018.

Salmonella spp. é um importante patógeno bacteriano de aves e é responsável por significativas perdas econômicas da avicultura em muitas partes do mundo. *Salmonella Gallinarum* (SG) é um sorovar específico de aves que causa grandes prejuízos por causar o Tifo Aviário (TA), uma enfermidade de notificação obrigatória que pode se manifestar de forma aguda ou crônica e determinar septicemia em aves. No Estado de Santa Catarina (SC), a partir do ano de 2012, houveram 96 notificações ao Serviço Veterinário Oficial (SVO) de TA em SC. A caracterização destas cepas tem grande importância para avaliações de epidemiologia e associação de fatores de risco. Este estudo objetivou estudar a diversidade genética de SG oriundas de casos de TA em Santa Catarina, buscando identificar similaridade ou dissimilaridade entre as estirpes isoladas dos focos. Para este, estudo foram analisadas 56 cepas SG oriundas do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) -Campinas, que, na Embrapa Suínos e Aves, foram submetidas a análises por PFGE segundo protocolo padronizado pelo *pulsenet* CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças). Elaborou-se um questionário visando identificar fatores predisponentes para entrada e disseminação de SG em granjas. O questionário consistiu em 18 perguntas fechadas binárias (Sim ou Não) e foi encaminhado aos médicos veterinários do SVO responsáveis pelo atendimento das propriedades, onde houve os surtos de SG. Através da técnica de PFGE e posterior elaboração de um dendograma, identificou-se um perfil genotípico prevalente (57,1%) de SG nas amostras analisadas. Este resultado sugere que no estado de SC ocorra um clone endêmico, cuja disseminação seja possivelmente veiculada ao transporte de aves infectadas entre regiões, além de não ter sido possível identificar e associar fatores predisponentes analisados nos questionários à ocorrência de surtos de SG.

Palavras-chave: avicultura; biossegurança; epidemiologia; biologia molecular; genotipagem.

Abstract

GADOTTI, Diogo Luiz. **Genotyping of *Salmonella* Gallinarum isolated from cases of Fowl Typhoid in Santa Catarina and association with factors predisposing to occurrence.** 2018. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2018.

Salmonella spp. is an important bacterial pathogen of poultry and is responsible for significant economic losses of poultry in many parts of the world. *Salmonella* Gallinarum (SG) is a bird-specific serovar that causes great damage by causing Fowl Typhoid (FT), a notifiable disease that can manifest acutely or chronically and determine septicemia in poultry. In the State of Santa Catarina (SC), as of 2012, there were 96 notifications to the Official Veterinary Service (OVS) of FT in SC. The characterization of these strains is of great importance for evaluations of epidemiology and association of risk factors. The objective of this study was to study the genetic diversity of SG from TA cases in Santa Catarina, seeking to identify similarity or dissimilarity between strains isolated from foci. For this study, 56 SG strains from the Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) - Campinas, which at Embrapa Suínos e Aves were submitted to PFGE analysis according to the protocol standardized by the PulseNet CDC (Centers for Disease Control and Prevention). A questionnaire was developed to identify predisposing factors for entry and dissemination of SG in farms. The questionnaire consisted of 18 closed binary questions (yes or no) and was referred to the veterinarians of the SVO responsible for the care of the properties, where there were outbreaks of SG. Through the PFGE technique and subsequent elaboration of a dendrogram, a prevalent genotypic profile (57.1%) of SG was identified in the samples analyzed. This result suggests that in the state of SC, an endemic clone occurs, the dissemination of which is possibly conveyed to the transport of infected birds between regions, and it has not been possible to identify and associate predisposing factors analyzed in the questionnaires to the occurrence of SG outbreaks.

Keywords: poultry farming; epidemiology; risk factors; dissemination; outbreaks

Lista de Figuras

Figura 1	Dendograma agrupando as 56 cepas de <i>Salmonella</i> Gallinarum (SG) obtido pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade de Dice	12
Figura 2	Colônia de SG	24
Figura 3	Colheita de colônia de SG	24
Figura 4	Pluge de gel de agarose	25
Figura 5	Lavagem das células dos plugues	25
Figura 6	Equipamento para realização da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	26
Figura 7	Questionário aplicado aos Médicos Veterinários do Serviço Veterinário Oficial (SVO)	26

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE	11
2	OBJETIVOS	16
2.1	Geral	16
2.2	Específicos	16
3	Capítulo I: Genotipificação de <i>Salmonella</i> Gallinarum isolada de casos de tifo aviário em Santa Catarina e pesquisa de fatores predisponentes para sua ocorrência.....	17
3.1	Introdução	17
3.2	Material e Métodos.....	18
3.4	Resultados	21
3.5	Discussão	23
3.6	Conclusão	26
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
5	REFERÊNCIAS	29
6	ANEXOS.....	34

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

A avicultura brasileira gera quatro milhões de empregos diretos e indiretos, sendo responsável por 15 em cada 100 frangos produzidos no mundo e por movimentar mais de US\$ 7 bilhões em exportações. Em quatro décadas, o Brasil exportou 60 milhões de toneladas, enchendo mais de 2,4 milhões de contêineres para 203 países (MENDES, 2017). O Estado de Santa Catarina é responsável por cerca de 25% da exportação avícola nacional, sendo que em 2016 embarcou 837 mil toneladas de carne de frango (ABPA, 2017). A cadeia avícola neste Estado gera aproximadamente 100 mil empregos diretos e abate 1,3 bilhão de aves por ano, demonstrando dessa forma sua importância para economia catarinense e brasileira (AZEVEDO, 2017).

Entretanto, problemas de ordem sanitária tem onerado o setor avícola. A partir de 2012, a avicultura catarinense vem se defrontando com uma enfermidade re-emergente, o Tifo Aviário (TA). No Estado de Santa Catarina, de 2012 a 2016, foram 96 notificações ao Serviço Veterinário Oficial (SVO) de TA, envolvendo principalmente explorações avícolas comerciais das regiões Meio-Oeste, Oeste e Extremo-Oeste do Estado (CIDASC, 2016)

O agente causador do TA é a bactéria *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG); um bacilo não-esporulado, Gram-negativo, não-flagelado, imóvel e intracelular (BERCHIERI JR. & MACARI, 2000; CHAUDHARI et al., 2012). Este patógeno causa graves prejuízos econômicos e sanitários nas diversas explorações avícolas (ŁANIEWSKI et al., 2014), uma vez que implica no abate de aves acometidas pela doença (OIE, 2015).

O TA caracteriza-se por diminuir a produção de ovos e causar alta mortalidade, até 80% (SHIVAPRASAD, 2000; BARROW & FREITAS NETO, 2011). Os sinais clínicos mais comuns consistem em queda súbita no consumo de ração e água, sonolência, febre, penas eriçadas, diarreia amarelo-esverdeada e morte entre 4 e 10 dias após a infecção

(POMEROY, 1978; SHIVAPRASAD & BARROW, 2013). Ocorre septicemia grave, aguda ou crônica, afetando geralmente aves adultas, embora aves de todas as idades sejam susceptíveis (BARROW & FREITAS NETO, 2011). Observa-se também um quadro inflamatório que inclui hepatite, esplenite e onfalite (CHAUDHARI et al., 2012). Assim como em quadros septicêmicos, ocorre hepatomegalia, onde o órgão adquire uma coloração escura, aspecto friável e um brilho de bronze característico, observado após sua exposição ao ar; outra alteração macroscópica é observada na medula óssea, a qual frequentemente apresenta uma coloração marrom-escura (SHIVAPRASAD, 2000).

Embora os sinais clínicos e os achados *post-mortem* do TA possam ser altamente sugestivos da condição, eles não são suficientemente distintos de outras causas de septicemia para serem considerados patognomônicos (SHIVAPRASAD, 2000). Para a confirmação do diagnóstico de SG, é necessário o isolamento do agente no exame bacteriológico. Técnicas laboratoriais, como a soroaglutinação rápida em placa e a aglutinação lenta em tubos, podem ser utilizadas como provas complementares ao diagnóstico (MAPA,2007).

Dentre as possíveis causas para o ressurgimento do TA em plantéis de aves, está a reversão da virulência da vacina viva SG9R (VAN IMMERSEEL et al., 2013). Entretanto, alguns estudos conduzidos no Brasil não tem confirmado tal hipótese. De Carli et al. (2017), através de sequenciamento de uma região variável do genoma de SG e posterior análise filogenética, concluíram que as cepas deste patógenos associadas aos surtos de TA têm circulado há mais de 50 anos no Brasil e não são provenientes da reversão da virulência da vacina SG9R. Outros estudos, envolvendo cepas brasileiras, também não têm associado cepas vacinais como uma das prováveis origens dos surtos no país (KOERICH et al., 2018; DE SOUZA et al., 2015).

Falhas nos programas de biossegurança avícola têm sido apontadas como um dos prováveis fatores na reintrodução de SG (DE SOUZA et al., 2015; CELIS-ESTUPIÑAN et al., 2017). Entre os erros de biosseguridade mais prevalentes, podemos citar falhas no isolamento da granja, no controle de tráfego de veículos, pessoas e equipamentos,

no controle de pragas, na limpeza e desinfecção, na implementação e execução de programas de monitoramento sanitário, entre outros. 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 (SHIVAPRASAD, 2000).

Além disso, criações de aves em pequenas propriedades, próximas a áreas de criações comerciais, também podem servir como fonte de infecção (SHIVAPRASAD, 2000). Criatórios de subsistência possuem um papel relevante na propagação deste patógeno, uma vez que as galinhas criadas em fundo de quintal, quando contaminadas, agem como reservatórios e fontes disseminadoras de SG (BACK, 2010). Embora o alcance e o impacto das medidas de biossegurança possam ser óbvios para a produção avícola em larga escala, sua importância para as pequenas explorações de criação de aves não deve ser negligenciada, porque, além de ser prejudicial a elas mesmas, podem servir de fonte de infecção para a produção avícola comercial (VAN STEENWINKEL et al., 2011).

A probabilidade de introdução e disseminação da doença aumenta na medida em que as medidas de biossegurança deixam de ser implementadas ou são implementadas de maneira deficiente, sendo determinada por uma combinação complexa de fatores, como o número e a densidade dos animais, o tipo de espécie ou raças presentes, o número e tipo de contatos entre os rebanhos e as medidas sanitárias adotadas, além do nível de biossegurança das granjas (VAN STEENWINKEL et al., 2011). Especificamente, no caso de SG, estes fatores são fundamentais na epidemiologia da doença, pois a infecção ocorre predominantemente pela via horizontal (BERCHIERI JR. et al., 2001). Entretanto, a via de transmissão vertical também já foi relatada (KANG et al., 2011). Portanto, o papel da transmissão vertical de cepas de SG no incubatório não pode ser desconsiderado, uma vez que esta forma poderia aumentar a presença do patógeno em plantéis de matrizes, contribuindo

desta maneira para a sua disseminação em poedeiras e frangos (GAST, 2008; KWON et al., 2014). Além das medidas de biossegurança, estudos para monitorar e rastrear o patógeno podem ser úteis em programas de prevenção e controle de *Salmonella*, mas exigem o conhecimento científico do fenótipo e genótipo dos sorotipos detectados em granjas (VOSS-RECH et al., 2015). A caracterização de isolados bacterianos, por vários métodos de genotipagem, pode fornecer informações úteis para avaliar conexões genéticas entre isolados para a investigação epidemiológica a curto e longo prazo (LEE et al., 2007; SPRATT, 2004), além de possibilitar o estudo filogenético dos isolados (CHIOU et al., 2009). A subtipificação molecular de isolados bacterianos é crucial no monitoramento da circulação de linhagens bacterianas de diferentes regiões geográficas, sendo que, para serem utilizados, os métodos de subtipificação devem atender a algumas exigências, tais como alto poder discriminatório, desempenho, interpretação clara e possibilidade de padronização internacional (LIENEMANN et al., 2015). Um método de subtipagem ideal é rápido, robusto, portátil, produz dados objetivos e diferencia todas as cepas não relacionadas epidemiologicamente e agrupa todos os isolados associados à mesma fonte. No entanto, nenhum método de subtipagem atual se aproxima desse ideal (HYTYIÄ-TREES et al., 2007).

Os métodos de subtipificação com alto poder discriminatório e que podem realizar a distinção entre isolados intimamente relacionados derivados de um ancestral comum são adequados para epidemiologia de curto prazo (TIEN et al., 2011). Neste sentido, a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) tem grande valor na análise epidemiológica, na diferenciação de estirpes patogênicas e no monitoramento de sua disseminação entre unidades epidemiológicas, sendo considerada como o padrão-ouro na genotipagem de *Salmonella* e o único método molecular adequado para todos os sorotipos de *Salmonella* (LIENEMANN et al., 2015). É uma ferramenta válida e aprofundada para determinar as relações genéticas entre isolados de *Salmonella* (CAI et al., 2016) e um método altamente discriminativo para a maioria dos patógenos bacterianos e tem sido amplamente utilizado como ferramenta de subtipagem para a

investigação de surtos de doenças (HYYTIÄ-TREES et al., 2007). Além disso, diversos estudos têm utilizado PFGE para a subtipificação de isolados de SG em surtos, a qual tem se mostrado adequada em análises epidemiológicas envolvendo este patógeno (BERGAMINI et al., 2011; CELIS-ESTUPIÑAN et al., 2017; KWON et al., 2010; MAMMAN et al., 2017; PARVEJ et al., 2016; SEO et al., 2006).

Neste trabalho, 56 amostras de SG, isoladas de surtos de TA ocorridos no Estado de Santa Catarina entre os anos de 2010 e 2016, foram analisadas. As amostras foram obtidas junto ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO)-Campinas, cultivadas e submetidas à técnica de PFGE, na qual a partir das semelhanças dos padrões de clivagem entre cepas gerou-se um dendograma. Deste, foram identificados 16 pulsotipos, os quais refletem a diversidade genética das cepas circulantes no estado. No maior agrupamento, 57% cepas de SG foram reunidas independentemente de sua região geográfica, tipo de exploração ou ano de isolamento, o que sugere a existência de um clone endêmico. Paralelamente, realizou-se a análise de questionários, respondidos pelos médicos veterinários do SVO que atenderam a estes focos.

Nesta, não foi possível estabelecer relação entre os fatores considerados predisponentes e a presença de SG. Este resultado pode ser reflexo da conduta dos produtores, que afirmaram adotar efetivamente os procedimentos relacionados à biossegurança, contudo, não houve averiguação destas informações para assegurar a fidedignidade dos dados coletados. Acredita-se que, como o questionário foi aplicado pelo SVO, provavelmente as respostas podem não ter a fidelidade necessária para tais avaliações. Portanto, as medidas de biossegurança não devem ser negligenciadas, uma vez que outros trabalhos têm enfatizado sua importância.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar os perfis genéticos de isolados de *Salmonella* Gallinarum (SG) dos casos de Tifo Aviário (TF) ocorridos em Santa Catarina (SC) entre 2012 e 2016.

2.2 Específicos

- Genotipar estirpes de SG identificados nos casos de tifo aviário ocorridos em Santa Catarina no período de Janeiro de 2012 a Dezembro de 2016 identificando os genótipos e verificando a similaridade entre eles através de PFGE;

- Contribuir, a partir dos resultados obtidos no trabalho, com informações acerca desta bactéria obtendo dados para incrementar as medidas preventivas e identificação de possíveis fatores predisponentes que possam estar associados.

3 CAPÍTULO I: Genotipificação de *Salmonella* Gallinarum isolada de casos de tifo aviário em Santa Catarina e pesquisa de fatores predisponentes para sua ocorrência

Pesquisa Agropecuária Brasileira (<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab>)

Autores

Diogo Luiz Gadotti, Priscila Belleza Maciel, Raquel Rebelatto, Sabrina Castilho Duarte, Diogenes Dezen.

3.1 Introdução

Salmonella Gallinarum (SG) é o agente causador do Tifo Aviário (TA), doença sistêmica grave que tem grande importância na avicultura, pois provoca graves prejuízos nas diversas explorações avícolas. É uma bactéria altamente patogênica para aves em qualquer idade, no entanto, a sua ocorrência é mais comum em aves adultas. É um bacilo não esporulado, Gram-negativo, não flagelado e imóvel (BERCHIERI JR. E MACARI, 2000).

Este patógeno tem reemergido na última década, provocando grande preocupação do setor avícola brasileiro, uma vez que implica no abate de aves acometidas pela doença (OIE, 2015). No Estado de Santa Catarina, de 2012 a 2016, foram 96 notificações ao Serviço Veterinário Oficial (SVO) de TA, envolvendo principalmente explorações avícolas comerciais das regiões Meio-Oeste, Oeste e Extremo-Oeste do estado (CIDASC, 2016).

A possível causa do ressurgimento desta enfermidade é a falha na execução de procedimentos de biossegurança, tais como falta de isolamento da granja, ausência da restrição de tráfego de veículos e pessoas, desinfecção correta de equipamentos, controle eficiente de pragas, limpeza e desinfecção efetivas, programas de monitoramento sanitário visando a identificação de doenças e meios para prevenção,

entre outros. Especificamente no caso de SG, estes fatores são fundamentais na epidemiologia da doença, pois a infecção ocorre predominantemente pela via horizontal (BERCHIERI JR et al., 2001).

Estudos para monitorar e rastrear o patógeno podem ser úteis em programas de prevenção e controle de *Salmonella* spp., mas exigem o conhecimento científico do fenótipo e genótipo dos sorotipos detectados em granjas (VOSS-RECH et al., 2015). Para Spratt (2004), a caracterização de isolados bacterianos, por vários métodos de genotipagem, pode fornecer informações úteis para avaliar conexões genéticas entre isolados e investigações epidemiológicas a curto e longo prazo. A subtipificação molecular de isolados bacterianos é crucial no monitoramento da circulação de linhagens bacterianas de diferentes regiões geográficas. Para serem utilizados, os métodos de subtipificação devem atender a algumas exigências, tais como: alto poder discriminatório, desempenho, interpretação clara e possibilidade de padronização internacional (LIENEMANN et al., 2015). Neste sentido, a PFGE tem grande valor na análise epidemiológica, na diferenciação de estirpes patogênicas e no monitoramento de sua disseminação entre unidades epidemiológicas, sendo considerado como o padrão-ouro na genotipagem de *Salmonella* e o único método molecular adequado para todos os sorotipos de *Salmonella* (LIENEMANN et al., 2015). Portanto, este estudo utilizou a PFGE para avaliar os perfis genéticos de 56 cepas de SG, isoladas de casos de TA ocorridos no Estado de Santa Catarina entre 2012 e 2016. Paralelamente, realizou-se uma investigação dos prováveis fatores predisponentes para a ocorrência de SG nas granjas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Cepas

Um total de 56 cepas de SG, oriundas de focos de TA ocorridos no Estado de Santa Catarina entre os anos de 2012 e 2016, foram obtidas junto ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO)-Campinas. Os focos foram detectados por

notificação obrigatória e as amostras coletadas pelo Serviço Veterinário Oficial (SVO). As cepas foram criopreservadas a -70°C , em BHI contendo 10% de glicerol.

3.2.2 Preparação do DNA para PFGE

Para extração do DNA genômico, primeiramente, as cepas de SG foram semeadas em meio de cultivo tripticase soy agar (TSA) e incubadas a 37°C por 12 a 18 horas (Figura 2). Após, colônias foram coletadas em tampão de suspensão (1M Tris-HCl, 0,5M EDTA) e padronizadas para o tubo 5 da escala de MacFarland (Figura 3). Foram produzidos plugues de agarose (Figura 4) com uma mistura de 400 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 2,7% (agarose Low Melting / BioRad), 400 μL de suspensão das células e 20 μL (20mg/mL) de proteinase K (Promega). Os plugues foram incubados em 5mL de tampão de lise (Figura 5) (1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, lauril sarcosine a 10% e 25 μL de proteinase K [20 mg/mL]) a 54°C , sob agitação, por 2 horas. As células foram lavadas duas vezes com água ultrapura e 4 vezes com tampão de eluição (1M Tris-HCl, 0,5M EDTA) a 50°C por 10 minutos e armazenados em solução TE (1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, ph 8,0) a 4°C . A restrição por endonuclease foi feita com 50U / plug da enzima *Xba*I (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante.

3.3.3 PFGE

O PFGE foi realizado de acordo com o protocolo utilizado pelo sistema "Pulse Net" do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (RIBOT et al., 2006). Os fragmentos foram colocados em gel de agarose a 1,2% (BioRad) e submetidos a eletroforese em campo pulsado utilizando o sistema CHEF-DR III (BioRad) (Figura 6).. Os parâmetros utilizados foram: 22 horas de tempo de corrida; 14°C de temperatura; Low MW 30kb; High MW de 700kb, 6V/cm de gradiente de voltagem; 120° de ângulo incluso com 2,16 segundos de tempo de pulso e 63,8 segundos de tempo de pulso final. A eletroforese foi realizada em solução de TEB 0,5 vezes (Tris Base, Ácido bórico

e EDTA 0,5M). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 30 minutos e o excesso de brometo foi removido com três lavagens de 20 minutos cada em água destilada. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta. O DNA digerido de *Salmonella enterica* sorotipo Braenderup H9812 pela enzima *Xba*I (Invitrogen) foi utilizado para determinação do peso molecular.

3.3.4 Análise de Dados

A análise de similaridade oriunda da comparação entre os perfis obtidos pelo PFGE foi baseada na comparação visual de padrões de bandas de isolados corridos no mesmo gel pelo uso do software BioNumerics (versão 3.0; Applied Maths). Semelhanças entre os padrões de *fingerprints* dos isolados foram determinados com base no coeficiente de correlação de Dice. O valor de tolerância da posição da banda foi de 1.7% (CARRIÇO et al., 2005). O dendrograma foi gerado pelo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (Figura 1) e os isolados foram considerados como tendo o mesmo pulsotipo quando o número e a localização das bandas eram indistinguíveis. Os isolados com uma diferença de banda foram considerados de pulsotipos distintos.

3.3.5 Identificação das medidas de biossegurança adotadas

Elaborou-se um questionário visando identificar fatores predisponentes para entrada e disseminação de patógenos em granjas. O questionário consistiu em 18 perguntas fechadas binárias (Sim ou Não) e foi encaminhado aos médicos veterinários do SVO responsáveis pelo atendimento das propriedades, onde houve os surtos de SG. Os seguintes itens foram avaliados: presença de idade múltipla; isolamento da granja; controle de roedores; presença de arco de desinfecção; composteira; cerca de isolamento; troca de roupa; troca de calçado e utilização de propé anterior a entrada às instalações de produção. Ainda, o contato de funcionários com outras aves de vida livre, criação simultânea de outros animais, prática de vazio sanitário e cuidados com

água e ração. Os resultados obtidos foram tabulados e analisados através de estatística descritiva.

3.4 Resultados

Foram obtidos 16 pulsotipos com número de bandas variando entre 9 e 11 e com similaridade entre eles de 95,7 a 63,1% (Figura 1). Dos 16 pulsotipos obtidos, o que engloba o maior número de isolados, G1, é constituído por 57,1% das amostras analisadas (32/56). Um segundo pulsotipo (G2) é constituído por 10,7% dos isolados (6/56) e um terceiro (G3) por 5,4% (3/56). Ainda, obtivemos dois pulsotipos com 3,5% dos isolados cada (2/56) e outros 11 pulsotipos composto de amostra única (1,8 %).

Além da obtenção dos 16 obtidos, foi observado que tais pulsotipos encontram-se distribuídos entre as seguintes explorações avícolas: granjas de matrizes, granjas de corte, de postura comercial e em propriedades de subsistência, além de estarem presente nas espécies de interesse econômico galinha e peru.

Dos questionários enviados, obteve-se retorno de 31 (56%). Nestes, os dados compilados revelaram que a grande maioria das granjas (87,1%) não está próxima a rodovia; nem há presença de outras aves na propriedade, criação simultânea de outras espécies animais ou presença de outras espécies domésticas no interior da granja. O mesmo percentual informou que realiza o controle de pragas com o devido registro, possui composteira, pratica o vazio sanitário e os silos de ração são mantidos limpos e fechados. Cerca de 80% das 31 propriedades possui funcionários, arco de desinfecção, registro de acesso de veículos, registro de acesso de visitantes, cerca de isolamento no perímetro da granja, barreira sanitária na entrada da granja com banho, troca de roupa e troca de calçado ou utilização de propé. A mesma taxa foi obtida quando questionado se os funcionários são orientados para que não tenham outras aves em seu domicílio e se é realizada a desinfecção de veículos. Ainda, das propriedades analisadas, somente 32% de um total de 31 propriedades possui núcleo único e 29% apresentavam animais em idades múltiplas.

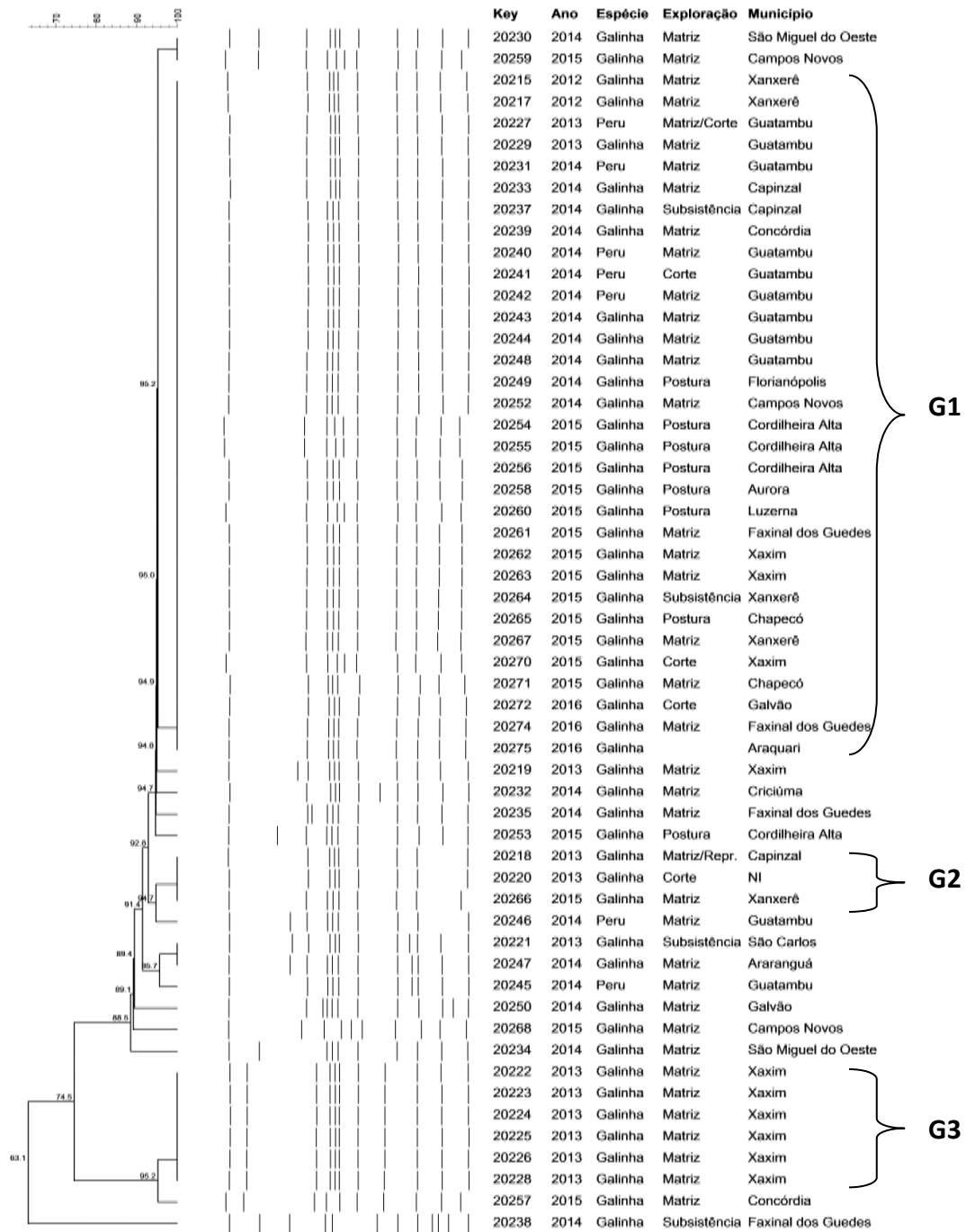


Figura 1. Dendrograma da PFGE das 56 cepas de *Salmonella* Gallinarum (SG) obtido pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade de Dice.

3.5 Discussão

O TA é uma doença que afeta as aves e causa consideráveis perdas econômicas na indústria avícola mundial (BARROW & FREITAS NETO, 2011) apesar de ser considerada uma doença sob controle em vários países desenvolvidos (OIE, 2012). Entretanto, o TA continua sendo um sério problema em países em desenvolvimento, especialmente os localizados na África, Ásia Oriental e América Central e do Sul. (OIE, 2015).

Durante os surtos desta enfermidade, a caracterização dos isolados de SG tem contribuído para o serviço de vigilância, podendo indicar a origem do patógeno, auxiliando na adoção de medidas mais eficientes no controle da disseminação da doença. Neste sentido, a PFGE é uma ferramenta de subtipificação utilizada em várias redes de saúde pública (ex.: PulseNet, FoodNet, and VetNet), a qual permite a diferenciação, através de genotipificação, de cepas isoladas em surtos (SWAMINATHAN et al. 2001).

Neste trabalho, obteve-se 16 pulsotipos utilizando a técnica de PFGE. Embora outras técnicas propostas para diferenciação de genótipos, tais como *multi-locus sequence typing* (MLST), *multi-locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) e *enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR* (ERIC-PCR), tenham apresentado um maior poder discriminatório do que a PFGE, resultando na geração de um maior número de agrupamentos (KTARI et al., 2016; WANG et al., 2016; SECUNDO DE SOUZA et al. 2015); optou-se pela uso da técnica de PFGE, uma vez que esta técnica é considerada o padrão-ouro para subtipificação molecular de *Salmonella*. Além disso, o método permite a padronização entre laboratórios, o que possibilita comparações entre diferentes estudos (LIEBANA et al., 2002).

O dendograma, gerado a partir dos perfis genotípicos, apresentou um grande *cluster*, aqui designado como G1. Neste, 32 cepas de SG foram agrupadas independentemente de sua região geográfica, tipo de exploração ou ano de

isolamento. Tais dados sugerem a existência de um clone endêmico circulando no estado. Uma hipótese similar foi previamente proposta por Kwon et al (2010), que aplicou a técnica de PFGE a cepas de SG isoladas na Coreia, e não puderam observar nenhuma relação entre ano e região geográfica de isolamento para a maioria das cepas de SG estudadas. Resultados similares foram obtidos em um estudo brasileiro, onde autores utilizando a técnica de ERIC-PCR observaram que os isolados de SG recuperados de diferentes regiões e anos se agruparam com 100% de similaridade, sugerindo que ocorreu a transferência de genótipos entre essas regiões (SECUNDO DE SOUZA et al. 2015).

É provável que o transporte de aves assintomáticas portadoras desse patógeno, entre essas regiões, tenha sido o responsável por introduzir SG em plantéis saudáveis, levando a disseminação do genótipo detectado no *cluster* G1. Tal pressuposto é apoiado pelo fato que SG apresenta baixa viabilidade fora do hospedeiro, uma vez que, nestas condições, o número de rotas metabólicas e biossintéticas é limitado (McMEECHAN et al., 2005; THOMSON et al., 2008; FENG et al., 2013). Portanto, a propagação de SG a longas distâncias provavelmente não ocorra naturalmente. Além disso, acredita-se que a transmissão horizontal seja a principal rota de propagação da SG (BERCHIERI JR et al., 2001), o que implica na necessidade de uma fonte de infecção, a qual pode ser proveniente destas aves comercializadas.

O fato do *cluster* G1 agregar cepas isoladas em um intervalo de tempo relativamente longo (2012 a 2016), sugere que houve condições favoráveis para a propagação e perpetuação do genótipo durante o período analisado. Dentre os fatores que podem ter contribuído para a persistência deste patógeno, destacam-se as falhas em programas de biossegurança e a adoção de medidas inadequadas de higiene, uma vez que a adoção de biossegurança tem sido a estratégia de sucesso para o controle da enfermidade. Como a epidemiologia da *Salmonella* na avicultura é bastante complexa e a bactéria pode ser introduzida em unidades de exploração avícola por meio de diferentes fontes, como alimento, água, insetos, roedores e até as botas usadas pelos

trabalhadores, é essencial que programas de biosseguridade mitiguem o risco de ingresso de patógenos (VAN STEENWINKEL et al., 2011).

O *cluster* G3 agrupou cepas oriundas de um único município (Xaxim), o que sugere que aquele genótipo tem circulado especificamente naquela região geográfica. Nos demais *clusters*, não se observou relação direta entre ano, atividade de exploração ou local analisado.

Em relação às condições de biosseguridade e a identificação de determinado perfil, não foi possível, com a metodologia adotada no presente trabalho, associar as condições da granja e o perfil obtido, já que as amostras não eram rastreáveis a este detalhamento. Também não foi possível estabelecer relação entre os fatores considerados predisponentes e a presença de SG.

Em resposta aos questionários aplicados, a maioria dos produtores afirmaram adotar efetivamente os procedimentos relacionados a biosseguridade. Acredita-se que, como o questionário foi aplicado pelo SVO, provavelmente, as respostas podem não ter a fidelidade necessária para as avaliações. Além disso, os aspectos relacionados a biosseguridade foram baseados em perguntas fechadas binárias (Sim ou Não) e não foram considerados aspectos qualitativos. Ou seja, não foram inseridos parâmetros de análise que pudesse dimensionar a efetividade dos requisitos de biosseguridade avaliados. Os fatores foram analisados isoladamente; é possível que quando analisados em conjunto, com avaliação também da efetividade da ação, seja percebida diferença estatística significativa. Ressalta-se que, apesar de não ter sido possível a identificação de fatores predisponentes nos surtos de SG, as medidas de biosseguridade não devem ser negligenciadas pelo produtor, pois estas são fundamentais à prevenção de diversas enfermidades. As medidas precisam ser adotadas em conjunto com a imunoprofilaxia e adoção das demais boas práticas de produção, pois são as principais formas de controle do TA.

3.6 Conclusão

Neste trabalho, através da técnica de PFGE e posterior elaboração de um dendograma, identificou-se um perfil genotípico prevalente (57,1%) de SG nas amostras analisadas. Este resultado sugere que, no Estado de SC, ocorra um clone endêmico, cuja disseminação seja possivelmente vinculada ao transporte de aves infectadas entre regiões. Ademais, outros 15 perfis genotípicos foram obtidos, evidenciando a variabilidade genética entre as cepas circulantes e permitindo inferir que estas teriam diferentes origens. Contudo, não foi possível associar os fatores predisponentes analisados e a ocorrência dos surtos de SG.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, das 56 amostras de SG analisadas através de PFGE, foram obtidos 16 perfis genotípicos, o que demonstra a variabilidade genética das cepas de SG circulantes no estado. Embora, um dos perfis tenha sido mais prevalente entre as linhagens (57,1%), sugerindo a presença de um clone endêmico.

Ressalta-se que os resultados aqui obtidos podem diferir de outras técnicas como a MLST, MLVA e ERIC-PCR, as quais possuem maior poder discriminatório que a PFGE (KTARI et al., 2016; WANG et al., 2016; SECUNDO DE SOUZA et al. 2015). Portanto, tais técnicas poderiam ser utilizadas como complementares, uma vez que a PFGE, em alguns casos, possui a limitação de ser insuficiente para discriminar epidemiologicamente isolados não relacionados de patógenos geneticamente monomórficos (TIEN et al., 2011). Entretanto, uma forma de evidenciar diferenças genéticas de maneira precisa é o sequenciamento genético completo (WGS). O WGS é um método molecular utilizado para caracterizar organismos, o qual possui um maior poder discriminatório, mesmo entre cepas estritamente relacionadas, em comparação com os demais métodos utilizados (MOOK et al., 2018). Neste sentido, o presente trabalho terá continuidade através do Whole Genome Sequencing (WGS); até o presente momento 6 cepas de SG foram submetidas à técnica e os resultados obtidos se encontram sob análise.

Dos fatores predisponentes analisados em nenhum houve associação direta com os surtos de TA. Os pontos levantados nos questionários focaram essencialmente a forma de transmissão horizontal, haja vista que esta é a principal via de transmissão da doença (BERCHIERI JR et al., 2001). Entretanto, a via de transmissão vertical também já foi relatada (KANG et al., 2011), porém devido às restrições de acesso aos dados junto às empresas integradoras, estes não foram pesquisados. Além disso, os fatores foram analisados isoladamente, é possível que quando analisados em conjunto, com avaliação também da efetividade da ação, seja percebida diferença estatística

significativa. Ressalta-se que apesar de não ter sido possível a identificação de fatores predisponentes nos surtos de SG, as medidas de biosseguridade não devem ser negligenciadas pelo produtor. Portanto, medidas simples como manter as granjas cercadas e teladas com malhas que impeçam a entrada de outras espécies domésticas, mas principalmente aves no interior das unidades produtivas, controle de tráfego de veículos e pessoas, inclusive com a desinfecção de veículos e materiais, troca de roupas e calçados, efetivo controle de pragas, utilização de compostagem para destinação de sobras de ração e aves mortas entre outras medidas podem e devem ser utilizadas, como forma de mitigar o aparecimento e disseminação de novos focos de TA. Durante a realização deste estudo, está sendo conduzido o sequenciamento genético de 6 cepas de SG, onde o objetivo é observar se existe alguma diferença entre as cepas e se elas determinam maior ou menor patogenicidade e/ou mortalidade em focos de Tifo Aviário. Os resultados obtidos até o momento permitem que o mesmo possa ser utilizado como base em outras pesquisas técnicas para diferenciação dos genótipos, complementando a PFGE e oferecendo maior precisão da análise epidemiológica

5 REFERÊNCIAS

ABPA. Relatório Anual da ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal, p. 134p, 2017. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>>.

AZEVEDO, G. Avicultura catarinense quer voar mais alto. Gazeta do povo, Itajaí-SC, 23 jul. 2017. Agronegócio, Caderno. Disponível em: <<https://www.gazetadopovo.com.br/agronegocio/expedicoes/expedicao-avicultura/2017/avicultura-catarinense-quer-voar-mais-alto-102d4kxhe06o94r7flzl0pts>>. Acesso em 03 de julho de 2018.

BACK, A. **Manual de Doença das Aves**. Integração, p 188. Cascavel. 2010.

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

BERGAMINI, F.; IORI, A.; MASSI, P.; PONGOLINI, S. Multilocus variable-number of tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum and comparison with pulsed-field gel electrophoresis genotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3–4, p. 430–436, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.002>>.

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

CAI, Y. et al. Phenotypic characteristics and genotypic correlation between *Salmonella* isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 222, p. 56–64, 2016.

CARRIÇO, J. A. et al. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5483–5490, 2005.

CELIS-ESTUPIÑAN, A.L.P; BATISTA, D.F.A; CARDOZO, M.V.; DE SOUZA, A.I.S; ALVES, L.B.R.; ALMEIDA, A.M.; BARROW, P.A.; BERCHIERI Jr., A.; FREITAS NETO, O.C. Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil. **Avian Pathology**, 46:4, 416-425, 2017.

CHAUDHARI, A. A. et al. Construction of a *Salmonella Gallinarum* ghost as a novel inactivated vaccine candidate and its protective efficacy against fowl typhoid in chickens. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 1, 2012.

CHIOU, C. S. et al. Utility of multilocus variable-number tandem-repeat analysis as a molecular tool for phylogenetic analysis of *Shigella sonnei*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1149–1154, 2009.

Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola do Estado de Santa Catarina (CIDASC), 2016.

DE CARLI, S. et al. Corrigendum to “Molecular and phylogenetic analyses of

Salmonella Gallinarum trace the origin and diversification of recent outbreaks of fowl typhoid in poultry farms” [Vet. Microbiol. 212 (2017) 80–86] (S037811351730384X) (10.1016/j.vetmic.2017.11.001)). **Veterinary Microbiology**, v. 213, n. November, p. 150, 2018.

DE SOUZA, A.I.S.; FREITAS NETO, O.C.; BATISTA, D.F.A.; CELIS ESTUPINAN, A.L.P.; ALMEIDA, A.M.; BARROW, P.A.; BERCHIERI, A. ERIC-PCR genotyping of field isolates of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. **Avian Pathology**, 44:6, 475-479, 2015.

FENG, Y.; JOHNSTON, R. N.; LIU, G. R.; LIU, S. L. Genomic Comparison between Salmonella Gallinarum and Pullorum: Differential Pseudogene Formation under Common Host Restriction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–6, 2013.

GAST, R.K. Bacterial diseases: Salmonella infection. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. (Eds.), **Diseases of Poultry**. Blackwell Publishing: Oxford, p. 619–636, 2008.

HYTTIÄ-TREES, E. et al. Recent developments and future prospects in subtyping of foodborne bacterial pathogens. **Future Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 175–185, 2007.

KANG, M. S. et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for subtyping Salmonella enterica serovar Gallinarum. **Avian Pathology**, v. 40, n. 6, p. 559–564, 2011.

KTARI, S.; KSIBI, B.; GHARSALLAH, H.; MNIF, B.; MAALEJ, S.; RHIMI, F.; HAMMAMI, A. Molecular epidemiological characteristics of Salmonella enterica serovars Enteritidis, Typhimurium and Livingstone strains isolated in a Tunisian university hospital. **Apmis**, v. 124, n. 3, p. 194–200, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/apm.12484>>.

KOERICH, P. K. V.; FONSECA, B. B.; BALESTRIN, E.; TAGLIARI, V.; HOEPERS, P. G.; UEIRA-VIEIRA, C.; OLDONI, I.; RAUBER, R. H.; RUSCHEL, L.; NASCIMENTO, V. P. Salmonella Gallinarum field isolates and its relationship to vaccine strain SG9R. **British Poultry Science**, v. 59, n. 2, p. 154–159, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1406062>>.

KWON, J. Prevalence and characterization of Salmonella Gallinarum in the chicken in Korea during 2000 to 2008. **Poultry Science**. 89, 236–242, 2014.

KWON, Y. K. et al. Prevalence and characterization of Salmonella gallinarum in the chicken in Korea during 2000 to 2008. **Poultry Science**, v. 89, n. 2, p. 236–242, 2010.

ŁANIEWSKI, P. et al. Evaluation of protective efficacy of live attenuated salmonella enterica serovar gallinarum vaccine strains against fowl typhoid in chickens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 9, p. 1267–1276, 2014.

LEE, Y. J. et al. Characterization of Salmonella spp. isolated from an integrated broiler chicken operation in Korea. **The Journal of veterinary medical science**, v. 69, n. 4, p. 399–404, 2007.

LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; CLOUTING, C.; CLIFTON-HADLEY, F. A.;

LINDSAY, E.; THRELFALL, E. J.; MCDOWELL, S. W. J.; DAVIES, R. H. Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4450–4456, 2002.

LIENEMANN, T. et al. Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.

MAMMAN, P. H.; KAZEEM, H. M.; RAJI, M. A.; JONATHAN, A.; KWADA, J.; KWAGA, P. Isolation and Characterization of *Salmonella Gallinarum* from Outbreaks of Fowl Typhoid in Kaduna State , Nigeria. **International Journal of Public Health and Epidemiology**, v. 3, n. 10, p. 82–88, 2014.

MCMECHAN, A.; LOVELL, M. A.; COGAN, T. A.; MARSTON, K. L.; HUMPHREY, T. J.; BARROW, P. A. Glycogen production by different *Salmonella enterica* serotypes: Contribution of functional glgC to virulence, intestinal colonization and environmental survival. **Microbiology**, v. 151, n. 12, p. 3969–3977, 2005.

MENDES, A. Um gigante amparado em biosseguridade. Disponível em <<http://opresenterural.com.br/noticia/um-gigante-amparado-em-biosseguridade/11178>>. Acesso em 02 novembro de 2017.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 78, de 03 de Novembro de 2003. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3864>. Acessado em 28 junho de 2018.

MOOK, P., GARDINER, D., VERLANDER, N., MCCORMICK, J., USDIN, M., CROOK, P., JENKINS, C. DALLMAN, T.. Operational burden of implementing *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium cluster detection using whole genome sequencing surveillance data in England: A retrospective assessment. **Epidemiology and Infection**, 1-9, 2018.

OIE – World Organization for Animal Health. (2012). Fowl Typhoid and Pullorum Disease. In **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals** (Chap. 2.3.11., pp. 538–548). Paris: World Organization for Animal Health.

OIE – World Organization for Animal Health. (2015). Disease information [Online]. Retrieved from http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail.

PARVEJ, M. S.; NAZMUL HUSSAIN NAZIR, K. H. M.; BAHANUR RAHMAN, M.; JAHAN, M.; RAHMAN KHAN, M. F.; RAHMAN, M. Prevalence and characterization of multi-drug resistant *Salmonella Enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Pullorum*

and Gallinarum from chicken. **Veterinary World**, v.9, n. 1, p. 65–70, 2016.

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

SC abate 1 bilhão de frangos por ano e é o 2º maior exportador do país. Disponível em: <http://g1.globo.com/sc/santa-catarina/campo-e-negocios/noticia/2015/10/sc-abate-1-bilhao-de-frangos-por-ano-e-e-o-2-maior-exportador-do-pais.html>. Acesso em 2 de novembro de 2017.

SECUNDO DE SOUZA, A. I.; FREITAS NETO, O. C. de; BATISTA, D. F. A.; ESTUPINAN, A. L. del P. C.; ALMEIDA, A. M. de; BARROW, P. A.; BERCHIERI, A. ERIC-PCR genotyping of field isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. **Avian Pathology**, v. 44, n. 6, p. 475–479, 2015.

SEO, Y. S. et al. Pulsed-field gel electrophoresis genotyping of *Salmonella gallinarum* and comparison with random amplified polymorphic DNA. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 4, p. 349–357, 2006.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 405–424, 2000.

SHIVAPRASAD, H.L.; BARROW, P.A. Pullorum Disease and Fowl Typhoid. In: SWAYN, D.E.E (eds.). **Disease of Poultry**. 13th ed. Wiley-Blackwell: Iowa State press, p. 678-693, 2013.

SPRATT, B. G. Exploring the Concept of Clonality in Bacteria. **Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology**, v. 266, p. 323–352, 2004.

SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J.; HUNTER, S. B.; TAUXE, R. V. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 3, p. 382–389, 2001.

TIEN, Y. Y. et al. Comparison of multilocus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in molecular subtyping of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 69, n. 1, p. 1–6, 2011.

THOMSON, N. R.; CLAYTON, D. J.; WINDHORST, D.; VERNIKOS, G.; DAVIDSON, S.; CHURCHER, C.; QUAIL, M. A.; STEVENS, M.; JONES, M. A.; WATSON, M.; BARRON, A.; LAYTON, A.; PICKARD, D.; KINGSLEY, R. A.; BIGNELL, A.; CLARK, L.; HARRIS, B.; ORMOND, D.; ABDELLAH, Z.; BROOKS, K.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; WOODWARD, J.; NORBERCZAK, H.; LORD, A.; ARROWSMITH, C.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; SANDERS, M.; WHITEHEAD, S.; CHABALGOITY, J. A.; MASKELL, D.; HUMPHREY, T.; ROBERTS, M.; BARROW, P. A.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J. Comparative genome analysis of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287 / 91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome Research**, v. 18, p. 1624–1637, 2008.

VAN IMMERSEEL, F.; STUDHOLME, D.J.; EECKHAUT, V.; HEYNDRIKX, M.;

DEWULF, J.; DEWAELE, I.; VAN HOOREBEKE, S.; HAESBROUCK, 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**, 31, 4940-4945, 2013.

VAN STEENWINKEL, S. et al. Assessing biosecurity practices, movements and densities of poultry sites across Belgium, resulting in different farm risk-groups for infectious disease introduction and spread. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, n. 4, p. 259–270, 2011.

VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of Salmonella enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433–441, 2015.

WANG, H.; DIAO, B.; CUI, Z.; YAN, M.; KAN, B. Genotyping of Salmonella Typhi using 8-loci multi locus VNTR analysis. **Gut pathogens**, v. 8, p. 14, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27047570>>.

6 ANEXOS

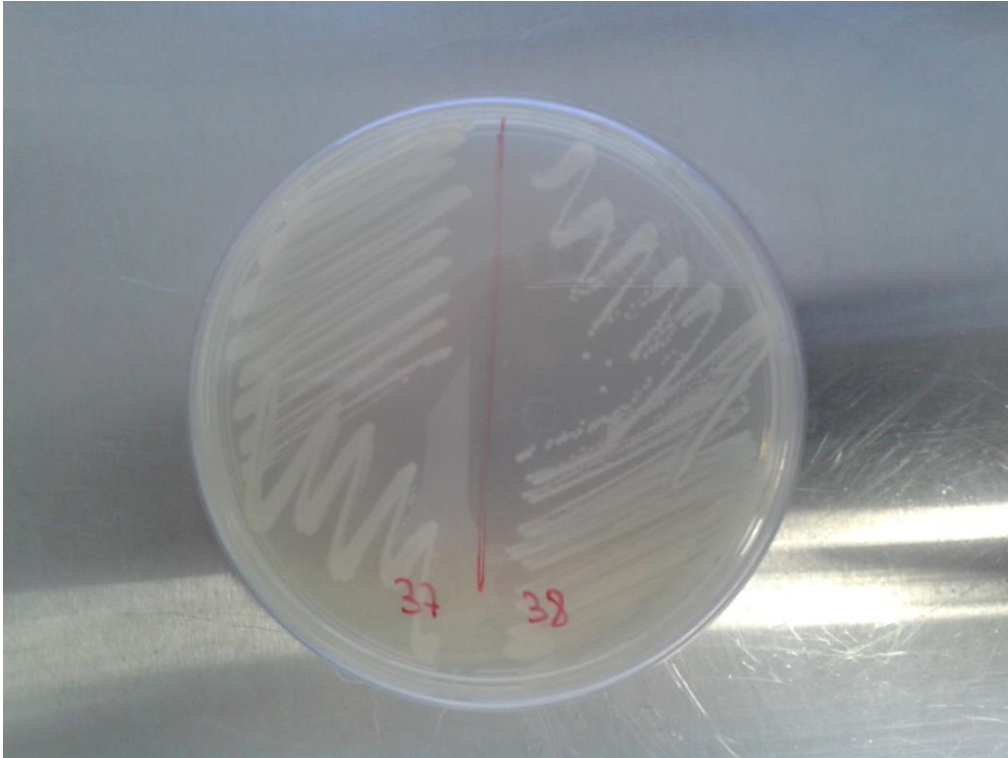


Figura 2-Colônia de SG em Ágar TSA



Figura 3-Colheita de colônia de SG



Figura 4-Pluge de gel de agarose



Figura 5-Lavagem dos pluges de agarose



Figura 6-Equipamento para realização da técnica de PFGE

Perguntas	SIM	NÃO
Idade Múltipla		
Próxima a rodovia		
Núcleo único		
Arco de desinfecção		
Registro de acesso de veículos		
Desinfecção de veículos		
Cerca de isolamento no perímetro da granja		
Possui barreira sanitária na entrada da granja com banho,troca de roupa e troca de calçado ou utilização de propé		
Possui funcionários		
Funcionários são orientados para que não tenham outras aves em casa		
Registro de acesso de pessoas que acessam a granja		
Presença de outras aves na propriedade		
Criação simultânea de outras espécies animais		
Presença de outras espécies domésticas no interior da granja		
Realiza o controle de pragas com o devido registro		
Possui composteira		
Pratica o vazio sanitário		
Silos de ração são mantidos limpos e fechados		

Figura 7- Questionário aplicado aos Médicos Veterinários do Serviço Veterinário Oficial (SVO)