

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE RESIDÊNCIA INTEGRADA EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**OCORRÊNCIA DE *Salmonella Pullorum* EM GALINHA D'ANGOLA (*Numida meleagris*): Revisão de literatura e relato de caso**

**PRISCILA NATÁLIA PINTO**

Belo Horizonte  
UFMG-EV  
2018

Priscila Natália Pinto

**Ocorrência de *Salmonella Pullorum* em Galinha da Angola (*Numida Meleagris*)  
Revisão de literatura e relato de caso**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista – Residência em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Saúde Pública com Ênfase na Interface Saúde Humana e Silvestre.

Tutor: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte  
UFMG-EV  
2018

P659o Pinto, Priscila Natália, 1993-  
Ocorrência de *Salmonella pullorum* em galinha da Angola (*Numida meleagris*):  
revisão de literatura e relato de caso /Priscila Natália Pinto. – 2018.

53p : il.

Tutor: Nelson Rodrigo da Silva Martins

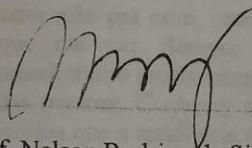
Monografia apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do título  
Especialista – Residência em Medicina Veterinária/Clinica de Ruminantes.

Inclui bibliografia

1. Ave doméstica – Doenças. 2. Salmonelose em animais. I. Martins, Nelson Rodrigo  
da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de  
Veterinária. III. Título.

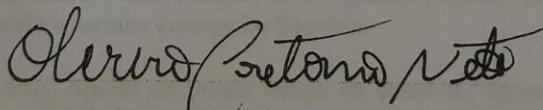
CDD – 636.508 96

Trabalho de Conclusão de Residência defendido e aprovado em 31 de agosto de 2018,  
pela Comissão Examinadora:

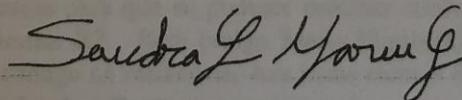


Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Tutor



Prof. Oliveira Caetano de Freitas Neto



Prof.ª Sandra Yuliet Marín Gomez

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família por todo apoio e incentivo desde o início.

Ao professor Nelson, por te me acolhido tão bem com tanto carinho e atenção. Com ele aprendi e cresci como profissional e como pessoa. Jamais conseguirei retribuir tamanho carinho e atenção. Obrigada por tudo paizão!

A Sandra, que se tornou uma mãe pra mim, esteve do meu lado em todos momentos, desde a primeira vez que me viu. Sempre disposta a ensinar sem poupar o conhecimento. Com ela aprendi muito profissionalmente e evolutivamente a sempre ver o lado bom das coisas e das pessoas. Conhecer você e poder ter sua amizade foi com certeza uma das melhores coisas que a residência me trouxe.

Ao professor Mauricio, sempre me divertindo com seu jeito ariano de ser. Só tenho a agradecer por sempre me ajudar em tudo. Também se tornou um pai pra mim. Um exemplo de pessoa.

Ao André, meu papai da bacteriologia. Apesar de sempre chegar na hora que estou indo embora, agitado com suas analogias loucas sempre esteve disposto a me ensinar. Falar das bactérias é sem dúvida um dos grandes prazeres dele. Só tenho a agradecer pela paciência e tamanha dedicação em me ensinar. Apesar de você ser muito bagunceiro e das nossas brigas científicas kkk, também foi um grande presente da residência. Muito obrigada pela amizade e carinho comigo Dr Bactéria.

Ao professor Oliveira que apesar do pouco tempo de convívio, aprendi muito com ele. Obrigada por me dar a ideia desse trabalho e me ajudar a desenvolver.

A todos os componentes e agregados do LABAVES que se tornaram minha segunda família e o laboratório minha segunda casa. Vocês estiveram ao meu lado em um dos momentos mais difíceis da minha vida, a perda do meu pai e me deram total apoio, carinho e acolhimento. Então só tenho a agradecer a todos por me apoiarem, me ensinarem e darem forças para que eu pudesse concluir minha residência. Meu muito obrigada a minhas eternas R2: Beth (vulgo Maria Elisabeth) e Lilían. A Mariana e Louize que entraram comigo na residência. Aos meus eternos R1s: Salene, Alexandra e Brendhal. As doutorandas Ana Doyle (com nosso mais novo mascotinho(a) que já estou ansiosa para conhecer), Bruna e Aila. Aos mestrandos Camila Guimarães, Talita, Thiago e Erika. As minhas ICs favoritas Camilinha Siqueira (minha irmãzinha do coração), Hannah, Eduarda (obrigada pelas massagens relaxantes no meu momento de tensão kkk) e Kamilla. A todos os estagiários em especial ao Vitor e Ana Buiate.

A todos os parceiros: Alessandra (que se tornou uma amiga querida), Marcus Romero

(obrigada por me dar a honra de fazer parte do projeto de conservação das ararinhas azuis), Felipe Coutinho, Júlio Cesar Gontijo e ao Ricardo. Pessoal da avicultura: professor Leonardo Lara e aos mestrandos Hitallo e Jennifer. Pessoal do IBAMA em especial a Erika, Cacília e Daniel, pelo acolhimento. Ao pessoal do LAMICO, professora Kelly (grande chefe de departamento, sempre muito eficiente), professora Maria Isabel (tive a honra de ser aluna da sua primeira turma de micologia) e as meninas que estão sempre dispostas a ajudar: Mari, Gabi e Lorraine.

A Letícia que desde o início teve muita boa vontade e paciência para me ajudar no trabalho na parte histopatológica, assim como a professora Rosilene.

A todos professores do DMVP que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional. Principalmente a professora Danielle que nos acolheu e ensinou muito, tanto profissionalmente quanto como pessoa.

A prof Suzi que foi uma excepcional coordenadora. Nos auxiliou em todos os momentos, sem exceção, sendo humana e entendendo o nosso ponto de vista, sempre em busca de melhorias, resolvendo tudo com a fineza, delicadeza e classe que só ela tem.

A Núbia por nos instruir e auxiliar em todas as etapas da residência.

A todos funcionários do DMVP. A Meire que é nossa querida ajudante, sempre deixando o ambiente limpinho para podermos trabalhar. A todos os técnicos (Ana Gabriela, Eduardo, Júnia, Agda, Isabel, dentre outros).

Enfim, vou sentir saudades de tudo e de todos, só de escrever esse agradecimento já escorre lágrimas de saudade.

*A persistência é o caminho do êxito.*  
*Charles Chaplin*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 GALINHA D'ANGOLA ( <i>Numida meleagris</i> ).....	18
2.2 TAXONOMIA E NOMENCLATURA DO GÊNERO <i>Salmonella</i> .....	18
2.3. PULOROSE .....	19
2.3.1 Etiologia.....	19
2.3.2 Epidemiologia e Patogenia .....	19
2.3.3 Sinais clínicos e Anatomopatológicos.....	23
2.3.4 Diagnóstico.....	24
2.3.5 Diagnóstico Diferencial.....	27
2.3.6. Tratamento, controle e prevenção .....	27
<b>3. RELATO DE CASO</b> .....	28
3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1.1 Necropsia.....	28
3.1.2 Microscopia Direta .....	29
3.1.3 Histopatologia.....	29
3.1.4 Isolamento Bacteriano.....	29
3.1.5 Extração do DNA.....	29
3.1.6 Determinação Espectrofotométrica da Concentração de DNA Total .....	30
3.1.7 Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR.....	30
3.1.8 Análise dos Produtos de PCR .....	31
3.1.9 Antibiograma.....	32
3.2 RESULTADOS.....	32
3.2.1 Necropsia.....	32
3.2.2 Microscopia Direta.....	32

3.2.3 Histopatologia.....	33
3.2.4 Isolamento Bacteriano .....	36
3.2.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) .....	36
3.2.6 Antibiograma.....	37
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Provas Bioquímicas para <i>Salmonella Pullorum</i> e <i>Salmonella Gallinarum</i> .....	26
<b>Tabela 2</b> – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos fragmentos esperados.....	31

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fotomicrografia do fígado corada por HE.....	33
<b>Figura 2</b> – Fotomicrografia do coração corada por HE.....	34
<b>Figura 3</b> – Fotomicrografia do rim corada por HE.....	34
<b>Figura 4</b> – Fotomicrografia do pulmão corada por HE.....	35
<b>Figura 5</b> – Fotomicrografia do baço corada por HE. ....	35
<b>Figura 6</b> - Imagem de gel de eletroforese apresentando a combinação de fragmentos obtidos após a aplicação da PCR duplex.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	caldo cérebro-coração
cm	centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Desoxirribonucleotídeos fosfatados</i>
DO	densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
g	gramas
h	horas
H <sub>2</sub> S	sulfeto de hidrogénio
HCl	ácido clorídrico
HE	hematoxilina-eosina
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IL-4	Interleucina quatro
IL-13	Interleucina treze
KCl	cloreto de potássio
LTD	L triptofano desaminase
M	molar
MC	MacConkey

MG	Minas Gerais
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
MH	Mueller-Hinton
MHC	complexo de histocompatibilidade maior
min	minutos
mL	mililitro
mm	micrometros
mM	milimolar
n	número
ng	nanograma
nm	nanometro
°C	grau Celsius
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
pmol	picomol
pL	petalidro
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
q.s.p	quantidade suficiente para
RIS	região identificadora do sorovar
rpm	rotações por minuto
S-C	selenito cistina
seg	segundos
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> (Livre de patógenos específicos)

SPI-1	ilha de patogenicidade de número um
SPI-2	ilha de patogenicidade de número dois
SSTT	sistema de secreção do tipo três
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	trisaminometano-EDTA
Th 1	Resposta do tipo T auxiliar um <sup>[1]</sup>
Th2	Resposta do tipo T auxiliar dois <sup>[2]</sup>
TLR-4	receptores do tipo <i>toll</i> de número quatro
TLR-5	receptores do tipo <i>toll</i> de número cinco
Tris-HCl	cloridrato de trisaminometano
TSA	àgar triptona de soja
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UFC	unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	ultravioleta
VB	àgar verde brilhante
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micrômetro

## RESUMO

A pulorose é uma doença de distribuição mundial causada por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (*S. Pullorum*). *S. Pullorum* tem grande importância na avicultura comercial devido ao impacto econômico e à saúde dos plantéis, com a determinação para a notificação e erradicação obrigatórias em reprodutores industriais de corte e postura. Embora a doença seja sistêmica grave, podendo resultar em alta mortalidade em pintos com até três semanas de idade, não há grave comprometimento intestinal. *S. Pullorum* é altamente adaptada às galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e raramente foi documentada como causa de doença em outros hospedeiros. Objetivou-se relatar um surto de pulorose em uma propriedade comercial de galinha d'Angola (*Numida meleagris*), onde houve 100% de mortalidade em filhotes nas duas primeiras semanas de idade apresentando quadro clínico caracterizado por dificuldade locomotora e prostração. O diagnóstico laboratorial envolveu necropsia, histopatologia, cultura bacteriológica e biologia molecular (detecção do gene *ratA* e uma região identificadora do sorovar Gallinarum). Foi realizado o antibiograma para avaliar a susceptibilidade dessa bactéria à amoxicilina com ácido clavulânico, amicacina, ampicilina, neomicina, sulfametoxazol + trimetoprima, enrofloxacina, eritromicina, cefalotina, fosfomicina, tetraciclina e ceftiofur. À necropsia foram observados congestão pulmonar, hepatomegalia, esplenomegalia e nefromegalia, com presença de focos amarelados no fígado e petéquias no baço e rins. Ao exame histológico, foram observados no fígado múltiplos nódulos paratifoideais aleatórios, caracterizados por áreas de necrose com fibrina e infiltrado moderado de macrófagos e heterófilos. Nos rins foram observadas áreas multifocais discretas de necrose, associadas a infiltrado multifocal moderado de linfócitos e plasmócitos, e plasmocitose moderada, e no baço, infiltração moderada de macrófagos. As colônias foram identificadas presuntivamente como *Salmonella*, após crescimento em agar MacConkey e Verde Brilhante e a interpretação dos teste do IAL (*Instituto Adolfo Lutz*), TSI (*Triple Sugar Iron*), catalase, oxidase e avaliação das características morfotintórias por Gram. As colônias sugestivas de *Salmonella* foram submetidas ao diagnóstico sorológico, por detecção dos antígenos somáticos e foram identificadas como *Salmonella* spp.. Na PCR, as amostras geraram produtos de 243 pb (*ratA*) e 543 pb (RIS), correspondentes à massa molecular esperada para *Salmonella Pullorum*. No antibiograma a estirpe de *Salmonella Pullorum* apresentou sensibilidade aos fármacos amoxicilina com ácido clavulânico, amicacina, ampicilina, neomicina, enrofloxacina, eritromicina, cefalotina, fosfomicina, tetraciclina e ceftiofur, e resistência apenas a sulfametoxazol + trimetoprima. *Salmonella Pullorum* isolada no presente estudo foi de alta virulência em *N. meleagris*. Ressalta-se a potencial importância epidemiológica de *Numida meleagris*, como reservatório de *Salmonella*, como fonte de infecção para outras espécies, inclusive para a avicultura industrial.

**PALAVRAS-CHAVES:** Galliformes, *Numididae*, pulorose, salmonelose.

## ABSTRACT

Pullorosis is a disease of worldwide occurrence caused by *Salmonella enterica* subspécie *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum (*S. Pullorum*). In breeders of the commercial chicken industry, pullorosis is of mandatory notification and eradication. Although the disease is severe and can result in high mortality in chicks up to three weeks of age, there is no serious intestinal involvement. *S. Pullorum* is highly adapted to chickens (*Gallus gallus domesticus*) and has rarely been documented as a cause of disease in other hosts. The objective of this study is to describe an outbreak of pullorosis in commercial guinea fowl (*Numida meleagris*), with 100% mortality in with 100% mortality in the first two weeks of age chicks, clinically characterized by locomotor difficulty and prostration. The laboratory diagnosis involved necropsy, histopathology, bacteriology, serology and molecular biology. The antibiotic for antibiotic therapy for ampicillin, amikacin, ampicillin, neomycin, sulfamethoxazole + trimethoprim, enrofloxacin, erythromycin, cephalothin, fosfomicin, tetracycline and ceftiofur. Necropsy showed pulmonary congestion, hepatomegaly, splenomegaly and nephromegaly, with presence of yellowish foci in the liver and petechiae in the spleen and kidneys. At the histological examination, several random parathyroid nodules were observed in the liver, characterized by areas of necrosis with fibrin and moderate infiltrate of macrophages and heterophils. Discrete multifocal areas of necrosis were observed in the kidneys, associated with moderate multifocal infiltration of lymphocytes and plasma cells, and moderate plasmacytosis, and in the spleen, moderate infiltration of macrophages. The colonies were presumptively identified as *Salmonella* after growth on MacConkey and Brilliant Green Agars and the interpretation of the IAL (Adolfo Lutz Institute), TSI (Triple Sugar Iron), catalase, oxidase and evaluation of the staining characteristics by Gram. The colonies suggestive of *Salmonella* were submitted to the serological diagnosis for somatic antigens and were identified as *Salmonella* sp. In the PCR, suspect colonies generated products of 243 bp (*ratA*) and 543 bp (*RIS*), corresponding to the expected molecular masses for genes of *Salmonella* Pullorum. In the antibiogram the strain of *S. Pullorum* showed sensitivity to amoxicillin with clavulanic acid, amikacin, ampicillin, neomycin, enrofloxacin, erythromycin, cephalothin, fosfomicin, tetracycline and ceftiofur, and resistance to sulfamethoxazole + trimethoprim only. The *S. Pullorum* strain was highly virulent to *N. meleagris*. The potential epidemiological importance of *N. meleagris* as reservoir of *Salmonella* and source of infection to other species, including industrial chickens, is highlighted.

**KEYWORDS:** Galliformes, *Numididae*, pullorosis, salmonellosis.

## 1. INTRODUÇÃO

A salmonelose é causada por bactérias do gênero *Salmonella*, de distribuição mundial, sendo de importância tanto em saúde pública como em saúde animal devido ao impacto econômico que ocasiona (SCALLAN et al, 2011; MUNIR et al., 2014; WHO, 2017; CDC, 2018). Os sorovares de *Salmonella* são capazes de infectar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo seres humanos. Alguns sorovares são específicos e totalmente adaptados para determinado hospedeiro, causando doença sistêmica limitada a uma espécie filogeneticamente relacionada (RABSCH et al, 2002; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009).

As aves são um dos principais reservatórios das salmonelas (RABSCH et al, 2002). A gravidade da infecção depende de muitos fatores, incluindo o sorovar, a estirpe, via de infecção, idade, status imune e linhagem das aves. *Salmonella* Gallinarum, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são os sorovares de maior relevância na avicultura comercial. *Salmonella* Gallinarum e *S. Pullorum* representam grande importância, por afetarem diretamente a saúde das galinhas, causando o tifo aviário e a pulorose, respectivamente. *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* são os sorovares mundiais mais importantes transmitidos de aves para humanos, associados com casos de infecção alimentar. Nas aves, ocasionalmente, podem causar doença, conhecida como paratifo aviário. Porém, na maioria das vezes, as galinhas mantêm a infecção intestinal assintomática excretando a *Salmonella* de forma intensa nas fezes (SCALLAN et al, 2011; WHO, 2017; CDC, 2018).

A manifestação clínica do tifo aviário e da pulorose, ocorre sem grande comprometimento intestinal, embora sejam doenças sistêmicas graves, podendo resultar em alta mortalidade. Enquanto que o paratifo aviário é caracterizado por uma gastroenterite que dependendo da susceptibilidade do hospedeiro, pode resultar em uma infecção sistêmica. O tifo aviário e a pulorose, embora de ocorrência mundial, foram erradicadas da avicultura comercial nos Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e a maioria dos países da Europa Ocidental. Porém, ainda são comuns em muitas regiões do mundo, incluindo México, América Central e do Sul, África e o subcontinente indiano (SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD E BARROW, 2008).

*Salmonella* Pullorum é altamente adaptada e raramente causa doença em outros hospedeiros além de galinhas. Na literatura, há relatos de casos isolados em diferentes espécies de aves, principalmente perus, mas também em faisões, codornas, galinha d'Angola, patos, marrecos, pombos, pardais, canários, dom-fafe (*Pyrrhula pyrrhula*) e papagaios (CHUTE E GERSHMAN, 1962; MCBRIDE et al, 1991; HOFER et al, 1997; PENNYCOTT E DUNCAN, 1999; SHIVAPRASAD, 2000; MCCREA et al, 2006; SHIVAPRASAD E BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009; CFSPH, 2009).

Dentre as linhagens de galinhas, as pesadas são as mais susceptíveis a *S. Pullorum* quando comparadas com linhagens leves. As aves jovens com até três semanas de idade, são mais susceptíveis à manifestação clínica, enquanto aves adultas normalmente são assintomáticas, podendo ou não tornarem-se portadoras. *S. Pullorum* é transmitida principalmente por via vertical, mas também pela via horizontal principalmente no incubatório e no ambiente de criação. A pulorose, causa grandes perdas econômicas na indústria avícola, devido às altas taxas de mortalidade que podem chegar a 100%, piora de índices zootécnicos, queda na produção de ovos, diminuição da eclodibilidade por elevação da mortalidade embrionária, aumento dos custos com medicamentos e restrições para o comércio internacional de produtos alimentícios (SHIVAPRASAD E BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009; BARROW E FREITAS NETO, 2011).

No Brasil, a Secretaria de Defesa Agropecuária, através do Departamento de Sanidade Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realiza monitorias constantes da situação epidemiológica e dos riscos sanitários impostos ao plantel avícola nacional, amparado no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) (BRASIL, 2003). O PNSA estabelece o monitoramento permanente de plantéis de reprodutoras comerciais para certificação de núcleos e granjas como livres ou controlados para as principais salmonelas de relevância na avicultura comercial (BRASIL, 1994; BRASIL, 2003). Entretanto, pouco ou nenhum controle sanitário é realizado em pequenas criações de aves ornamentais e nas de subsistência, que podem sofrer perdas quando acometidas por patógenos e ainda servir como reservatórios e fontes de infecção para os humanos e outras aves, inclusive da avicultura comercial (BUCHHOLZA E FAIRBROTHER, 1992; BESSIN et al, 1998; PENNYCOTT E DUNCAN, 1999; SANTOS et al, 2008; BOKO et al, 2011A; BOKO et al, 2011B; MARCHESI E ARALDI-FAVASSA, 2011).

Considerando-se a relevância da pulorose para a avicultura, torna-se importante também a vigilância e o controle da enfermidade em pequenas criações, como de aves ornamentais e de subsistência, tendo em vista a manutenção da viabilidade econômica dessas atividades e a proteção dos plantéis comerciais. O presente trabalho teve como objetivo relatar um surto de pulorose em pintinhos de galinha d'Angola (*Numida meleagris*) diagnosticado no Setor de Doenças das Aves - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. GALINHA D'ANGOLA (*Numida meleagris*)

Acredita-se que as galinhas d'Angola sejam oriundas da Costa da Guiné na África. Hoje ocorre na Ásia e América Latina principalmente em estado semi-doméstico, enquanto na Europa, Estados Unidos da América e Austrália em produção comercial em larga escala (IKANI E DAFWANG, 2004). Isto indica que a galinha d'Angola tem hoje uma distribuição mundial. Nahashon et al (2006) indica a galinha d'Angola como uma importante fonte de proteína (carne e ovos). A carne tem alto conteúdo de proteínas e baixo teor de gordura, sendo assim altamente valorizada quando comparada com a carne de frango (MOREKI E SEABO, 2012). Ayeni (1980) afirma que a carne da galinha d'Angola tem um conteúdo proteico de 28% comparado com 20% de frango. A galinha d'Angola adulta é resistente à maioria das doenças de galinhas (TEYE E ADAM, 2000), além de requerer menos trabalho e manejo (SAYILA, 2009).

### 2.2 TAXONOMIA E NOMENCLATURA DO GÊNERO *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é integrante da família Enterobacteriaceae, que primariamente é classificada em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *Indica* (TINDALL et al, 2005). As subespécies podem apresentar sorovares e biovares com diferentes nomes devido a algumas diferenças nas características de patogenicidade, bioquímica ou habitat. Na classificação atual, *Salmonella Gallinarum* e *S. Pullorum* são considerados como variantes de um mesmo sorovar (*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum, com os biovares Gallinarum e Pullorum) (GRIMONT E WEILL, 2007). Com intuito de simplificar a descrição, os dois biovares serão aqui denominados como *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*.

Atualmente, são descritos mais de 2.659 sorovares (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014), que são classificados de acordo com variação antigênica em porções de polissacarídeos somáticos (antígeno O), antígenos flagelares (antígeno H) e polissacarídeos capsulares (antígeno Vi). As estirpes mais frequentemente envolvidas nas infecções alimentares são as de *S. enterica* subsp. *enterica*, que tem por habitat os animais homeotérmicos e correspondem por 99% das salmoneloses humanas. *S. enterica* subsp. *salamae*, subsp. *arizonae* e subsp. *diarizonae* são frequentemente isoladas do conteúdo intestinal de animais pecilotérmicos. *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. bongori* são predominantemente isoladas do ambiente e raramente são patogênicas para humanos (SCVPH, 2003; PORWOLLIK et al, 2004; TINDALL et al, 2005; GRIMONT E WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al, 2010).

Alguns sorovares, são específicos e totalmente adaptados para determinado hospedeiro, causando doença sistêmica limitada a uma espécie filogeneticamente relacionada. Têm-se, por exemplo, *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* específicos de aves, *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi A* em humanos, *Salmonella Abortusequi* nos equinos, *Salmonella Abortusovis* nos ovinos e *Salmonella Typhisuis* em suínos. Outros sorovares possuem uma ampla variedade de hospedeiros, podendo ter potencial zoonótico, acometendo tanto seres humanos como diferentes espécies de animais, que atuam como reservatórios naturais da *Salmonella*. Como exemplo, os sorovares *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* (PORWOLLIK et al, 2004; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009; MADIGAN et al, 2016).

## 2.3. PULOROSE

### 2.3.1 Etiologia

A pulorose é uma doença causada por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum. *Salmonella Pullorum* é um bacilo curto com largura de 0,3 a 1,5 µm e comprimento de 1,0 a 2,5 µm, Gram-negativo, não formador de esporos, com ausência de cápsula e imóvel. A temperatura de crescimento é variável, sendo ideal a 37°C, e o pH entre 4 a 9, sendo ideal em torno de 7,0 (+/- 0,2) (HOLT et al., 1994; HOLT E CHAUBAL, 1997; OIE, 2012).

Normalmente, forma colônias que medem cerca de 1 a 4 mm de diâmetro, com bordas lisas e arredondadas, um pouco elevadas e brilhantes. Cresce bem em meios não seletivos, de enriquecimento e em meios de cultura para enterobactérias que contém substâncias que inibem o crescimento de algumas bactérias, tais como o ágar verde brilhante e ágar de MacConkey. O crescimento pode ser lento de modo que a incubação média oscila entre 24 a 48 horas (HOLT et al., 1994; BRASIL, 2008; OIE, 2012).

Quanto aos aspectos bioquímicos, é aeróbio e/ou anaeróbio facultativo, descarboxila aminoácidos, pode fermenta glicose, manitol, arabinose, dextrose, galactose, manose, ramnose e xilose com produção de ácido podendo ou não produzir gás. Porém, não fermenta adonitol, dextrina, dulcitol, eritrol, glicerol, inositol, inulina, lactose, rafinose, sacarose, salicina, sorbitol e amido. É catalase positiva e oxidase negativa. Não fermenta malonato, não hidrolisa a uréia, não produz indol, não utiliza o citrato como fonte única de carbono, reduz nitrato a nitrito e pode produzir sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), mas lentamente (BLAXLAND et al, 1956; TRABULSI E EDWARDS, 1962; HOLT et al., 1994; CHRISTENSEN et al, 1992; FOLEY et al, 2013; KHAN et al, 2014).

### 2.3.2 Epidemiologia e Patogenia

A pulorose foi descrita pela primeira vez em 1899, por Dr. Leo F. Rettger. Inicialmente,

foi nomeada como septicemia fatal dos pintinhos e em seguida por diarreia branca bacilar. Em 1929, adotou-se o termo “Doença de Pullorum”, que se tornou internacionalmente conhecida (BULLIS, 1977) sendo atualmente de distribuição mundial. Alguns países desenvolvidos como Europa Ocidental, Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Austrália e Japão são considerados livres de *S. Pullorum* na avicultura comercial. Porém, pode está presente em aves fundo de quintal (BARROW E FREITAS NETO, 2011). Em muitos países em desenvolvimento, incluindo a América Latina, Oriente Médio, subcontinente indiano, África e outras partes do mundo, as infecções por *S. Pullorum* são comuns e permanecem entre as principais ameaças à avicultura comercial (SHIVAPRASHAD, 2000; CFSPH, 2009; OIE, 2012).

As galinhas são consideras hospedeiro natural da *Salmonella Pullorum*, que raramente causa doença em outros animais. Na literatura, há relatos de casos isolados em diferentes espécies de aves, principalmente perus, mas também em faisões, codornas, galinha d’Angola, patos, marrecos, pombos, pardais, canários, dom-fafe (*Pyrrhula pyrrhula*) e papagaios. Além de aves, foi descrito o isolamento de *Salmonella Pullorum* de chimpanzé, coelho, cobaio, suíno, vison, raposa, cão, gato, bovino, chinchila, rato de laboratório e selvagem e humano (MITCHELL E GARLOCK, 1946; CHUTE E GERSHMAN, 1962; MC BRIDE et al, 1991; HOFER et al, 1997; PENNYCOTT E DUNCAN, 1999; SHIVAPRASAD, 2000; Mc CREA et al, 2006; SHIVAPRASAD E BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009; CFSPH, 2009).

O período de incubação varia geralmente de 4 a 6 dias. Geralmente, é sintomática apenas em aves jovens, com menos de 3 semanas de idade, mas surtos ocasionais são relatados em galinhas adultas. A morbidade e a mortalidade variam de acordo com a estirpe da *S. Pullorum*, manejo, estado nutricional, via e dose de exposição, idade das aves, status imunitário e outros fatores que causam estresses e baixa de imunidade como infecções concomitantes (SHIVAPRASAD, 2000). A taxa de morbidade é significativamente maior do que a taxa de mortalidade. Algumas aves se recuperam, mas podem tornam-se portadoras (CFSPH, 2009). Em aves jovens, a mortalidade pode chegar a 100%, com maiores perdas entre duas a três semanas de idade. Entre as galinhas, as linhagens mais leves, como as Leghorns, são mais resistentes à pulorose do que linhagens mais pesadas (HUTT E SCHOLE, 1941; WIGLEY et al, 2002; WIGLEY et al, 2006; SHIVAPRASAD E BARROW, 2008; BARROW E FREITAS NETO, 2011; LI et al, 2018).

A transmissão de *S. Pullorum* pode ocorrer por via vertical e horizontal, sendo a transmissão vertical a mais importante para a epidemiologia da doença. A transmissão transovariana é a principal forma de disseminação da *S. Pullorum*, através da contaminação direta do ovário, embora também ocorrendo no oviduto antes da ovoposição. As aves podem torna-se portadoras crônicas, disseminando a bactéria através dos ovos durante meses (BERCHIERI JÚNIOR et al, 2001; WIGLEY et al,

2001; WIGLEY et al, 2005; GANTOIS, et al, 2009; BERHE et al, 2012; SAHA et al, 2012; HAIDER et al, 2014). A transmissão horizontal ocorre por meio do acasalamento e canibalismo em aves infectadas, por feridas na pele e ingestão de ovos contaminados ou por fômites através de alimentos, água e cama contaminados. Em ambientes favoráveis, *Salmonella* sobrevive por meses até mesmo por anos. De forma mecânica as pessoas (veterinários e funcionários de granja), animais, insetos e roedores seriam importantes disseminadores de *Salmonella*. Aves com infecção subclínica podem eliminar a bactéria pelas fezes durante meses, facilitando a disseminação (MEERBURG E KIJLSTRA, 2007; CFSPH, 2009). As fezes contaminadas em contato com a casca do ovo, também, pode ser uma potencial fonte de infecção para o embrião, devido a penetração dessa bactéria para o interior do ovo. Pode haver também, contaminação por via aerógena, principalmente no incubatório, devido ao contato de pintinhos de várias origens distintas ou até mesmo pelo consumo de mecônio contaminado (GANTOIS, et al, 2009; BERHE et al, 2012).

A resistência dos microrganismos do gênero *Salmonella* no meio ambiente, assim como a existência de diversos animais portadores proporciona uma distribuição cosmopolita e a persistência do agente no meio ambiente (MACIOROWSKI et al, 2004; BARROW E FREITAS NETO, 2011; SCALLAN et al, 2011). *Salmonella* spp., são capazes de resistirem por até nove meses sob solos úmidos, na água e em insumos para alimentação animal. Essas enterobactérias são sensíveis à luz solar e aos desinfetantes tais como fenóis, clorados e iodados. Também são sensíveis a elevadas temperaturas e geralmente, podem ser destruídas por aquecimento a 60°C, por 15 a 20 minutos, enquanto que o processo de congelamento leva apenas a uma redução significativa do número de células viáveis, uma vez que possuem características psicotróficas, não sendo capaz de provocar a destruição completa das bactérias (GAST et al, 2010).

As interações entre os mecanismos de invasão e evasão de *Salmonella* com o sistema imune da ave irão determinar a patogenia das salmoneloses (CHAPPELL et al, 2009) A maioria das infecções por *Salmonella* spp. em aves se inicia pela via oral. Durante a invasão intestinal, uma enterite é provocada por proteínas efetoras, secretadas por um poro conhecido como sistema de secreção do tipo três (SSTT) que é codificado por genes do cromossomo bacteriano presentes na ilha de patogenicidade de número um (SPI-1). O reconhecimento da proteína do flagelo e de lipopolissacarídeos da parede celular por receptores do tipo *toll* (TLR-5 e TLR-4), presentes nos enterócitos, desencadeia uma resposta pró-inflamatória com a produção de citocinas e quimiocinas, que ativam macrófagos e recrutam heterófilos e linfócitos para o local da invasão, intensificando a inflamação da parede intestinal (GEWIRTZ et al., 2000; GEWIRTZ et al., 2001; ZENG et al., 2003). A importância do SSTT da SPI-1 durante a infecção de aves por *S. Pullorum* ainda não foi investigada (BARROW & FREITAS NETO, 2011). Ao que tudo indica, a ausência de flagelo nesse biovar seria vantajosa para evitar o reconhecimento via TLR-5, facilitando o desenvolvimento da infecção sistêmica (KAISER et al., 2000; WIGLEY E KAISER, 2003; IQBAL et al., 2005).

Após a invasão, acredita-se que *Salmonella* spp. seria fagocitada por macrófagos ou por células dendríticas e transportada pelo sistema linfático para o fígado e baço (MASTROENI E MENAGER, 2003). A fagocitose de *Salmonella* spp. por macrófagos seria a chave para o desenvolvimento da infecção sistêmica (BARROW et al., 1994). Neste contexto, a existência de outro SSTT, codificado por genes presentes na ilha de patogenicidade de número dois (SPI-2), seria crucial por auxiliar a sobrevivência bacteriana no interior de macrófagos (HENSEL, 2000). O SSTT da SPI-2 funciona como um poro utilizado pelo microrganismo para injetar proteínas efetoras dentro dos vacúolos de fagocitose (fagossomos), interferindo com o transporte intracelular e prevenindo a fusão entre os fagossomos e os lisossomos. O SSTT da SPI-2 também pode alterar a secreção de citocinas e a expressão do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (CHEMINAY et al., 2005). A perda de função do SSTT da SPI-2 impossibilita a sobrevivência de *Salmonella* spp. dentro de macrófagos e leva a completa atenuação de *S. Pullorum* durante a infecção (JONES et al., 2001; WIGLEY et al., 2002a; JONES et al., 2007).

Macrófagos oriundos de linhagens de aves resistentes a infecções bacterianas sistêmicas têm maior capacidade de destruir *Salmonella* spp., por produzirem maiores quantidades de radicais reativos de oxigênio gerados pela enzima NADPH-oxidase. Estes são também capazes de produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias mais rapidamente e em maior quantidade que aqueles provenientes de aves susceptíveis (WIGLEY et al., 2002b; WIGLEY et al., 2006). A rápida e elevada produção de IL-18 pelos macrófagos é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa do tipo Th1, a qual eliminará a bactéria da ave (BERCHIERI & FREITAS NETO, 2009). Portanto, aves geneticamente resistentes às salmoneloses sistêmicas possuem imunidade inata mais forte e ativam resposta imune celular de maior intensidade que aves susceptíveis (CHAPPELL et al., 2009).

Experimentalmente, *S. Pullorum* pode persistir no interior de macrófagos do fígado e baço de aves, por pelo menos 50 semanas (WIGLEY et al., 2001). Essa persistência deve-se ao SSTT codificado por genes da SPI-2. A transmissão vertical, importante na pulrose, depende deste fenômeno biológico, o qual não é totalmente compreendido. Após a fase sistêmica, o número de células de *S. Pullorum* no fígado e no baço diminui consideravelmente. Entretanto, o início da postura causa imunossupressão, facilitando a ocorrência de nova disseminação sistêmica do microrganismo, que atinge os órgãos reprodutivos (WIGLEY et al., 2005). Existem duas hipóteses para explicar a persistência de *S. Pullorum* em aves. De acordo com uma delas, a ausência de expressão do MHC por alguns macrófagos infectados faria com que os mesmos não fossem reconhecidos pelas células T. Uma outra possibilidade, seria a de que *S. Pullorum* induziria na ave uma resposta imune adaptativa do tipo Th2, associada à produção de IL-4 e IL-13. Em aves infectadas por *S. Pullorum*, a expressão de interleucinas associadas à resposta Th-1 (IL-18 e INF- $\gamma$ ) encontra-se abaixo dos níveis basais, enquanto que IL-4 é expressa em níveis elevados (CHAPPELL et al., 2009), sugerindo uma modulação do sistema imune para uma resposta Th2, com elevada produção de anticorpos e fraca resposta imune celular.

### 2.3.3 Sinais clínicos e Anatomopatológicos

Os sinais clínicos são observados principalmente em aves jovens com menos de três semanas de idade, sendo inespecíficos, como depressão, fraqueza, anorexia, perda de apetite, retardo no crescimento, sonolência, asas caídas, amontoamento, desidratação, penas eriçadas, respiração ofegante, perda de peso corporal, diarreia esbranquiçada a amarelada, seguida de morte. Os sinais da doença podem não aparecer nos primeiros cinco a dez dias. A mortalidade é mais severa em aves recém nascidas, podendo ser observada após a eclosão até três semanas de idade. (ROY et al, 2001; HABIB-UR-REHMAN et al, 2003; HAIDER et al, 2008; NETSANET et al, 2012; OIE, 2012; SAHA et al., 2012; HAIDER et al, 2013) Os pintos sobreviventes na maioria das vezes, apresentam um baixo desempenho zootécnico, retardo de crescimento, depressão e empenamento ruim, tornando-se refugos. Inchaço das articulações, sinovites, claudicação e cegueira, também já foram observados, porém, com menor frequência. Contudo, algumas aves conseguem recuperar o desenvolvimento esperado para os padrões de linhagem, mas poderão tornar-se portadoras da *Salmonella*, contaminando assim seus ovos (SHIVAPRASAD, 2000). Em aves adultas, a manifestação clínica apresenta-se na maioria das vezes de forma subclínica ou inaparente tornando difícil a suspeita desta doença. De um modo geral, observa-se queda no consumo de ração, penas arrepiadas, crista pálida e retraída, queda de postura, fertilidade e eclodibilidade, anorexia, depressão, diarreia branco-amarelada a amarelo esverdeada e desidratação (SHIVAPRASAD, 2000; ROY et al, 2001; HAIDER et al, 2008; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009; HAIDER et al, 2012; SAHA et al., 2012; HAIDER et al, 2013).

Em aves jovens, de um modo geral, podem ser encontrados lesões em diversos órgãos, devido a septicemia. Com maior frequência, encontra-se fígado, baço e rins congestos e aumentados. Nódulos brancos amarelados podem ser encontrados no fígado, baço, pulmões, coração, pâncreas, moela, duodeno e no ceco. Os nódulos no coração podem causar distorção no formato, levando a congestão passiva do fígado, resultando em ascite. Devido à infiltração multifocal de células mononucleares do sistema fagocitário, o baço pode apresentar uma textura mosqueada ao exame macroscópico. Pode não haver absorção do saco da gema. Os vasos sanguíneos subcutâneos podem estar dilatados. Pode ocorrer congestão dos pulmões. O pericárdio, cápsula de Glisson e o peritônio podem estar espessados, contendo exsudato amarelado ou fibrinoso. O ceco pode estar aumentado, com material caseoso no seu interior, podendo haver necrose da mucosa. As articulações podem estar inchadas e podem conter fluido viscoso amarelado. Outras alterações podem ser encontradas, como congestão dos órgãos internos, espessamento da parede intestinal e exsudato na câmara anterior dos olhos. Quando a doença ocorre de forma superaguda, as alterações macroscópicas são mínimas ou inexistentes (SHIVAPRASAD, 2000; ROY et al, 2001; HOSSAIN et al 2006; HAIDER et al, 2008; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009; SAHA et al, 2012; HAIDER et al., 2013).

Em aves adultas, muitas vezes por não desenvolverem a forma clínica da doença, podem apresentar alterações mínimas macroscopicamente. Na maioria das vezes, observa-se atrofia dos folículos ovarianos, podendo apresentar-se hemorrágicos, com material caseoso, necrosado ou cístico. Pode ocorrer também, atrofia do oviduto, com presença de material caseoso. A disfunção ovariana pode levar a peritonite. Alguns portadores têm peri-hepatite, pâncreas mosqueado, pericardite, artrite, granulomas caseosos nos pulmões e sacos aéreos e focos necróticos nos testículos. Em aves adultas clinicamente afetadas, pode-se observar fígado friável, aumentado, muitas vezes manchado de bile, assim como um baço e rins aumentados. Pode haver enterite catarral com conteúdo intestinal viscoso, corado por bile. Em alguns casos, os focos necróticos podem ser visíveis através da parede intestinal. A necrose focal também pode ocorrer no coração, fígado, pâncreas, intestino e testículos. Pode-se observar pericardite fibrinosa. Essas alterações podem ser confundidas com o tifo aviário (SHIVAPRASAD, 2000; ROY et al, 2001; HABIB-UR-REHMAN et al., 2003; HAIDER et al, 2008; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009; HAIDER et al, 2012; SAHA et al., 2012; HAIDER, 2013).

#### 2.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo deve ser realizado com base na associação da anamnese, sinais clínicos, anatomopatológicos e confirmação com os exames laboratoriais. Embora os sinais clínicos e os achados *post-mortem* da pulrose possam ser altamente sugestivos da doença, não são suficientemente distintos de outras causas de septicemia para serem patognômicos. Portanto, torna-se imprescindível a realização de exames laboratoriais para fechar o diagnóstico. Os exames laboratoriais, consistem em testes sorológicos, bacteriológicos e moleculares. O diagnóstico confirmatório depende do isolamento do organismo, caracterização bioquímica e caracterização antigênica utilizando anti-soros específicos, enquanto os testes sorológicos são satisfatórios para estabelecer a presença e estimar a prevalência da infecção dentro de um lote (OIE, 2012).

Os testes sorológicos são melhor aplicados como teste de rebanho, pois os resultados para aves individuais variam de acordo com o estágio da infecção. A sorologia pode ser usada para detectar aves infectadas e estimar a prevalência da infecção dentro de um lote. Os testes sorológicos recomendados pela OIE (2012) incluem o teste rápido de aglutinação com sangue total, teste rápido de aglutinação com soro, teste de aglutinação em tubo e teste de micro aglutinação. Outros testes sorológicos podem ser realizados, como micro-antiglobulina, imunodifusão, hemaglutinação e ensaio imunoenzimático (ELISA). Técnicas de ELISA foram descritas para a detecção de anticorpos contra *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. O ELISA indireto utilizando o antígeno lipopolissacarídeo é provavelmente o teste sorológico mais sensível e específico para *Salmonella* (OLIVEIRA et al, 2004). Porém, nenhum kit de ELISA comercial para *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* está atualmente disponível. Outras salmonelas invasivas, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* ou o uso de vacinas, podem levar a resultados falso-positivos em testes sorológicos para *S. Pullorum* (OIE, 2012). Aves reagentes em testes sorológicos

devem ser submetidas a exame bacteriológico.

Os métodos de recuperação de *S. Pullorum* variam de acordo com a origem das amostras. Podem ser utilizados, suabe cloacal e das fezes para fazer isolamento, mas amostras de tecidos colhidos *post mortem* são geralmente mais bem sucedidos. Nos estágios agudos da doença, a bactéria pode ser recuperada de quase todos os órgãos, tecidos, fezes e ovos. Nas aves adultas que se tornaram portadoras, a *S. Pullorum* é mais comumente recuperada dos folículos e do oviduto, e apenas ocasionalmente de outros órgãos e tecidos. Os tecidos preferidos para a investigação de rotina são fígado, junção ileocecal, ovário e oviduto. Em caso de aves tratadas com antibióticos durante 2 a 3 semanas antes do teste, os resultados podem ser falso negativos (OIE, 2012).

*S. Pullorum* cresce na maioria dos meios não seletivos padrões, bem como em meios seletivos, incluindo ágar MacConkey, verde brilhante e xilose lisina desoxicolato. Amostras de material do solo, material fecal ou de incubação, devem ser cultivadas por 24 horas em caldo de enriquecimento seletivo, como selenito cistina (37°C), tetrionato (37°C) ou caldo Rappaport (42°C), por exemplo, seguido de plaqueamento em meio seletivo a 37°C durante 24 horas (PROUX et al, 2002; OIE, 2012). Porém, sabe-se que algumas amostras de *S. Pullorum* são inibidas em caldo tetrionato ().

O enriquecimento seletivo direto é recomendado para fezes e amostras intestinais ou ambientais. A maioria dos caldos de enriquecimento seletivo, com exceção do selenito cistina, são concebidos para serem utilizados após uma fase de enriquecimento não seletivo. Nesse caso, a *S. Pullorum* pode ser facilmente inibida por outras bactérias competidoras, resultando em testes falso-negativos (OIE, 2012). O pré enriquecimento não seletivo com água peptonada tamponada e caldos de infusão de carne ou caldo de pré-enriquecimento universal a 37°C por 24 horas, por exemplo, podem dar melhores resultados para tecidos obtidos post-mortem, onde provavelmente não haverá organismos competidores (MALLINSON E SNOEYENBOS, 1989). Em meios não inibidores como ágar nutriente e ágar sangue, após incubação a 37°C por 24 horas, a *S. Pullorum*, forma colônias lisas, translúcidas, levemente elevadas com cerca de 1 a 2 mm de diâmetro. Enquanto que em ágar seletivos, o crescimento pode ocorrer lentamente e produzir colônias muito pequenas de modo que a incubação das placas a 37°C por 48 horas seja necessária. Colônias suspeitas podem ser investigadas sorologicamente, testando antígenos somáticos "O" 9, observando a motilidade e testando bioquimicamente.

A confirmação do gênero pode ser feita por testes complementares com soros polivalentes anti-antígenos somáticos (O) e anti-antígenos flagelares (H). *S. Pullorum* possuem os antígenos "O" 1, 9 e 12 (BROOKS et al, 2008). No entanto, há uma variação na razão de 12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub> e 12<sub>3</sub>; a estirpe-padrão contém mais 12<sub>3</sub> do que 12<sub>2</sub>, enquanto o reverso é verdadeiro da forma variante. Formas intermediárias também existem. Como esta variação ocorre, é necessário usar um antígeno polivalente (OIE, 2012).

Para a confirmação bioquímica e sorológica, cinco colônias típicas (colônias pequenas, com bordas lisas e arredondadas, um pouco elevadas e brilhantes) ou suspeitas devem ser escolhidas para um exame mais aprofundado (HOLT et al., 1994). As colônias selecionadas devem ser repicadas em ágar nutriente, de forma a permitir o crescimento de colônias isoladas. Somente culturas puras obtidas de meios não seletivos devem ser usadas. Os testes bioquímicos de rotina, geralmente são executados a 37°C por 24 horas. A OIE (2012) recomenda os seguintes testes bioquímicos: ágar três açúcares e ferro (TSI – *triple sugar iron*); ágar lisina ferro (LIA); ágar de ureia de acordo com Christensen; meio triptona/triptofano para reação de indol; glicose com tubo de Durham invertido para produção de ácido e gás; dulcitol, maltose, meio de decarboxilação de ornitina e ágar semi-sólido, para motilidade (Tabela 1).

**Tabela 1** – Provas Bioquímicas para *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*

<b>Prova Bioquímica</b>	<b><i>Salmonella Pullorum</i></b>	<b><i>Salmonella Gallinarum</i></b>
TSI glicose	+	+
TSI gás a partir da glicose	v	-
TSI lactose	-	-
TSI sacarose	-	-
TSI sulfeto de hidrogênio	v	v
Hidrólise da uréia	-	-
Descarboxilação de lisina	+	+
Decarboxilação de ornitina	+	-
Fermentação da maltose	- mais tarde +	+
Dulcitol	-	+
Motilidade	-	-

+ = 90% ou mais de reações positivas dentro de 1 ou 2 dias; - = Sem reação (90% ou mais); v = Reações variáveis.

Fonte: Adaptado de OIE (2012)

Métodos moleculares de diagnóstico como a reação em cadeia da polimerase (PCR convencional e em tempo real), têm sido utilizados para a detecção de *Salmonella* spp. e são capazes de detectar e quantificar o patógeno em amostras puras e mistas. Técnicas moleculares padrão de “fingerprinting” usadas para *Salmonella*, tais como análise de perfil plasmídico, eletroforese em gel de campo pulsado, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição por PCR ou ribotipagem, podem ser utilizadas para detectar *S. Pullorum*. Muitas vezes é necessário usar combinações de tais métodos e diferentes combinações de enzimas de restrição para obter a máxima discriminação devido a um elevado nível de clonalidade. As técnicas mais eficazes também podem variar por país devido à natureza dos clones circulantes nessa região (OLIVIERA et al, 2002).

*S. Pullorum* e *S. Gallinarum* são antigenicamente indistinguíveis. A diferenciação é feita por testes bioquímicos, como o teste da descarboxilação da ornitina e fermentação do dulcitol. Porém, existem *S. Pullorum* que não descarboxilam a ornitina, com isso, técnicas moleculares utilizando ribotipagem e PCR foram desenvolvidas, e podem ser usados para confirmação e diferenciação entre esses biovares (KANG et al., 2011; OIE, 2012; BATISTA et al, 2016).

### 2.3.5 Diagnóstico Diferencial

A diferenciação das lesões desencadeadas por *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* é indistinguível. Estas bactérias também são taxonomicamente semelhantes em termos de propriedades antigênicas e bioquímicas. No entanto, o tifo aviário, afeta principalmente aves adultas. Em aves adultas, os nódulos brancos em órgãos internos podem ser confundidos com a doença de Marek e outras enfermidades septicêmicas como paratifo aviário, pasteurelose e colibacilose. As lesões hepáticas podem ser similares com as causadas por *Yersinia pseudotuberculosis*. As lesões do trato respiratório devem ser diferenciadas de aspergilose e as lesões articulares com sinovite e bursite causadas por outras bactérias ou vírus (SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD E BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009).

### 2.3.6. Tratamento, controle e prevenção

Vários antibióticos e quimioterápicos podem ser utilizados para reduzir a mortalidade e a morbidade, por exemplo, sulfas, quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e apramicina. Porém, o tratamento das aves doentes não é viável e nem recomendado. Por mais que ajude a melhorar os sinais clínicos e reduzir a taxa de mortalidade, não elimina totalmente a infecção do lote, permanecendo as aves recuperadas portadoras. O tratamento também pode interferir com o isolamento e o nível da resposta sorológica (SHIVAPRASAD, 2000; CFSPH, 2009; BARROW E FREITAS NETO, 2011).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 78 (BRASIL, 2003), estabelece medidas de monitoramento das salmoneloses em estabelecimentos avícolas de controle permanente e eventual, que realizam o comércio ou a transferência nacional e internacional de seus produtos, destinados à reprodução e à produção de aves e ovos férteis, ficando os mesmos obrigados a realizarem o monitoramento de seus plantéis, obedecendo às diretrizes do Programa Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 1994). Os núcleos dos estabelecimentos de linhas puras, bisavoseiros e avoseiros deverão ser livres de *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Os núcleos dos estabelecimentos matrizeiros deverão ser livres de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e livres e/ou controlados para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (BRASIL, 2003). Devido a sua importância para as aves, a pulorose é uma enfermidade de notificação e sacrifício obrigatórios no Brasil.

Portanto, a erradicação de lotes positivos, associada a medidas gerais de biossegurança, são as melhores formas de controle e prevenção da pulrose. Programas de controle bem sucedidos podem ser alcançados através do desenvolvimento de boas práticas de higiene e manejo, controle de insetos, roedores, pássaros, destino adequado de resíduos e dejetos, juntamente com testes sorológicos de rotina e políticas de abate dos lotes positivos. Uma vez que a transmissão vertical desempenha um papel importante na propagação da doença, o monitoramento de lotes de reprodutoras torna-se fundamental para o controle da doença (SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD E BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009; CFSPPH, 2009).

### **3. RELATO DE CASO**

Em uma propriedade comercial de aves localizada na região metropolitana de Belo Horizonte – MG, ocorreu um surto, com 100% de mortalidade, onde mais de 290 filhotes de galinha d'Angola (*Numida meleagris*) morreram nas duas primeiras semanas de idade. Nesta propriedade, havia criação de outras espécies de aves, incluindo galinhas (*Gallus gallus domesticus*). Em março de 2018, cinco pintinhos de galinha d'Angola da referida propriedade, apresentando sinais clínicos, foram encaminhados ao Setor de Doenças das Aves - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, para a realização do exame clínico, necropsia e exames laboratoriais. O proprietário relatou que por volta de 6 dias de vida, as aves apresentaram dificuldade locomotora, prostração e vieram posteriormente a óbito. As aves não foram vermifugadas. A dieta era oferecida à vontade e consistia de ração inicial para postura, além de verduras e ovos cozidos. Era fornecida água limpa e clorada. As aves eram alojadas em baias com piso de cimento e a limpeza era feita diariamente, sem contato com outras aves da propriedade e de vida livre. Os bebedouros e comedouros eram lavados diariamente. O aquecimento fornecido era com luz infravermelha.

#### **3.1 MATERIAL E MÉTODOS**

##### **3.1.1 Necropsia**

Cinco filhotes de galinha d'Angola apresentando apatia, encorujamento que morreram aos 7 dias de idade foram recebidos no setor de doença das aves. A necropsia foi realizada de maneira asséptica, utilizando-se álcool 70% para a descontaminação da superfície externa e mantendo-se chama acesa na proximidade. Os órgãos foram avaliados em relação ao tamanho, forma, coloração, consistência e textura. O trato digestório foi removido e cortado em toda sua extensão para avaliação da mucosa e do conteúdo interno. Avaliou-se aspectos da natureza, volume, consistência, cor e odor. Foi coletado fragmento de fígado e inoculado em caldo de enriquecimento seletivo Selenito Cistina (OXOID, EUA) para bacteriologia, fragmentos de traqueia, pulmão, timo, coração, fígado, baço e rins, em formol tamponado 10% para histopatologia.

### 3.1.2 Microscopia Direta

Foram realizados claps de pulmão, fígado e rins para posterior coloração com a técnica de Gram. Raspados da mucosa do proventriculo, duodeno, jejuno, íleo e ceco foram feitos em lâminas e lamínulas com PBS, para avaliação em microscopia óptica.

### 3.1.3 Histopatologia

Para a análise histopatológica, fragmentos de traquéia, pulmão, timo, coração, fígado, baço e rins foram fixados em formol tamponado 10% e posteriormente processados. No processamento os tecidos foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizadas em xilol, incluídos em parafina para obtenção de cortes seriados à espessura de 5 µm, corados pela técnica de hematoxilina-eosina e analisados ao microscópio de luz comum.

### 3.1.4 Isolamento Bacteriano

O cultivo bacteriano para isolamento de *Salmonella* foi realizado seguindo as metodologias descritas por Andrews et al. (2011) e Brasil (2003). Amostras de aproximadamente um grama de fragmentos de fígado foram semeadas em 10 mL do meio caldo de enriquecimento seletivo selenito cistina (S-C OXOID, EUA), e incubadas 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. O caldo S-C, após a incubação, foi semeado em ágar MacConkey (MC - OXOID, EUA) e Verde Brilhante (VB OXOID, EUA) e as placas incubadas (37° C) por 24-48 horas. As colônias com morfologia típicas, sugestivas (Lac -, MC e VB) de *Salmonella* foram repicadas em Mueller-Hinton (MH OXOID, EUA), TSI (*Triple Sugar Iron*), meio Rugai modificado por Pessoa e Silva (1972) (IAL- Instituto Adolfo Lutz) para a identificação presuntiva de enterobactérias. A leitura do meio IAL foi realizada com o auxílio de uma tabela de leitura e interpretação do meio. Ambos os meios foram submetidos à incubação em estufa bacteriológica em aerobiose (37°C/24-48h). Foi realizado o teste da catalase, oxidase e avaliação das características morfotintoriais em coloração (Gram). As bactérias, bioquimicamente caracterizadas como *Salmonella* spp. foram semeadas em ágar triptona de soja (TSA - OXOID, EUA), incubadas à 37° C e então submetidas à sorologia com soro polivalente anti-“O” de *Salmonella* spp. (PROBAC).

### 3.1.5 Extração do DNA

O DNA cromossômico bacteriano foi extraído segundo o protocolo publicado por Marmur (1961) com modificações. Os micro-organismos foram inoculados em 10 mL de caldo cérebro-coração (BHI), o qual foi incubado a 37°C sob agitação constante (150 rpm). Um mililitro da cultura foi aliqotado em tubo de plástico (*Eppendorf*) de 2 mL e em seguida centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi vertido e 700 pL do tampão de lise foram adicionados e homogeneizados com auxílio de *vórtex* até que a solução se tornasse homogênea. A solução incubada em banho-maria ou

termobloco a 65°C por 1 h, sendo que a cada 20 minutos era novamente homogeneizada para garantir a lise completa da cultura. Finalizado o tempo, o tubo foi mantido a temperatura ambiente por aproximadamente 20 min e em seguida adicionou-se 350 pL de acetato de potássio (5 M, pH 8,0) gelado (4 °C), agitando-se o conteúdo suavemente por inversão até que a mistura adquirisse um aspecto coagulado e esbranquiçado. Feito isso, o tubo foi imerso em gelo onde permaneceu por 30 min. Passado o tempo de incubação, as amostras foram retiradas do gelo e acrescidas com 700 pL de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (a 4 °C) na proporção de 24:1 (clorofórmio álcool isoamílico). O conteúdo dos tubos foi homogeneizado suavemente por inversão durante 5 min até que a solução apresentasse um aspecto leitoso. Seguiu-se para uma nova centrifugação de 10 min a 12.000 rpm a 4 °C. Terminada a centrifugação, tornou-se visível três fases no material extraído (duas fases líquidas separadas por um coágulo branco) Transferiu-se cuidadosamente apenas o sobrenadante (sem encostar-se ao ou pipetar parte do coágulo) para outro *Eppendorf* de 2 mL. Adicionou-se a essa solução 1 mL de etanol absoluto a 4 °C. O conteúdo foi gentilmente homogeneizado por inversão e incubado a -20 °C por um período mínimo de 30 min (preferivelmente, essa etapa pode chegar a 24 horas). Passado o tempo de incubação, o conteúdo foi novamente agitado por inversão e centrifugado por 15 min a 12.000 rpm a 4 °C. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi vertido e 800 pL de etanol (70%) foram adicionados ao tubo. Imediatamente, o conteúdo foi centrifugado por 15 min a 12.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi novamente vertido e o tubo foi mantido aberto em um local limpo ou em estufa de secagem a 37 °C até que o conteúdo genético precipitado estivesse completamente seco. Para finalizar, adicionou-se 50 pL de tampão Tris-EDTA (TE, pH 8,0) e a ressuspensão do sedimento foi feita com pequenos "petelecos" no tubo.

### 3.1.6 Determinação Espectrofotométrica da Concentração de DNA Total

A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (NanoVue, GE, Healthcare). Este aparelho permite a análise e quantificação de amostras de ácido nucléicos utilizando 2 µL da amostra de interesse, estimando a quantidade de DNA na amostra em ng/µL ou µg/µL e a qualidade do material pelo valor obtido na razão DO<sub>260nm</sub>/DO<sub>280nm</sub>. Os ácidos nucléicos absorvem luz no comprimento de onda de 260nm e as proteínas absorvem luz com comprimento de onda de 280nm.

### 3.1.7 Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR

Dois segmentos de DNA foram selecionados para a reação em cadeia da polimerase (PCR). O primeiro segmento, denominado de região identificadora do sorovar (RIS) é uma região única do sorovar Gallinarum. O fragmento amplificado a partir dessa sequência permite dizer que o DNA testado pertence ao sorovar Gallinarum (sendo do biovar *S. Gallinarum* ou do biovar *S. Pullorum*). O segundo deles se baseia na amplificação do gene *ratA* que diferencia os biovars *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Para amplificação do DNA foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores

descritos por Batista et al. (2016) (Tabela 2). O produto dos oligonucleotídeos RIS (F) + RIS (R) possui tamanho esperado de 543 pb. Enquanto que o *amplicon* gerado pelos oligonucleotídeos *ratA* (F) + *ratA* (R) diferencia os dois biovars. Caso seja de 1047 pb o DNA testado identifica o biovar *S. Gallinarum* e de 243 pb o biovar *S. Pullorum*.

**Tabela 2** – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos fragmentos esperados.

Nome dos Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Fragmento (pb)
RIS (F)	TACGGGACGAGTGGGTACTT	543 pb (em ambas)
RIS (R)	AGATGCCCCACCACTCAAAG	
<i>ratA</i> (F)	GACGTCGCTGCCGTCGTACC	1047 pb ( <i>S. Gallinarum</i> )
<i>ratA</i> (R)	TACAGCGAACATGCGGGCGG	243 pb ( <i>S. Pullorum</i> )

O ensaio de PCR duplex foi estabelecido com volume final de 25µL contendo: 20ng de DNA, tampão 1X (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 100mM KCl – Phoneutria), 240µM de dNTP (Phoneutria), 3,6mM de MgCl<sub>2</sub> (Phoneutria), 0,8µM de cada iniciador, 1,25 Unidade de Taq Polimerase (Taq DNA Polymerase – Phoneutria) e água ultra pura q.s.p. A reação de PCR foi realizada em termociclador (modelo A4 85-264VAC, Nyx Technik, San Diego, California).

As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, seguido por 26 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 seg, anelamento a 63°C por 45 seg e extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 7 min. Foi utilizado como controle positivo, o DNA extraído da colônia de referência *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum estirpe ATCC 9184 e estirpe 287/91 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum estirpe ATCC 9120 e como controle negativo, DNA extraído de fígado de ave SPF (ave livre de patógeno específico) previamente testadas negativas e DNA heterólogo extraído da colônia de referência *Escherichia coli* ATCC 25922.

### 3.1.8 Análise dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese a 4 V / cm por 60 min em um gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio na concentração de 0,6 µg / mL de tampão gel. As imagens foram digitalizadas e analisadas com um software comercial.

### 3.1.9 Antibiograma

O isolado de *Salmonella* foi submetido a testes de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos pelo método de discos de difusão, de acordo com protocolo da *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement* do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). No preparo do inóculo, inicialmente, foi feita uma suspensão bacteriana, utilizando uma cultura recente (máximo 24 horas) em tampão fosfato pH 6,0. A concentração do inóculo foi padronizada, comparando a turbidez do inóculo com o padrão 0,5 da escala de MacFarland em espectrofotômetro (625 nm). Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10, o que equivale a 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL (NCCLS, 2003). As colônias foram plaqueadas utilizando o meio padrão ágar Müller Hinton (Kasvi, , São José do Pinhais, PR, Brasil). Os discos com antimicrobianos (OXOID, Reino Unido) testados foram amoxicilina com ácido clavulânico, amicacina, ampicilina, neomicina, sulfametoxazol + trimetoprima, enrofloxacina, eritromicina, cefalotina, fosfomicina, tetraciclina e ceftiofur. Após 48h de incubação a 37°C os diâmetros dos halos de inibição foram aferidos com régua milimetrada. *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi utilizada como controle de qualidade.

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 Necropsia

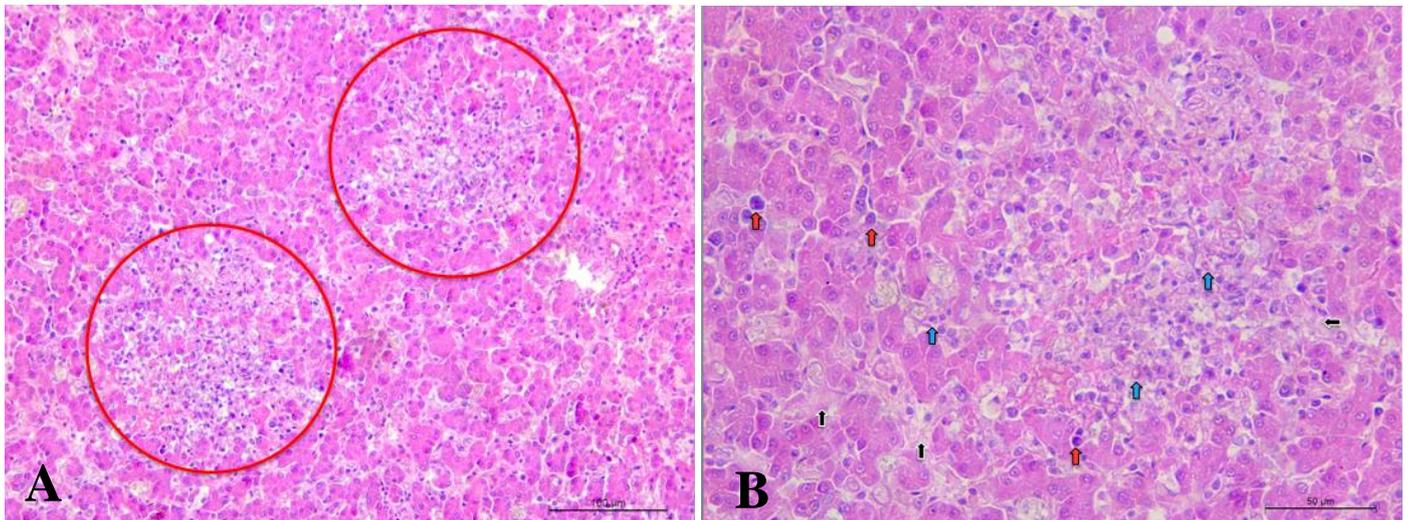
Macroscopicamente, todas as aves (n=5) apresentaram lesões similares. Na avaliação externa foram observadas fezes aderidas à cloaca e patas. As aves estavam com baixo escore corporal, considerando como referência a massa muscular peitoral. Ao rebater a pele, o músculo peitoral estava atrofiado e pálido. Foi observada a presença de muco no lúmen traqueal. Ao abrir a cavidade celomática, o fígado apresentava-se aumentado de tamanho com áreas milimétricas multifocais a coalescentes amareladas e vesícula biliar repleta. Os sacos aéreos estavam levemente opacos e os pulmões congestos. Havia aumento do tamanho do baço e rins, com petéquias e palidez. Na avaliação do trato gastrointestinal, o papo estava cheio de ração, a membrana coelina com fácil desprendimento e foi observado congestão de todos os segmentos do intestino delgado e grosso.

### 3.2.2 Microscopia Direta

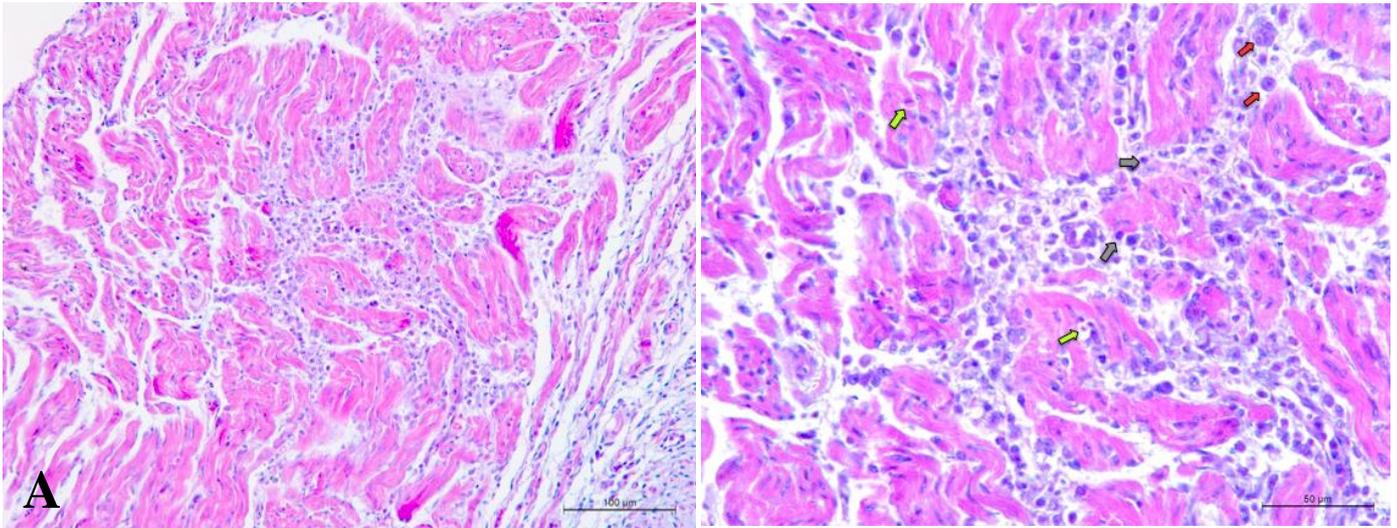
A microscopia óptica direta do material coletado do pulmão, fígado e rins corados pelo método de Gram, evidenciou através das características morfotintórias a presença de pequenos bastonetes gram negativos (aumento de 1000x). Na visualização direta em microscopia óptica (aumentos de 50x, 100x e 400x) dos segmentos do trato gastrointestinal, não foram observadas estruturas de parasitos.

### 3.2.3 Histopatologia

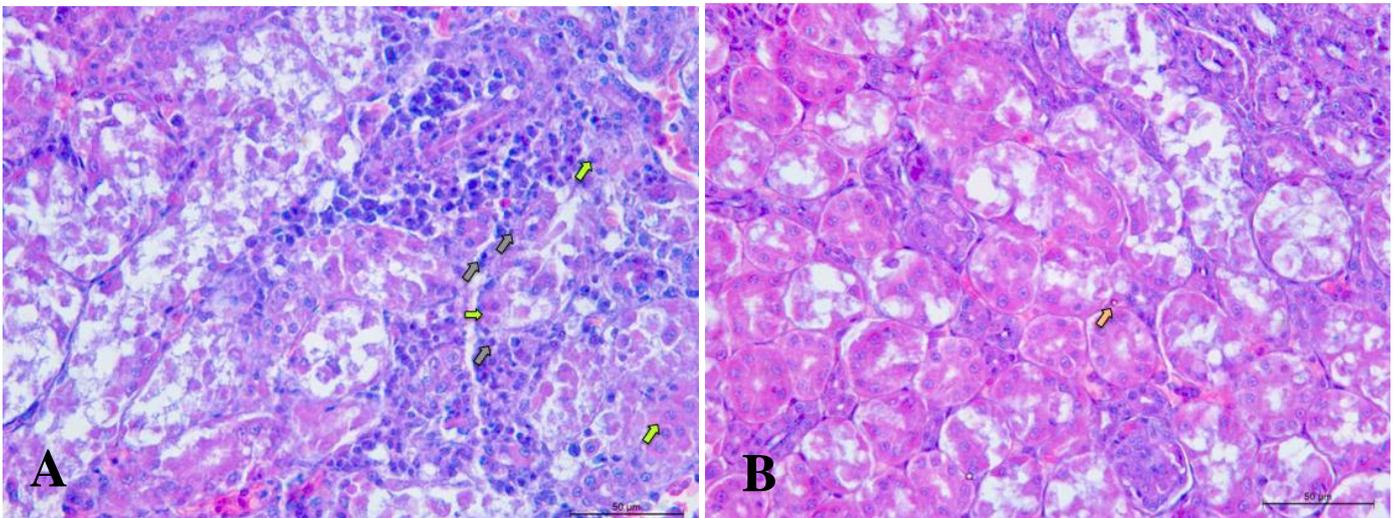
Foram observados no exame histopatológico, múltiplos nódulos paratifoideais aleatórios caracterizados por áreas de necrose com fibrina e infiltrado moderado de macrófagos e heterófilos no fígado (Figura 1). No espaço porta o tecido linfoide estava reativo. No coração havia infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos multifocais discretos a acentuados se estendendo do epicárdio ao miocárdio (Figura 2). Nos rins haviam áreas multifocais discretas de necrose associada a infiltrado multifocal moderado de linfócitos e plasmócitos. Raros túbulos continham no lúmen material semelhante a cristais de urato (Figura 3). No parênquima pulmonar havia numerosos macrófagos e plasmócitos multifocais a coalescentes (Figura 4). Plasmocitose moderada e quantidade moderada de macrófagos estavam presentes no baço (Figura 5). Não foram observados alterações na traqueia e timo.



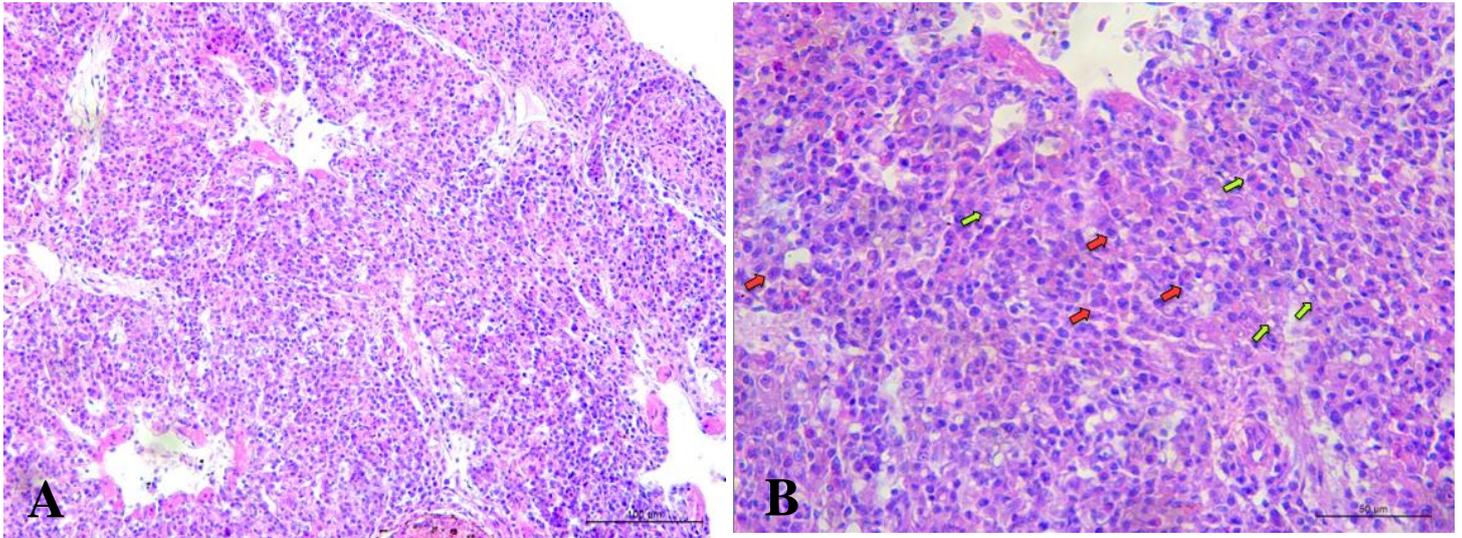
**Figura 1.** Galinha de Angola (*Numida meleagris*). Fotomicrografia do fígado corada por HE. A (100X): múltiplos nódulos paratifoideais aleatórios (circulo vermelho). B (400X): áreas de necrose com fibrina (seta preta) e infiltrado moderado de macrófago (seta vermelha) e heterófilos (seta azul).



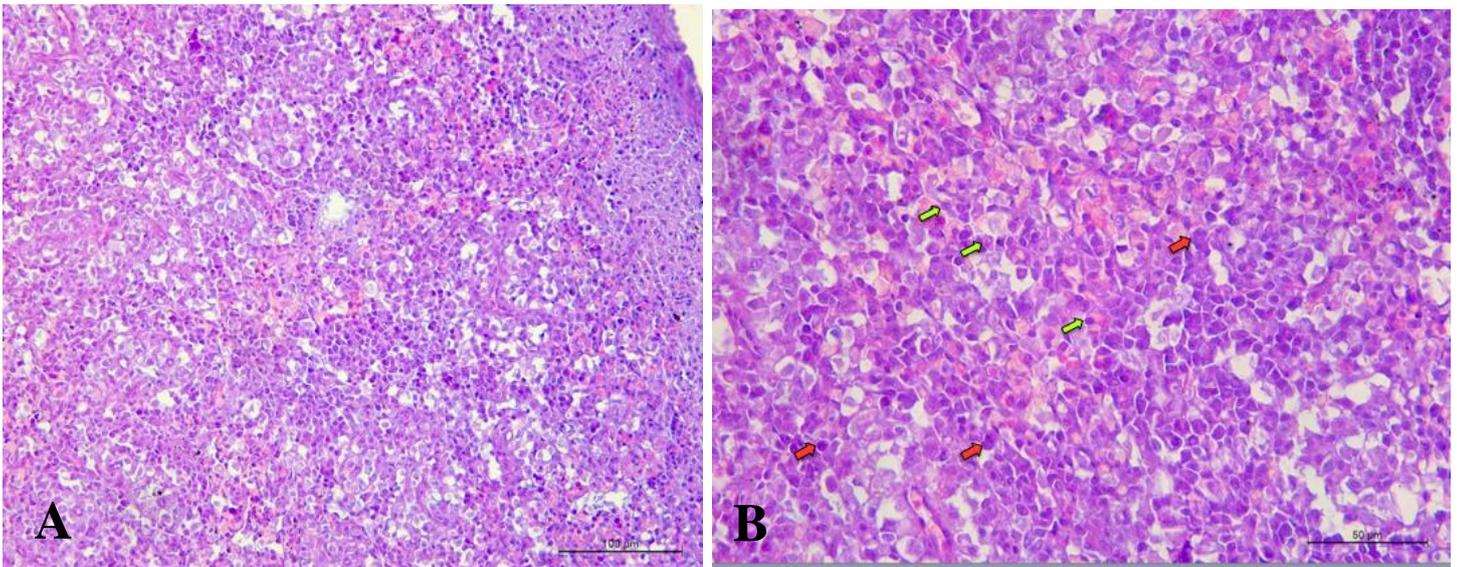
**Figura 2.** Galinha de Angola (*Numida meleagris*). Fotomicrografia do coração corada por HE. A (100X) e B (400X): infiltrado de linfócito (seta cinza), plasmócito (seta verde) e macrófago (seta vermelha) multifocais discretos e acentuados se estendendo do epicárdio ao miocárdio.



**Figura 3.** Galinha de Angola (*Numida meleagris*). Fotomicrografia do rim corada por HE. A (400X): infiltrado multifocal moderado de linfócito (seta cinza) e plasmócitos (seta verde). B (400X): cristais de urato (seta laranja).



**Figura 4.** Galinha de Angola (*Numida meleagris*). Fotomicrografia do pulmão corada por HE. A (100X) e B (400X): numerosos macrófagos (seta vermelha) e plasmócitos multifocais a coalescentes (seta verde).



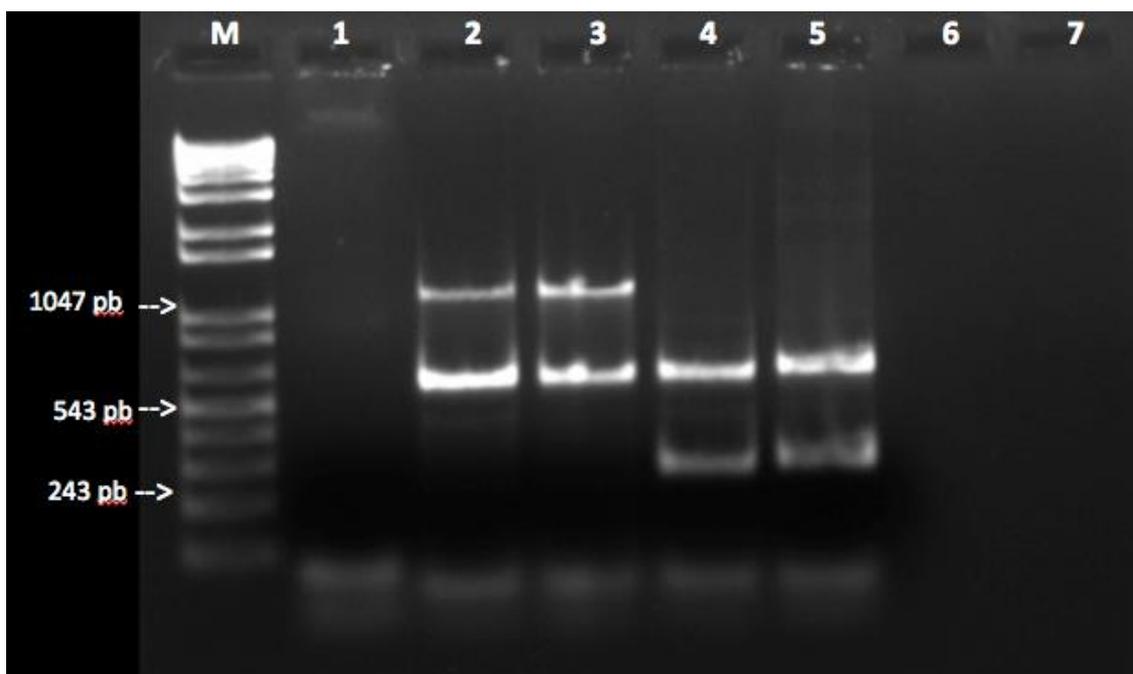
**Figura 5.** Galinha de Angola (*Numida meleagris*). Fotomicrografia do baço corada em HE. A (100X) e B (400X): plasmocitose moderada (seta verde) e quantidade moderada de macrófagos (seta vermelha).

### 3.2.4 Isolamento Bacteriano

As colônias obtidas em ágar MC e no ágar VB eram de bactérias incapazes de fermentar a lactose e sacarose, e foram identificadas presuntivamente para *Salmonella* spp., após a interpretação do meio IAL, onde apresentaram indol, LTD, sacarose, uréia, H<sub>2</sub>S e motilidade negativa e glicose, gás e lisina positiva. No meio TSI, a glicose foi positiva e a produção de H<sub>2</sub>S, sacarose e lactose negativa. Em ágar MH houve crescimento de UFCs, que posteriormente foram feitas as provas de catalase, que foi detectado a formação de bolhas indicando que a bactéria possui a enzima catalase; oxidase revelou ausência de coloração rosa indicando que a bactéria não possui a enzima citocromo-oxidase; avaliação das características morfotintoriais do Gram que foi observado pequenos bacilos Gram negativos. As colônias sugestivas de *Salmonella* spp. foram submetidas ao diagnóstico antigênico, por detecção dos antígenos somáticos e foram identificadas como *Salmonella* spp.

### 3.2.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Na PCR, as amostras geraram um produto de 243 pb (*ratA*) e 543 pb (RIS), correspondente à massa molecular esperada para *Salmonella Pullorum* (Figura 6).



**Figura 6.** Imagem de gel de eletroforese apresentando a combinação de fragmentos obtidos após a aplicação da PCR duplex. M: marcador de massa molecular em escada de 100 bases nucleotídicas; 1: controle negativo sem DNA bacteriano como molde; 2: *S. Gallinarum* estirpe ATCC 9184; 3: *S. Gallinarum* estirpe 287/91; 4: *S. Pullorum* estirpe ATCC 9120; 5: colônia de *Salmonella* spp. isolada no presente trabalho 6: *Escherichia coli* estirpe ATCC 25922; 7: controle negativo.

### 3.2.6 Antibiograma

O isolado de *Salmonella enterica* subspécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum apresentou sensibilidade à amoxicilina com ácido clavulânico, amicacina, ampicilina, neomicina, enrofloxacina, eritromicina, cefalotina, fosfomicina, tetraciclina e ceftiofur, e resistência apenas a sulfametoxazol + trimetoprima.

## 4. DISCUSSÃO

No Brasil, a criação de galinha d'Angola (*Numida meleagris*) vem crescendo e tornando-se parte importante da agricultura rural, tanto para consumo próprio como para o comércio. A capacidade produtiva associada as alternativas empreendedoras que a avicultura oferece, possibilitou a criação de outras espécies de aves nas granjas, sítios e propriedades que exploram industrialmente tal segmento. Acompanhando esta tendência é fundamental a implementação de programas de biossegurança para prevenir problemas sanitários na criação.

*S. Pullorum* é altamente adaptado às galinhas e tem sido relatado em todo o mundo, causando grandes perdas econômicas para a avicultura comercial como consequência de altas taxas de morbidade e mortalidade de pintos durante os primeiros dias de vida (SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD E BARROW, 2008). No passado, a *S. Pullorum* estava amplamente disseminada, mas atualmente a doença está erradicada em plantéis de avós, matrizes e aves comerciais em países desenvolvidos. Segundo Shivaprasad (2000) outras espécies podem ser acometidas, como perus, faisões, codornas, galinha d'Angola, patos, marrecos, pombos, pardais, canários, dom-fafe e papagaios. Porém, a susceptibilidade à doença pode ser variável entre as espécies aviárias, sendo certas espécies mais resistentes a pulorose do que outras e podem desempenhar um papel significativo na epizootologia da doença. Hofer et al (1997) caracterizaram antígenicamente amostras de *Salmonella* isoladas de galinhas, perus, patos, marrecos, codornas, pombos e pássaros silvestres e encontraram *S. Pullorum* em aves saudáveis e doentes.

O presente estudo demonstrou que *S. Pullorum* pode causar bacteremia e colonizar diversos órgãos causando lesões. Os sinais clínicos relatados, incluíram dificuldade locomotora, prostração, seguida do óbito em menos de 24 horas. Os achados clínicos apresentados pelas angolas, foram mais brandos do que os encontrados por Haider et al (2008), Haider et al (2012) e Haider et al (2013) em infecção experimental em galinhas adultas, onde foi observado perda de apetite, depressão, sonolência, perda de peso, penas eriçadas, dificuldade respiratória, diarreia e fezes aderidas a cloaca. Buchholza e Fairbrother (1992) em inoculação experimental observaram prostração, asas caídas, penas eriçadas, perda de peso e diarreia branca em Perdiz da Virgínia (*Colinus virginianus*) e não observaram nenhuma alteração clínica em pato-real (*Anas platyrhynchos*). Bessin et al (1998) observaram que em quadros agudos de salmonelose, as galinhas d'Angola apresentaram prostração, sonolência, diarreia e evolução para

óbito em 24 horas, enquanto que em casos crônicos, os autores observaram vocalização, dificuldade respiratória, desidratação, cerotoconjutivite uni ou bilateral, paralisia evoluindo para o óbito em 48-72 horas. Quadro semelhante foi encontrado por Boko et al (2011a) e Boko et al (2011b), que observaram perda de apetite, prostração, sonolência, diarreia esbranquiçada, desidratação com morte 24-48 horas em infecção natural e experimental por *Salmonella* spp. em filhotes de galinha d'Angola. Filhotes de faisão com 5-6 dias, apresentaram apatia, asas caídas, penas eriçadas, mas não apresentaram diarreia (PENNYCOTT E DUNCAN, 1999). Não houve relato pela proprietária de diarreia nas angolas, porém, foi observado fezes emplastadas na cloaca no momento da necropsia o que torna-se indicativo de uma possível diarreia.

No presente estudo houve 100% de morbidade e mortalidade no plantel de galinhas d'Angola estudado, o que difere do encontrado por Haider et al (2008) e Haider (2012) que observaram 8% de mortalidade 7 dias após a infecção experimental em galinhas com 14 semanas e Haider et al (2013) que observaram 90% de morbidade e nenhuma mortalidade em galinhas com 18 e 26 semanas de idade. Roy et al (2001), após inoculação de *S. Pullorum* em pintos de 1 dia, observaram 66,66% de mortalidade aos 7 dias pós inoculação. Em outro estudo, realizado em Perdiz da Virgínia, Buchholza e Fairbrother (1992) observaram mortalidade de 75% e 65% aos 6 dias pós inoculação, quando inoculadas com *S. Pullorum* por via endovenosa e oral, respectivamente. Enquanto que no pato-real, não houve registro de nenhuma mortalidade. Resultado semelhante foi observado por Chute e Gershman (1962) que não diagnosticaram mortalidade em patos da Moscóvia portadores de *S. Pullorum*. Em outro estudo, Pennycott e Duncan (1999) observaram mortalidade de 50% em filhotes de faisões com pulorose. Boko et al (2011a), observaram uma taxa de mortalidade de 70% em filhotes e 12% em adultos de galinha d'Angola diagnosticadas com salmonelose (*Salmonella* sp.). Li et al (2018), inocularam *S. Pullorum* em pintos de três diferentes linhagens com 4 dias de idade e observaram que a taxa de mortalidade diferiu entre as linhagens, sendo de 25,1%, 22,5% e 8,3%. As variações nas taxas de mortalidade em aves de diferentes linhagens está relacionada a resistência de cada uma delas às infecções bacterianas sistêmicas. De acordo com Wigley et al (2002), a resistência das aves às salmoneloses sistêmicas estaria relacionada com o sistema fagocitário mononuclear. Macrófagos oriundos de linhagens de aves resistentes a infecções bacterianas sistêmicas, como as linhagens leves, têm maior capacidade de destruir *Salmonella* spp., por produzirem maiores quantidades de radicais reativos de oxigênio gerados pela enzima NADPH-oxidase. Estes são também capazes de produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias mais rapidamente e em maior quantidade que aqueles provenientes de aves susceptíveis (WIGLEY et al, 2002; WIGLEY et al, 2006). No entanto, em galinhas d'Angola pouco ou nada se sabe a respeito.

Dentre os achados macroscópicos, o fígado apresentava-se aumentado com focos necróticos, o baço e rins estavam aumentados com petéquias e palidez e congestão dos pulmões e de todos os segmentos do intestino delgado e grosso. Esses achados

macroscópicos foram semelhante aos encontrados por Bessin et al (1998), Boko et al (2011a) e Boko et al (2011b) em galinhas d'Angola, Buchholza e Fairbrother (1992), em Perdiz da Virgínia, Pennycott e Duncan (1999) em filhote de faisão e por Roy et al (2001), Habib-Ur-Rehman et al. (2003), Anderson et al (2006); Hossain et al (2006), Haider et al (2008), Haider et al (2012) Saha et al (2012), Haider et al (2013) e Li et al (2018) em galinhas. Os autores relataram outras alterações como inflamação do proventriculo e moela, pancreatite, pericardite com nódulos e aderência, atrofia da bolsa cloacal e cerotoconjuntivite (BESSIN et al, 1998). Buchholza e Fairbrother (1992), em Perdiz da Virgínia, observaram focos necróticos e hemorragias petequiais nos pulmões e palidez do fígado. Pennycott e Duncan (1999), Boko et al (2011a) e Boko et al (2011b) não encontraram nódulos no coração, rins e baço o que corrobora com os achados deste estudo, mas observaram retenção do saco da gema com material caseoso, onfalite e menos frequente cerotoconjuntivite. Roy et al (2001), Habib-Ur-Rehman et al. (2003), Hossain et al (2006), Haider et al (2008), Haider et al (2012) Saha et al (2012), Haider et al (2013) encontraram fígado e pulmões hemorrágicos, bronquite catarral, pericardite, miocardite com focos necróticos no coração, enterite hemorrágica e ceco com presença de material caseoso e em alguns casos hemorrágico em galinhas com pulorose.

No exame histopatológico, foram encontrados, múltiplos nódulos paratifoideais aleatórios caracterizados por áreas de necrose com fibrina e infiltrado moderado de macrófagos e heterofilos no fígado, compatíveis com os encontrados por outros autores (PENNYCOTT E DUNCAN, 1999; ROY et al, 2001; HABIB-UR-REHMAN et al, 2003; ANDERSON et al, 2006; HOSSAIN et al, 2006; HAIDER et al, 2012; SAHA et al, 2012; HAIDER et al, 2013). No coração havia infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos multifocais discretos a acentuados se estendendo do epicárdico ao miocárdio. Roy et al (2001), Haider et al (2008), Haider et al (2012) e Haider et al (2013) encontraram infiltrado de heterofilos, linfócitos e macrófagos no miocárdio e pericárdio. No parênquima pulmonar havia numerosos macrófagos e plasmócitos multifocais a coalescentes. Roy et al (2001) encontraram infiltrado de linfócitos no parênquima pulmonar. Haider et al (2008), Haider et al (2012) e Saha et al (2012) em infecção experimental observou pneumonia com infiltrado de neutrófilos e broncopneumonia com infiltrado de heterofilos e células mononucleares no brônquio de galinhas infectadas com *S. Pullorum*. Haider et al (2013) também encontraram pneumonia e broncopneumonia com infiltrado de heterofilo, linfócito e células mononucleares nos alvéolos pulmonares e na parede dos brônquios. Nos rins haviam áreas multifocais discretas de necrose associada a infiltrado multifocal moderado de linfócitos e plasmócitos. Haider et al (2008) e Haider et al (2013) encontraram rins congestos com infiltrado de heterofilos e linfócitos. Plasmocitose moderada e quantidade moderada de macrófagos estavam presentes no baço. Haider et al (2008) encontraram congestão do baço com hiperplasia de células reticulo endoteliais e necrose linfocítica. Enquanto que Haider et al (2012) encontraram necrose focal com fibrina e presença de infiltrado de células inflamatórias no baço. Haider et al (2013) observaram necrose focal das células reticulo endoteliais com infiltrado de heterofilos. Os achados

histopatológicos deste estudo foram semelhantes aos encontrados por Buchholza e Fairbrother (1992) em Perdiz da Virgínia.

Relatos da ocorrência de *Salmonella* em galinhas d'Angola são escassos na literatura. Um estudo realizado por Boko et al (2013), demonstraram a ocorrência de salmonelose em filhotes de galinhas d'Angola, sendo os sorovares *S. Adelaide*, *S. Farakan*, *S. Kingston*, *S. Legon*, *S. Luke*, *S. Oakland*, *S. Sangalkam* e *S. Teshie* isolados do cecos e fígados de aves que apresentavam sinais clínicos, semelhantes aos da pulorose. No entanto, os autores não isolaram *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* de nenhuma ave. Kilonzo-Nthenge et al (2008), isolaram *Salmonella* spp. de galinhas d'Angola sem sinais clínicos. Em outro estudo, McCrea et al (2006) não obtiveram resultados positivos no isolamento de *Salmonella* spp. em galinhas d'Angola e codornas, isolaram apenas de pombos e galinhas. Enquanto que Bessin et al. (1998) isolaram *Salmonella* spp. de fígado, coração, pulmão, baço e rins de 23% de filhotes de galinha d'Angola de 0 a 3 meses. Johnson e Anderson (1933) isolaram *S. Gallinarum* de galinhas d'Angola no qual aproximadamente 30% das aves morreram, mas não foi isolado *S. Pullorum*. Chute e Gershman (1962) isolaram *S. Pullorum* de patos assintomáticos e Pennycott e Duncan (1999) isolaram de filhotes de faisões que apresentaram a sintomatologia clínica.

Os padrões de susceptibilidade antimicrobiana identificados no presente estudo demonstraram que o isolado de *S. Pullorum* é sensível a diversos fármacos, mostrando resistência apenas para a associação entre sulfametoxazol e trimetoprima. Os dados encontrados por Penha Filho et al (2016) não corroboram com os encontrados nesse estudo. Os autores testaram a susceptibilidade de isolados de *S. Pullorum* coletados de 1987 a 2013 à agentes antimicrobianos utilizados frequentemente em granjas avícola. Todos os isolados de *S. Pullorum* apresentaram suscetibilidade à amoxicilina / ácido clavulânico, cefotaxima, ceftazidima, ceftiofur, cefepima, azitromicina, ertapenem, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol e florfenicol. No entanto, entre estes isolados, a sensibilidade a outros não-beta-lactâmicos foi de 65% para ácido nalidíxico, 71% ciprofloxacina, 94% enrofloxacina e 94% tetraciclina. Anderson et al (2006) observaram que *Salmonella Pullorum* apresentou resistência a lindomicina, eritromicina, novobiocina, penicilina, estreptomomicina e tilosina, sendo sensível a gentamicina, neomicina, oxitetraciclina, espectinomicina, sulfadimetoxina e tetraciclina. Em outro estudo, Khan et al 2014 observaram que penicilina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e nitrofurantoína, apresentaram resistência completa contra *S. Pullorum*. Enquanto que gentamicina, ácido nalidíxico e as fluoroquinolonas apresentaram maior sensibilidade contra *S. Pullorum*. Um estudo avaliou mudanças nos padrões de resistência a antibióticos de estirpes de *S. Pullorum* isoladas entre 1962 e 2007 de frangos doentes na China, onde foram encontrados altos níveis de resistência de *S. Pullorum* à ampicilina, carbenicilina, estreptomomicina, tetraciclina, trimetoprim e sulfafurazole (PAN et al., 2009).

Embora haja relatos na literatura da ocorrência de pulorose em galinha d'Angola (SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD E BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR

E FREITAS NETO, 2009; CFSPH, 2009), não existem ainda estudos avaliando a susceptibilidade de diferentes linhagens e a manifestação clínica da doença nessa espécie. Os achados do presente trabalho, associado a relativa escassez de informações de pulorose em galinhas d'Angola e outras espécies aviárias, mostra a necessidade de mais estudos para elucidar o papel das espécies aviárias como portadoras de *S. Pullorum* e seu potencial de transmissão a outras espécies mais suscetíveis, além de apresentar um risco para a avicultura comercial.

## 5. CONCLUSÃO

Nas condições em que o presente estudo foi realizado, pode-se concluir que *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum é patogênica para filhotes de galinhas d'Angola (*Numida meleagris*) e capaz de provocar morbidade e mortalidade e alterações macro e microscópicas em órgãos, semelhantes às descritas em pintinhos de algumas linhagens de *Gallus gallus domesticus*. Possivelmente, esse é o primeiro relato científico de pulorose nessa espécie.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L. A.; MILLER, D. A.; TRAMPEL, D. W. Epidemiological Investigation, Cleanup, and Eradication of Pullorum Disease in Adult Chickens and Ducks in Two Small-Farm Flocks. *Avian Diseases*, v. 50, n. 1, p. 142-147, 2006.
- ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. Chapter 5 *Salmonella*. In: U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION. Bacteriological Analytical Manual on line. FDA/CFSAN. November 2011 Version. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 07 jun. 2018.
- AYENI, J.S.O. The biology and utilization of the helmeted guinea fowl (*N.m. galeata pallas*) in Nigeria. Ph.D. Thesis, University of Ibadan, Nigeria. 1980.
- BARROW, P. A.; HUGGINS, M. B.; LOVELL, M. A. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infection and immunity*, Washington, v.62, n.10, p.4602-4610, 1994.
- 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.
- BATISTA, D. F. A; FREITAS NETO, O. C.; ALMEIDA, A. M.; BARROW, P. A.; BARBOSA, F. O; BERCHIERI JUNIOR, A. Molecular identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by a duplex PCR assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 28, n. 4, p. 419-422, 2016.
- BERCHIERI JÚNIOR, A; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. et al. Doenças das aves. Campinas: FACTA, 2009. p. 435-454.
- BERCHIERI JÚNIOR, 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*, v. 30, n. 3, p. 221-231, 2001.
- BERHE, N.; AFERA, B.; ABEBE, N.; TESFAYA, A; KALAYOU, S. Seroprevalence of *Salmonella pullorum* infection in local and exotic commercial chicken from Mekelle areas, northern Ethiopia. *Revista Electronica de Veterinaria*, v. 13, n. 9, 2012.
- BESSIN, R.; BELEM, A. M. G.; BOUSSINI, H.; COMPAORE, Z.; KABORET, Y.

Enquête sur les causes de mortalité des pintadeaux au Burkina Faso. Revue Élev. Méd. vét. Pays trop., v. 51, n. 1, p. 87-93, 1998.

BLAXLAND, J. D.; SOJKA, W. J.; SMITHER, A. M. A study of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* strains isolated from field outbreaks of disease. J. comp. Pathol, v. 66, p. 270-277, 1956.

BOKO, C. K.; KPODEKON, T. M.; DUPREZ, J. N. I.; IMBERECHTS, H.; TAMINIAU, B.; BERTRAND, S.; MAINIL, J. G. Identification and typing of *Salmonella enterica* serotypes isolated from guinea fowl (*Numida meleagris*) farms in Benin during four laying seasons (2007 to 2010). Avian Pathology, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2013.

BOKO, C. K.; KPODEKON, M. T.; FAROUGOU, S.; DAHOUDA, M.; YOUSAO, A. K. I.; APLOGAN, G. L.; ZANO, J.; MAINIL, J. G. Farmer perceptions and pathological constraints in helmeted guinea fowl farming in the Borgou department in North-East Benin. African Journal of Agricultural Research, v. 6, n. 10, p. 2348-2357, 2011a.

BOKO, C. K.; KPODEKON, M. T.; FAROUGOU, S.; YOUSAO, A. K. I.; MAINIL, J. G. *In vivo* assessment of the virulence of five *Salmonella enterica* serotypes isolated from helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) in Benin. International Research Journal of Microbiology, v. 2, n. 9, p. 356-364, 2011b.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal Clinical Microbiology, v. 37, p. 615– 619, 1990.

BRASIL. Instrução Normativa SDA No. 78, de 03 de novembro de 2003 Anexo Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum* e livres ou controlados para *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 3, 5 nov. 2003. Seção 1. 9 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Relatório do Monitoramento da Prevalência e do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas Isolados de Carcaças de Frango Congeladas Comercializadas no Brasil. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Brasília, jan. 2008. 186p.

BRASIL. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Portaria 193. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília – DF, 1994.

BROOKS, B.W.; PERRY, M. B.; LUTZE-WALLACE, C. L.; MACLEAN, L. L.

Structural characterization and serological specificities of lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum standard, intermediate and variant antigenic type strains. *Vet. Microbiol*, v.126, n. 4, p. 334–344, 2008.

BUCHHOLZA, P. S.; FAIRBROTHER, A. Pathogenicity of *Salmonella* Pullorum in Northern Bobwhite Quail and Mallard Ducks. *Avian Diseases*, v. 36, p. 304-312, 1992.

BULLIS K. The history of avian medicine in the U.S. II: Pullorum disease and fowl typhoid. *Avian Dis*, v. 21, p. 422-435, 1977.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Reports of Selected *Salmonella* Outbreak Investigations.  
<<https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>>. Acesso em: 23 jun 2018.

CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. CFSPH, 2009. Fowl Typhoid and Pullorum Disease. Iowa State University College of Veterinary Medicine, pp: 2-4.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P. A.; 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.

CHEMINAY, C.; MOHLENBRINK, A.; HENSEL, M. Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), Bethesda, v.174, n.49, p.2892-2899, 2005.

CHRISTENSEN, J. P.; OLSEN, J. E.; HANSEN, H. C.; BISGAARD, M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* biovars gallinarum and pullorum by plasmid profiling and biochemical analysis. *Avian Pathol.*, v. 2, n. 1, p. 461-470, 1992.

CHUTE, H. L.; GERSHMAN, M. Case Report: *Salmonella pullorum* in a Muscovy (*Cairina moschata*) Duck. *Avian Diseases*, v. 7, n. 2, p. 168-169, 1962.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth Information Supplement. Wayne CLSI; 2010.

FOLEY, S. L.; JOHNSON, T. J.; RICKE, S. C.; et al. *Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 77, n. 4, p. 582-606, 2013.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T. J. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella enteritidis*. *FEMS*

33. Microbiology Reviews, v.33, n. 4, p.718-738, 2009.

GAST, R. K.; GURAYA, R.; GUARD, J.; et al. Multiplication of *Salmonella* Enteritidis in egg yolks after inoculation outside on and inside vitelline membranes and storage at different temperatures. Journal of Food Protection, v. 73, n. 10, p. 1902-1906, 2010.

GEWIRTZ, A. T.; NAVA, T. A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P. J.; MADERA, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR-5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. Journal of immunology (Baltimore, Md.1950), Bethesda, v.167, n.4, p.1882-1885, 2001.

GEWIRTZ, A. T.; RAO, A. S.; SIMON, P. O. JR.; MERLIN, D.; CARNES, D.; MADARA, J. L.; NEISH, A. S. *Salmonella typhimurium* induces epithelial IL-8 expression via Ca<sup>2+</sup> - mediated activation of the NF-κB pathway. The Journal of clinical investigation, Ann Arbor, v.105, n.1, p.79-92, 2000.

GRIMONT, P. A. D; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9. ed. Paris: World Health Organization, Institut Pasteur, 2007.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research in Microbiology, v.161, p.26-29, 2010.

HABIB-UR-REHMAN, S.; SIRZANIN; HAMAYUN, K.; SALEEM, K.; NAZIR, A.; BHATTI, W. M. Incidence and gross pathology of Salmonellosis in chicken in Hyderabad. J. Asso.Vet. Advances, v. 2, p. 581-584, 2003.

HAIDER, M. G.; CHOWDHURY, E. H.; AHMED, A. K. M.; HOSSAIN, M. Experimental pathogenesis of pullorum disease (pd) in chickens by local isolate of *Salmonella* Pullorum in bangladesh. J. Bangladesh Agril. Univ., v. 10, n. 1, p. 87-94, 2012.

HAIDER, M. G.; CHOWDHURY, E. H.; HOSSAIN, M. Mode of vertical transmission of salmonella *entérica sub. Enterica serovar pullorum* in chickens. African Journal of Microbiology Research, v. 8, n. 12, p. 1344-1351, 2014.

HAIDER, M. G.; CHOWDHURY, E. H.; KHAN, M. A. H. N. A.; HOSSAIN, M. T.; RAHMAN, M. S.; SONG, H. J.; HOSSAIN, M. M. Experimental pathogenesis of pullorum disease with local isolate of *Salmonella enterica* serovar. *enterica* subspecies Pullorum in pullets in Bangladesh. Korean Journal of Poultry Science, v. 35, n. 4, p. 341-350, 2008.

HAIDER, M. G.; CHOWDHURY, E. H.; SHARIF, S. M. K.; HOSSAIN, M.

- Pathogenesis of pullorum disease (pd) in chickens by local isolate of *salmonella pullorum* in bangladesh. SAARC Journal of Agriculture, v. 11, n. 2, p. 01-16, 2013.
- HENSEL, M. Salmonella pathogenicity island 2. Molecular Microbiology, Oxford, v.36, n.5, p.1015-1023, 2000.
- HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência De Sorovares de *Salmonella* Isolados de Aves no Brasil. Pesq. Vet. Bras., v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 784p.
- HOLT, P.S.; CHAUBAL, L.H. Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. J. Clin. Microbiol, v. 35, p. 1016–1020, 1997.
- HOQUE, M. M.; BISWAS, H. R.; RAHMAN, L. Identification and production of *Salmonella Pullorum* coloured antigen in Bangladesh for the rapid whole blood test. AJAS, v. 10, n. 1, p. 141-146, 1997.
- HOSSAIN, M. S.; CHOWDHURY, E. H.; ISLAM, M. M.; HAIDER, M. G.; HOSSAIN, M. M. AVIAN SALMONELLA INFECTION: ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ORGANISMS AND HISTOPATHOLOGICAL STUDY. Bangl. J. Vet. Med., v. 4, n. 1, p. 07–12, 2006.
- HUTT, F. B.; SCHOLE, J. C. Genetics of the fowl XIII: breed differences in susceptibility to *Salmonella Pullorum*. Poult. Sci., v. 20, p. 342-352, 1941.
- IKANI, E. I.; DAFWANG, I. I. The production of Guinea fowl in Nigeria. Extension Bulletin No. 207. Poultry Series, n. 8. 2004. Disponível em: <<http://www.naerls.gov.ng/extmat/bulletins/Guineafowl.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2018.
- IQBAL, M.; PHILBIN, V. J.; WITHANAGE, G. S.; WIGLEY, P.; BEAL, R. K.; GOODCHILD, M. J.; BARROW, P.; MCCONNELL, I.; MASKELL, D. J.; YOUNG, J.; BUMSTEAD, N.; BOYD, Y.; SMITH, A. L. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Infection and immunity**, Washington, v.73, n.4, p.2344-50, 2005.
- ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F. X. Supplement 2008e2010 (no. 48) to the WhiteeKauffmanneLe Minor scheme. Research in Microbiology, v. 165, p. 526-530, 2014.

JOHNSON, E. P; ANDERSON, G. W. An outbreak of fowl typhoid in guinea fowls. Jour. Am. Vet. Med. Assoc., v. 82, p. 258-259, 1933.

JONES, M.A.; HULME, S. D.; BARROW, P. A.; WIGLEY, P. The Salmonella pathogenicity island 1 and Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of Salmonella enteric serovar Typhimurium in the chicken. Avian pathology: journal of the W.V.P.A, Londres, v.36, n.3, p.199-203, 2007.

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, 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.12, p.3217-3226, 2000.

KANG, M. S.; KWON, Y. K.; JUNG, B. Y.; KIM, A.; LEE, K. M.; AN, B. K.; SONG, E. A.; KWON, J. H.; CHUNG, G. S. Differential identification of Salmonella enterica subsp enterica serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of glgC and speC genes. Vet. Microbiol., v. 147, n. 1, p. 181–185, 2011.

KHAN, A.; MAHMOOD, M. S.; HUSSAIN, I.; SIDDIQUE, F.; RAFIQUE, A.; IQBAL, A.; ABBAS, R. Bacteriological and Epidemiological Investigations 30. of Pullorum Disease in Selected Poultry Farms of Faisalabad, Pakistan. Global Veterinaria, v. 12, n. 4, p. 455-460, 2014.

KILONZO-NTHENGE, A.; NAHASHON, S. N.; CHEN, F.; ADEFOPE, N. Pathogenic Bacteria in Chicken and Guinea Fowl. Poultry Science, v. 87, p. 1841–1848, 2008.

LI, X.; NIE, C.; ZHANG, Z.; WANG, Q.; SHAO, P.; ZHAO, Q.; CHEN, Y.; WANG, D.; LI, Y.; JIAO, W.; LI, L.; QIN, S.; HE, L.; JIA, Y.; NING, Z.; QU, L. Evaluation of genetic resistance to Salmonella Pullorum in three chicken lines. Poultry Science, v. 0, p. 1–6, 2018.

MACIOROWSKI, K. G.; JONES, F. T.; PILLAI, S. D.; et al. Incidence, sources and control of food-borne *Salmonella* sp in poultry feeds. World's Poultry Science Journal, Ithaca, v. 60, n. 4, p. 446-457, 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 960p.

MALLINSON E.T. & SNOEYENBOS G.H. Salmonellosis. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens, Third Edition, Purchase H.G. et al., eds. American Association of Avian Pathologists, Kendall Hunt Publishing, Iowa, USA, 3–11, 1989.

MARCHESE, J. A. P.; ARALDI-FAVASSA, C. T. Estudo da incidência de *Salmonella* Enteritidis em populações de galinhas caipiras no município de Concórdia (Santa Catarina, Brasil) por meio de teste sorológico. *Ágora: R. Divulg. Cient.*, v. 18, n. 1, p. 29-34, 2011.

MARMUR, J. A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms. *J. Mol. Biol.*, v. 3, p. 208-218, 1961.

MASTROENI, P.; MENAGER, N. Development of acquired immunity to Salmonella. *Journal of medical microbiology*, Reading, v.52, 453-459, 2003.

MCBRIDE, M. D.; HIRD, D. W.; CARPENTER, T. E.; SNIPES, K. P.; DANAYE-ELMI, C.; UTTERBACK, W. W. Health Survey of Backyard Poultry and Other Avian species Located Within One Mile of Commercial California Meat-Turkey Flocks. *Avian Diseases*, v. 35, n. 2, p. 403-407, 1991.

MCCREA, B. A.; TONOOKA, K. H.; VANWORTH, C.; BOGGS, C. L.; ATWILL, E. R.; SCHRADER, J. S. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* Species on Farm, After Transport, and at Processing in Specialty Market Poultry. *Poultry Science*, v. 85, p. 136–143, 2006.

MEERBURG, G. B.; KIJLSTRA, A. Role of rodents in transmission of Salmonella and Campylobacter. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 87, p. 2774- 2781, 2007.

MITCHELL, C. R. B; GARLOCK, M. F. C. An outbreak of gastroenteritis presumably caused by *Salmonella* Pullorum, 1946.

MOREKI, J.C.; SEABO, D. Guinea fowl production in Botswana. *Journal of World's Poultry Research*. v. 2, n. 1, p. 01-04, 2012.

MUNIR, E. H.; KHALIFA, K. A.; MOHAMMED, A. M. Status of food safety due to bacterial contaminants of poultry meat and poultry products in Khartoum State. *Journal of Scientific Research & Reports*, v. 3, n. 14, p.1897-1904, 2014.

NAHASHON, S. N.; AGGREY, S. E.; ADEFOPE, N. A.; AMENYENU, A. Modeling growth characteristics of meat-type Guinea fowl. *Poultry Science*, n. 85, p. 943-946, 2006.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_opasm7\\_a6.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_opasm7_a6.pdf)>. Acesso em: 07 jun. 2018.

NETSANET, B.; NETSANET, B.; BERIHUN, A.; NIGUS, A.; ABREHA, T.; SHEWIT, K. Seroprevalence of *Salmonella pullorum* infection in local and exotic commercial chicken from Mekelle areas, northern Ethiopia. *Revista Electrónica de Veterinaria*, v.13, n. 9, p. 1-15, 2012.

OIE (Office International Des Epizooties), 2012. Fowl typhoid and pullorum disease. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.3.11.

OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JUNIOR, A.; MONTASSIER, H. J.; FERNANDES, A. C. Assessment of serological response of chickens to *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* by Elisa. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v. 6, p. 111–115, 2004.

OLIVEIRA, S. D.; SANTOS, L. R.; SCHUCH, D. M. T.; et al. Detection and identification of salmonellas from poultry by PCR. *Vet. Microbiol.*, v. 87, p. 25–35, 2002.

PAN, Z., WANG, X., ZHANG, X., GENG, S., CHEN, X., PAN, W., et al. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Pullorum* isolates in China from 1962 to 2007. *Veterinary Microbiology*, v. 136, p. 387-392, 2009.

PENHA FILHO, R. A. C.; FERREIRA, J. C.; KANASHIRO, A. M. I.; DARINI, A. L. C.; BERCHIERI JUNIOR, A. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* isolated from ill poultry in Brazil. *Cienc. Rural*, v.46, n. 3, p. 513-518, 2016.

PENNYCOTT, T. W.; DUNCAN, G. *Salmonella pullorum* in the common pheasant (*Phasianus colchicus*). *Veterinary Record*, v. 144, p. 283-287, 1999.

PESSÔA G. V. A.; SILVA E. A. M. Meios de Rugai e Lisina-Motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 32, p. 97 - 100, 1972.

PORWOLLIK, S.; BOYD, E. F.; CHOY, C.; et al. Characterization of *Salmonella enterica* Subspecies I Genovars by Use of Microarrays. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 17, p. 5883-5898, 2004.

PROUX K., HUMBERT F., JOUY E., HOUDAYER C., LALANDE F., OGER A. &

SALVAT G. (2002). Improvements required for the detection of *Salmonella Pullorum* and *Gallinarum*. *Can. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 151–157, 2002.

RABSCH, W.; ANDREWS, H. L.; KINGSLEY, R. A.; et al. *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and Its Host-Adapted Variants. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 5, p. 2249–2255, 2002.

ROY, H., DHILLION, A.S., SHIVAPRASAD H.L., SCHABERG D.M., BANDLI D. AND JOHNSON S. Pathogenicity of Different Serogroups of Avian salmonellae in Specific- Pathogen- Free Chickens. *Avian Disease*, v. 45, p. 922-937, 2001.

SAHA, A.K.; SUFIAN, M. A.; HOSSAIN, M. I.; HOSSAIN, M. M. Salmonellosis in layer chickens: pathological features and isolation of bacteria from ovaries and inner content of laid eggs. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, v. 10, n. 1, p. 61-67, 2012.

SANTOS, H. F.; LOVATO, L. T.; FLÔRES, M. L.; et al. Anticorpos contra vírus em galinhas de terreiro no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc. Rural*, v. 38, n. 7, p. 1932-1937, 2008.

SAYILA, A. Guinea fowl farming becomes popular in Botswana. *World Poultry*, v. 25, n. 10, p. 30-31, 2009.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; et al. Foodborne illness acquired in the United States - Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH (SCVPH). Geneva: European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General - Management of scientific committees, 2003.

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*. 12ed. Ames: Iowa States University. p. 620-636, 2008.

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

TEYE, G. A.; ADAM, M. Constraints to guinea fowl production in northern Ghana: A case study of the Damongo area. *Ghana Journal of Agricultural Science*, v. 33, p. 153-157, 2000.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; et al. Nomenclature and taxonomy of de genus *Salmonella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 55, p. 521–524, 2005.

TRABULSI, L. R.; EDWARDS, P. R. The differentiation of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* by biochemical methods. Cornell Vet., v. 52, p. 563-569, 1962.

WIGLEY, P.; BERCHIERI, JR.; K. L. PAGE, A. L. SMITH, AND P. A. BARROW. *Salmonella enterica* serovar Pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens. Infect. Immun., v. 69, p. 7873–7879, 2001.

WIGLEY, P.; HULME, S. D.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P. A. In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SAL1 “locus”. Microbes and infection / Institut Pasteur, Paris, v.4, n.11, p.1111-1120, 2002a.

WIGLEY, P., HULME, S.D., POWDERS, C., BEAL, R. K. BERCHIERI, JR. A. SMITH, A. AND BARROW, P. Infection of the Reproductive Tract and Eggs with *Salmonella enterica* Serovar Pullorum in the Chicken is Associated with Suppression of Cellular Immunity at Sexual Maturity. Infect. and Immun., v. 73, p. 2986-2990, 2005.

WIGLEY, P.; HULME, S.; ROTHWELL, L.; BUMSTEAD, N.; KAISER, P.; BARROW, P. A. Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. Infection and immunity, Washington, v.74, n.2, p.1425-1430, 2006.

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: journal of the W.V.P.A, Londres, v.31, n.5, p.501-506, 2002b.

WIGLEY, P.; KAISER, P. Avian cytokines in health and disease. Brazilian Journal of Poultry Science, Campinas, v.5, n.1, p.1-14, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Salmonella*. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en>> Acesso em: 21 abril 2018.

ZENG, H.; CARLSON, A. Q.; GUO, Y.; YU, Y.; COLLIER-HYAMS, L. S.; MADARA, J.L.; GEWIRTZ, A. T.; NEISH, A. S. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Bethesda, v. 171, n.7, p. 3668-74, 2003.