

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**SALMONELOSES AVIÁRIAS
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Autora: Karen Karine da Rosa Dias

PORTO ALEGRE

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**SALMONELOSES AVIÁRIAS
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Autora: Karen Karine da Rosa Dias

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

**Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para obtenção
da Graduação em Medicina Veterinária.**

PORTO ALEGRE

2017

RESUMO

A avicultura brasileira vem crescendo no últimos anos graças ao consumo interno e as exportações. Hoje o Brasil é o maior exportador e o segundo maior produtor de carne de frango no mundo, sendo que mais da metade da carne de frango produzida é para consumo interno. A extensão do país, clima e produção de grãos são fatores que favorecem o setor aviário a se desenvolver. Com todo esse crescimento surge também a preocupação com a qualidade sanitária da carne produzida, por isso foi criado o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), para estabelecer as medidas que devem ser tomadas durante a produção. Dentre as patologias abordadas no plano criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estão as salmoneloses. Elas são responsáveis por causar grandes perdas econômicas na avicultura mundial e por serem doenças que podem ser transmitidas por alimentos de origem animal, sendo uma preocupação de saúde pública. As salmonelas possuem vários sorovares de importância sanitária, porém os que mais se destacam e estão inclusos no PNSA são o *S. Gallinarum* e o *S. Pullorum*. Com base nessas informações o presente trabalho apresenta algumas técnicas de diferenciação molecular e uma revisão bibliográfica sobre salmoneloses aviárias.

ABSTRACT

Brazilian poultry industry has been growing in recent years thanks to domestic consumption and exports. Today Brazil is the largest exporter and the second largest producer of chicken meat in the world, with more than half of the chicken meat produced being for domestic consumption. The extension of the country, climate and grain production are factors that favor the poultry sector to develop. With all this growth also arises the concern with the sanitary quality of the meat produced, for that reason the Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) was created, to establish the measures that must be taken during the production. Among the pathologies covered in the plan created by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) are salmonellosis. They are responsible for causing great economic losses in the poultry industry worldwide and for being diseases that can be transmitted by foods of animal origin, being a concern of public health. Salmonella has several serovars of sanitary importance, but the ones that stand out most and are included in the PNSA are *S. Gallinarum* and *S. Pullorum*. Based on this information the present work presents some techniques of molecular differentiation and a bibliographical review on avian salmonellosis.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 6 |
| 2. SALMONELLA..... | 7 |
| 3. SALMONELOSES AVIÁRIAS..... | 8 |
| 4. DISTRIBUIÇÃO..... | 9 |
| 5. PATOGENIA..... | 10 |
| 6. DIAGNÓSTICO..... | 11 |
| 7. DIAGNÓSTICO MOLECULAR..... | 11 |
| 8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL..... | 13 |
| 9. TRATAMENTO..... | 13 |
| 10. PREVENÇÃO E CONTROLE..... | 14 |
| REFERÊNCIAS..... | 15 |

1. INTRODUÇÃO

O setor avícola brasileiro tem se destacado nos últimos anos através de seu intenso crescimento em consequência do aumento do consumo interno e das exportações, o que acarretou na necessidade de redobrar o controle sanitário durante a produção.

O Brasil atualmente é o maior exportador de carne de frango e o segundo maior produtor mundial, só no ano de 2016 foram produzidos 12,90 milhões de toneladas, sendo 4.384 mil toneladas destinadas à exportação. O maior destino da produção é para o mercado interno (66%), neste mesmo ano o consumo per capita no país foi de 41,10 kg/hab segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Os estados brasileiros que mais se destacam na produção e exportação são os da região sul, onde o Paraná se destaca por ser o maior produtor (33,46%) e exportador (35,85%), seguido por Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Outros estados que também se destacam na produção avícola do país são Minas Gerais, São Paulo, e Goiás.

Os fatores que mais influenciam no desenvolvimento do mercado avícola brasileiros são a extensão do país, a abundância de grãos, condições climáticas favoráveis e a mão de obra abundante. Outro fator muito importante são as medidas sanitárias que foram empregadas com base no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) criado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 1994, que estabelece normas e ações para regulamentar a produção avícola.

As Salmoneloses Aviárias estão inclusas na lista de doenças de notificação obrigatória presente no PNSA, juntamente com Influenza Aviária, Doença de New Castle e Micoplasmoses, pois causam prejuízos que afetam o mercado e a produção avícola.

Além dos prejuízos econômicos, o controle de Salmonella é muito importante do ponto de vista de saúde pública, pois pode ser fonte de infecção aos humanos através do consumo de produtos de origem animal, conhecidas como doenças transmitidas por alimentos (DTA's). A transmissão aos humanos pode ocorrer através da ingestão de alimentos contaminados mal cozidos, não higienizados de forma correta ou através da má conservação após a preparação dos mesmos.

Segundo dados do Ministério da Saúde, 95,9% das DTA's entre 2007 e 2017 foram causadas por bactérias, sendo a *Salmonella* a segunda bactéria mais presente nos surtos notificados ao ministério, principalmente o sorotipo *S.Typhimurium*.

A *Salmonella* contém vários sorotipos de importância a saúde animal e humana, mas os que estão inclusos no PNSA são: *S.Gallinarum*, *S.Pullorum*, *S.Enteritidis* e *S.Typhimurium*. Os principais sorovares de importância na avicultura por causar enfermidades em aves são os *S.Gallinarum* e *S.Pullorum*, agente responsáveis pelo tifo aviário e pela pulorose, respectivamente.

Com base nessas informações o presente trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária tem como objetivo fazer uma revisão bibliográfica de salmoneloses aviárias e dissertar sobre algumas técnicas de biologia molecular desenvolvidas para diferenciação das cepas envolvidas nos surtos recentes no país.

2. SALMONELLA

A *Salmonella* é um gênero de bactéria que pertence à família Enterobacteriaceae, no qual os indivíduos são bacilos Gram-negativos que não produzem esporos e seu diâmetro varia de 0,7 a 1,5 μ m x 2,5 μ m. Esse grupo bacteriano é anaeróbio facultativo e alguns sorovares possuem mobilidade através de flagelos peritríquios.

Para seu metabolismo as salmonelas utilizam citrato como única fonte de carbono, não produzem oxidase, indol, acetoina, produzem catalase, sulfeto de hidrogênio, não hidrolisam uréia, mas descarboxilam os aminoácidos lisina e ornitina. São capazes de fermentar com ou sem produção de gás: arabinose, dulcitol, glicose, galactose, levulose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose, xilose. Não fermentam: adonitol, dextrina, dulcitol, eritrol, glicerol, inositol, inulina, lactose, rafinose, sacarose, salicina, sorbitol e amido. Essas características podem variar de acordo com o sorovar e/ou subespécie.

O crescimento das salmonelas ocorrem em caldo nutrientes simples e em meios seletivos (ágar) para enterobactérias, entre estes meios, caldo selenito e o caldo tetracionato e suas modificações. Os meios utilizados para cultivo em

placa são os meios em ágar: verde brilhante, MacConkey, SS (Salmonella Shigella), Sulfito de bismuto, entre outros.

Essas bactérias são eliminadas nas fezes de indivíduos doentes ou portadores e contaminam solo, água e alimentos, podendo sobreviver durante um longo período de tempo no ambiente, principalmente em matéria orgânica. Sua viabilidade em material fecal pode durar de meses a anos, sendo encontrada em fezes de aves após mais de 28 meses, 30 meses em fezes bovinas, 280 dias no solo cultivado e 120 dias na pastagem, pode também ser encontrada em efluentes de água de esgoto com contaminação fecal. Tem a capacidade de infectar o homem e diversas espécies de animais domésticos e silvestres através de produtos não processados como hortaliças e frutas, e os alimentos de origem animal.

Comparada a outras bactérias as salmonelas são resistentes a muitos fatores ambientais, são capazes de se multiplicar em pH entre 7.0 e 7.5 (podendo variar de 3.8 a 9.5), temperatura de 35°C a 43°C (variando de 5°C a 46°C) e uma atividade hídrica (> 0,94), ocorrendo variações entre sorovares.

Quanto a classificação, esse gênero bacteriano se divide em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizoanae*, *housteane* e *indica*. Essa divisão em espécie e subespécie é pouco usual, na prática utiliza-se o esquema de Kauffmann & White, no qual as salmonelas são divididas em sorovares de acordo com a composição antigênica das mesmas com relação aos antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) (Figura 1).

Atualmente são conhecidos mais de 2600 sorovares de *Salmonella*, dos quais 1547 pertencem a *S. enterica* subespécie *enterica*, que causam infecções em uma grande variedade de animais de sangue quente. Os sorovares podem ser restritos, como *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* que afetam aves, ou infectar mais de uma espécie animal, como *S. Typhimurim* que pode afetar o homem, bovinos e aves.

3. SALMONELOSES AVIÁRIAS

As salmoneloses aviárias são patologias provocadas por sorovares específicos de salmonela, esses são responsáveis por causar tipos distintos de

enfermidade. As salmoneloses de maior importância para a avicultura são: a Pulorose, causada por *Salmonella Pullorum*, e o Tifo Aviário, causado por *Salmonella Gallinarum*.

A pulorose já foi conhecida como septicemia dos pintainhos, diarreia branca e diarreia branca bacilar para distingui-la de outras doenças que também causavam diarreia branca. Para diferenciar do tifo aviário, em torno de 1930, o termo pulorose começou a ser utilizado.

O tifo aviário foi descrito pela primeira vez em 1888 e foi confundido inicialmente com cólera aviária, porém em 1889 ao isolar o agente verificou-se que era outro organismo. A patologia ganhou essa denominação por ser semelhante a febre tifóide humana e para poder ser diferenciada da cólera aviária.

Os sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* assim como as outras salmonelas produzem H₂S, porém mais lentamente. Quanto ao crescimento em placa, a *S. Pullorum* tem crescimento lento e suas colônias são menores quando comparadas às salmonelas paratíficas, com diâmetro de 1 a 3-4 mm. Devem-se evitar meios baseados na pigmentação por produção de H₂S, pois *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* tem pequena produção.

Existem muitas semelhanças entre os sorovares de importância aviária, ambos fermentam arabinose, glicose, galactose, manitol, ramnose, e xilol, com ou sem produção de gás; porém não fermentam lactose, sacarose e salicina. A diferenciação dos sorovares pode ser feita através de teste bioquímicos, *S. Gallinarum* fermenta ducitol e não descarboxila ornitina, já *S. Pullorum* não fermenta ducitol e descarboxila ornitina rapidamente.

4. DISTRIBUIÇÃO

Os primeiros relatos sobre a pulorose ocorreram no Estados Unidos e posteriormente em outros países, como o Brasil. Suspeita-se que a doença tenha se disseminado através da exportação de aves dos EUA para outros países. No Brasil a enfermidade tem sido diagnosticada com frequência em aves de exploração comercial, mesmo com o PNSA houve um aumento de casos entre 1980 e 2005, mostrando que houve falha no sistema de controle da enfermidade.

O tifo aviário teve seus primeiros casos relatados no final do século XIX na Inglaterra, na Europa foi notificado no início dos anos 90 na Alemanha e Dinamarca. Os primeiros registros no Brasil foram em 1919 em Minas Gerais e 1939 em São Paulo, em exploração de aves de postura comercial podendo ocorrer também em aves reprodutoras.

5. PATOGENIA

A *S. Pullorum* tem como hospedeiros naturais as galinhas, porém outras aves podem se contaminar com a bactéria, como perus, pardais, canários, faisões, papagaios. Nas galinhas as linhagens que apresentam maior resistência são as leves, mas podem abrigar o patógeno por meses. A susceptibilidade é maior em aves jovens, sendo mais comum as manifestações clínicas nas primeiras duas a três semanas de vida, período em que a mortalidade é maior. As aves que sobrevivem a enfermidade podem se tornar portadoras e disseminar a doença através de ovos contaminados por meses.

Entre as vias de transmissão a mais importante é a transovariana, porém pode ocorrer também por contato com aves infectadas no criatório, através de alimento, água e cama contaminados com fezes de animais acometidos e no incubatório pode ocorrer transmissão aerógena. O ser humano pode disseminar o agente entre granjas de forma mecânica, assim como aves silvestres, animais de estimação e moscas. A utilização de antimicrobianos nos primeiros dias de vida pode mascarar a doença e favorecer a transformação do animal acometido em portador.

A *S. Gallinarum*, assim como a *S. Pullorum*, tem como hospedeiro natural as galinhas, mas outras espécies de aves também são susceptíveis a bactéria. As linhagens mais susceptíveis são as semi-pesadas e pesadas, e as leves são as mais resistentes mas podem desenvolver a doença ou não desenvolver a doença e disseminar o agente. Apesar de ser mais comum os relatos em aves adultas, aves de qualquer idade podem ser acometidas pela enfermidade.

O tifo aviário pode ser transmitido por várias vias como contato com aves doentes, canibalismo e presença de aves mortas na granja, incluindo a via vertical. Assim como a pulrose, pode ser disseminada através do homem entre granjas, caminhões que transportam aves e ovos, aves silvestres, roedores,

moscas, entre outros. É importante salientar que a principal via de excreção do agente de aves acometidas são as fezes em ambas as doenças.

6. DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico das salmoneloses aviárias se utiliza anamnese, sinais clínicos e exames laboratoriais. Tanto para pulorose quanto para tifo aviário o material que deve ser enviado ao laboratório para análise bacteriológica são baço, fígado, coração, ovário, conteúdo intestinal e saco da gema dos animais acometidos.

As amostras enviadas, sendo swabes ou fragmentos dos órgãos, podem ser inoculadas diretamente em placas ou em caldos, sendo mais utilizados os caldos Rapaport-Vassiliadis, selenito e tetracionato, acrescentando-se novobiocina. Com exceção de material fecal, todas as amostras podem ser inoculadas em caldo nutriente sem necessidade de substâncias seletivas, após o período de 24hs a 37-42°C esse caldo deve ser transferido para placas. Nas placas são utilizados mais comumente os meios ágar verde brilhante, ágar MacConkey e SS, após o plaqueamento deve ser feita a incubação de 37-42°C por 24hs.

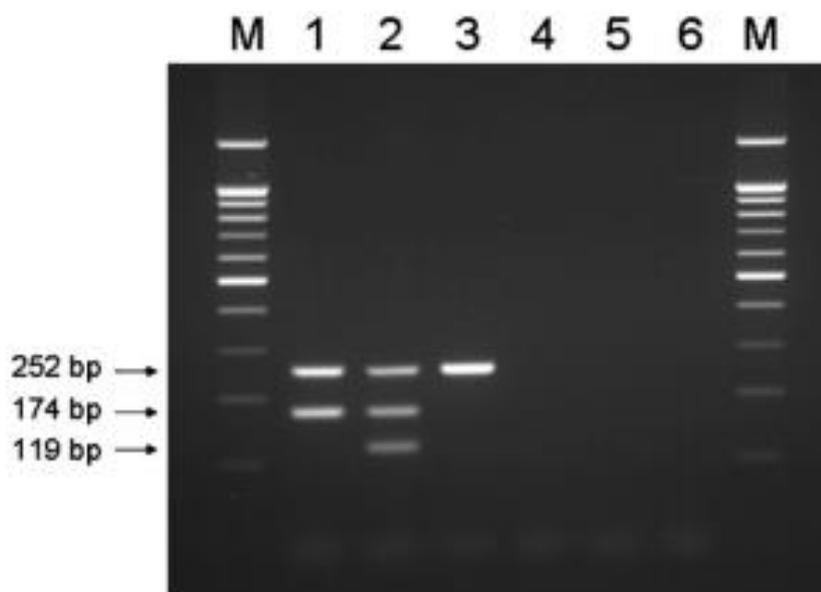
Na sequência são realizados testes bioquímicos, estes são executados a 37°C por 24hs, podendo ser presuntivos em meios como TSI (tríplice açúcar e ferro) e LIA (ágar, lisina e ferro), ou mais completos como o teste API 50 CH. Na sorologia são realizados os testes de soroaglutinação rápida em placa com sangue total e antígeno colorido, soroaglutinação lenta em tubos e de microaglutinação. O teste de ELISA(imunoenzimático) identifica animais portadores de resposta imunológica a ambos os agentes. Os testes sorológicos não conseguem distinguir entre os agentes da pulorose e do tifo aviário, podendo também apresentar falsos-positivos.

7. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Durante o período de 2012 e 2013, a autora deste trabalho foi bolsista de iniciação científica do Laboratório de Diagnóstico Molecular (LDM) na Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), nesse período verificou-se que não existia um método rápido e eficaz para diferenciação das cepas vacinais (9R) e

de campo de *S. Gallinarum*, assim como para *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Um grupo coreano desenvolveu um estudo no qual através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi possível diferenciar não só os agentes da pulrose e do tifo aviário, como também as cepas de campo e da vacina 9R. (Kang et al. 2011/2012) Neste estudo verificou-se que era possível diferenciar em gel de poliacrilamida as cepas, pois a cepa vacinal 9R apresentava 3 fragmentos com 119, 174 e 252 pares de bases, a cepa de campo de *S. Gallinarum*(SG) apresentava 2 fragmentos com 174 e 252 pares de bases e a cepa de *S. Pullorum*(SP) apresentava apenas um fragmento com 252 pares de bases. (Figura 2)

Figura 2 – Triplex PCR aplicado no estudo coreano



Fonte: Kang et al. 2012

O objetivo do trabalho no LDM foi verificar se era possível utilizar essa técnica para diferenciar as cepas que circulavam no Brasil. As amostras utilizadas foram culturas da cepa vacinal 9R e de surtos de salmoneloses aviária no estado do Rio Grande do Sul no ano de 2013.

Inicialmente foram adquiridos os reagentes e foram feitos acertos no PCR utilizando como controles culturas de cepa vacinal 9R e um isolado de campo proveniente de lote com Tifo Aviário, onde verificou-se que foi possível reproduzir os dados mencionados no trabalho coreano.

Após essa etapa, as amostras dos surtos foram analisadas, onde inicialmente foi feita a extração das amostras através do método de sílica, em seguida as amostras foram amplificadas por PCR convencional em três etapas de ampliações únicas, uma para cada alvo (SG, SP E 9R). Após a amplificação foi feita a detecção por eletroforese em gel de poliacrilamida que posteriormente era corado com nitrato de prata e eram feitas as avaliações das bandas apresentadas.

Quando o período de iniciação científica terminou, as amostras ainda estavam em análise, mas as que já haviam sido analisadas confirmavam que era possível diferenciar através da técnica de PCR os agentes de pulorose e tifo aviário, assim como a cepa vacinal 9R. A empresa Simbios Biotecnologia validou essa técnica e hoje faz parte do seu portfólio de análises. (Simbios, 2014)

8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

A diferenciação deve ser feita não apenas entre as salmoneloses mas em relação a outras patologias. Quando as aves acometidas são pintainhos suspeita-se de pulorose, colibacilose, aspergilose, encefalomielite aviária, além de outras salmoneloses, porém quando as aves são acometidas na fase adulta pode se suspeitar de tifo aviário, doença de Marek, paratifo aviário, pasteurelose.

O diagnóstico definitivo só é possível através do isolamento e diferenciação do agente, identificar o sorotipo é de fundamental importância para a elaboração de programa de controle e eliminação da *Salmonella*.

9. TRATAMENTO

O tratamento para ambas as salmoneloses é realizado através da utilização de antibacterianos que diminuem a mortalidade das aves mas não impedem as aves acometidas de permanecerem portadoras excretando *Salmonella* nas fezes por longos períodos. Os medicamentos mais utilizados são sulfonamidas e nitrofuranos. Porém no ano de 1998 o clorafenicol e os nitrofuranos foram proibidos pelo MAPA como aditivos alimentares em rações animais.

As sulfas mais utilizadas são sulfadiazina, sulfamerazina, sulfatiazol, sulfamerazina e sulfaquinoxalina, estas reduzem a mortalidade nos primeiros 5

a 10 dias de vida, mas podem ocorrer mortes se for retirada a medicação. É importante salientar que a utilização de sulfas reduz o consumo de água e alimento pela ave, prejudicando seu desenvolvimento e produção de ovos.

Por interferir na resposta sorológica, os nitrofuranos são contra-indicados por, pelo menos, seis semanas antes do teste de pulorose. Outras medicações antibacterianas como clorafenicol, clortetraciclina e ampramicina também são utilizados para diminuir a mortalidade das aves doentes.

Por já ter sido observada resistência a todas as medicações mencionadas é importante sempre realizar antibiograma antes da utilização de qualquer medicamento antibacteriano.

10. PREVENÇÃO E CONTROLE

Como todas as patologias aviárias, as principais medidas de prevenção são a limpeza, higiene e desinfecção da granja a cada troca de lote. É importante que seja mantida a biossegurança em todas as etapas da produção aviária.

Na pulorose a atenção deve ser maior nas granjas reprodutoras e no incubatórios, mantendo além das principais medidas, o controle de roedores, moscas, pássaros, manejo adequado de resíduos e dejetos. Outra medida importante é o teste para pulorose no início do período de postura das aves, para prevenir a transmissão vertical do agente.

O caso do tifo aviário, além das medidas já citadas, é importante o manejo rápido e adequado de aves mortas, atenção aos veículos que transportam aves, ração e outros insumos, controle de vetores, evitar aves de diferentes idades no lote. Diferente da pulorose, o tifo aviário possui vacinas vivas e inativadas que combatem a doença, sendo a 9R a mais conhecida. Porém a utilização da vacina não exclui as medidas de biossegurança.

REFERÊNCIAS

BERCHIERI JÚNIOR A.; CAETANO DE FREITAS NETO, O. Salmoneloses In: BERCHIERI JÚNIOR A.; MACARI, M. Doença das aves. 2 ed. Campinas: Editora FACTA, 2009. P. 435-456.

CARVALHO CAMPOS, L. Salmonella. In: TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 6 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015 p. 351-360

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., 2011. Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. Enteric serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes. *Vet. Microbiol.* 147, 181–185.

KANG, M.S., KWON, Y.K., KIM, H.R., OH, J.Y., KIM, M.J., AN, B.K., SHIN, E.G., KWON, J.H., PARK, C.K., 2012. Differential identification of *Salmonella enteric* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Vet. Microbiol.* 160, 491–495.

MANUAL TÉCNICO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA SALMONELLA SPP. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>> Acesso em: 14 de jan. de 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/saude-avicola>> Acesso em: 14 de jan. de 2018.

SIMBIOS BIOTECNOLOGIA. Disponível em: <http://www.simbios.com.br/?p=noticias_detalhe&id_noticia=22> Acesso em: 14 de jan. de 2018.