

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

**RIBOTIPIIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS INTERGÊNICAS DE ISOLADOS DE
Salmonella enterica SUBESPÉCIE *enterica* PROVENIENTES DE PRODUTOS
AVÍCOLAS DO BRASIL, COLÔMBIA E ESTADOS UNIDOS.**

Tese de Doutorado

Martha Pulido Landínez

PORTO ALEGRE
2013

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

**RIBOTIPIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS INTERGÊNICAS DE ISOLADOS DE
Salmonella enterica SUBESPÉCIE *enterica* PROVENIENTES DE PRODUTOS
AVÍCOLAS DO BRASIL, COLÔMBIA E ESTADOS UNIDOS.**

Autora: Martha Pulido Landínez

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva, na especialidade de Sanidade Avícola.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Pulido Landínez, Martha
RIBOTIPIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS INTERGÊNICAS DE
ISOLADOS DE Salmonella enterica SUBESPÉCIE enterica
PROVENIENTES DE PRODUTOS AVÍCOLAS DO BRASIL, COLÔMBIA
E ESTADOS UNIDOS. / Martha Pulido Landínez. -- 2013.
168 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2013.

1. Salmonella enterica. 2. Sorotipagem. 3.
Ribotipificação de Sequências Intergênicas. 4.
Salmonella Enteritidis. 5. Resistência a
antimicrobianos. I. Pinheiro do Nascimento, Vladimir
, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Martha Pulido Landínez

**RIBOTIPIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS INTERGÊNICAS DE ISOLADOS DE
Salmonella enterica SUBESPÉCIE *enterica* PROVENIENTES DE PRODUTOS
AVÍCOLAS DO BRASIL, COLÔMBIA E ESTADOS UNIDOS.**

Aprovado em: 24 de Outubro de 2013

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Profª. Luciana Ruschel dos Santos
Membro da Comissão

Profª. Laura Beatriz Rodrigues
Membro da Comissão

Profª. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

O primeiro a dizer é que esta tese é o produto do esforço de muitas pessoas e instituições que contribuíram enormemente na sua realização. Sem o suporte deles teria sido impossível conseguir com sucesso a terminação desta pesquisa.

Agradeço o suporte económico para esta pesquisa que foi dado pela Associação Colombiana de Médicos Veterinários e Zootecnistas (AMEVEA - Colômbia), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Brasil, pela United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Egg Safety and Quality Research Unit (USDA-ARS-ESQRU) e pelo Poultry Research and Diagnostic Lab. (Mississippi State University).

Ao meu orientador professor Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento, seu suporte e palavras no momento justo foram fundamentais para a conclusão deste trabalho com sucesso.

A Dra. Jean Guard, minha coordenadora no USDA-ARS, porque sempre acreditou em minhas ideias e me levou da mão no conhecimento dos detalhes mais insignificantes sobre a diversidade da *Salmonella*. Amiga e colega de dança, eu também agradeço pelas horas maravilhosas de “line dancing” “zideco” e a música country; sem a dança não teria conseguido o equilíbrio necessário para sobreviver nesta aventura.

A Dra. Roxana Sánchez-Ingunza minha amiga e colaboradora no USDA, seus ensinamentos sobre a biologia molecular abriram outro universo na minha carreira.

Ao Sr. Tod Stewart do USDA, sempre atento de minhas necessidades no laboratório. Nunca faltou nada para meu trabalho graças a ele.

Ao professor Dr. Pedro Villegas da Universidade de Georgia, por seu decisivo suporte em momentos difíceis e por sempre acreditar em mim.

A todas as pessoas que colaboraram no meu estagio na Universidade Estadual do Mississippi, especialmente aos professores: Dr. Dany Magee, Coordenador do Poultry Research and Diagnostic Lab., Dras. Sue Ann Hubbard e Kelly Jones e ao Dr. Michael Mael. Especial agradecimento ao professor Dr. Alejandro Banda, pessoa e cientista excepcional, quem fazendo ao lado seus queridos vírus me ajudou na realização da minha pesquisa das Salmonelas do Mississippi.

A todos os colegas, estagiários e funcionários do CDPA, foram muitas horas compartilhando ideias e conhecimentos; especialmente aos professores Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle e Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes.

A professora Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, sua contribuição no meu conhecimento das bactérias é invaluable.

Ao Professor Dr. Felix González, seu suporte e conselhos foram decisivos para minha escolha de estudar na UFRGS.

A professora Nhora Martínez Rueda da Universidade Nacional da Colômbia, pela assessoria estadística.

A Universidade Nacional de Colômbia, especialmente à Dra. Catalina Torres do Laboratório de Patología Aviária da Faculdade de Medicina Veterinária, pela sua constante ajuda nas pesquisas feitas na Colômbia.

A todos os colegas e amigos, além dos laboratórios de diagnóstico na Colômbia, que contribuíram na criação da Bacterioteca - *Salmonella* da Universidade Nacional de Colômbia.

Às professoras Dras. Luciana Ruschel dos Santos e Laura Beatris Rodrigues, pelos seus aportes como membros da banca.

A meus grandes e queridos amigos Yuli e Johan, minha família em Porto Alegre, seu suporte sempre foi vital para mim e importantíssimo nos dias previos à defesa da minha tese.

A outros grandes e queridos amigos Gustavo e Vanessa, pelos momentos inesquecíveis que vivemos nesta jornada e seu apoio incondicional em tudo momento.

Os mais especiais agradecimentos para aqueles que são imprescindíveis na minha vida:

A Deus, meu parceiro e amigo, quem sempre ilumina meu caminho.

Meu agradecimento eterno a minha família na Colômbia, sem o apoio emocional de minha mãe, Ricarda e meus irmãos Esperanza, Enrique e Mauricio; nada poderia ser feito.

Ao Alejandro, o amor da minha vida, colega e amigo; sempre disposto à ajuda me, sempre ali, com uma palavra adequada em cada momento.

RESUMO

Para avaliar a diversidade de *Salmonella enterica*, foram analisados os sorovares presentes em amostras de *Salmonella* isoladas de aves e seu ambiente do Sul do Brasil (n=155), Colômbia (n=141) e Mississippi (EUA, n=50). No total, foram examinados 346 isolados de *Salmonella* pela técnica de ribotipificação de sequências Intergênicas (ISR) usando PCR convencional (para bactérias vivas isoladas no Estado de Mississippi) ou nested PCR (para o DNA de *Salmonellas* do Brasil e da Colômbia, em cartões FTA). O sequenciamento da região intergênica do gene *dkgB* avalia polimorfismos de nucleotídeos simples que ocorrem em torno do gene ribossomal 5S. A concordância geral entre o esquema Kauffman-White-LeMinor (KWL) e a ISR foi de 85,2% em isolados do Brasil, e de 89,58% em isolados do Mississippi. É possível que a divergência seja devida à capacidade da ISR de detectar as misturas de sorovares numa cultura. Os sorovares de *Salmonella enterica* identificados nos isolados brasileiros foram: Heidelberg, Enteritidis, Hadar, Typhimurium, Gallinarum, Agona, Cerro, Livingstone, Infantis, Isangi, Mbandaka, Montevideo e Senftenberg. Três sorovares ISR únicos foram detectados (UN0041, UN0042, UN0043). Nos isolados colombianos, foram identificados os sorovares Enteritidis, Gallinarum, Isangi, Heidelberg, Paratyphi B var. Java, Tennessee, Saintpaul, Agona, Isangi, Mbandaka, Urbana, Albany, Javiana, Fresno, Miami, Muenster, Rissen, Braenderup, Yoruba e um sorovar ISR Único (UN0048). Já no tocante aos isolados de Mississippi, foram identificados os sorovares Enteritidis, Typhimurium, Kentucky, Bredeney, Mbandaka, Saintpaul, Montevideo, Cubana, Lille, Senftenberg, Johannesburg e um ISR Único (UN0094). Em geral, a ISR forneceu mais informações do que KWL sobre a ecologia de *Salmonella enterica* das aves comerciais. Em 73 isolados da Colômbia e 50 isolados de Mississippi, foram estabelecidas as resistências para 15 e 17 agentes antimicrobianos, respectivamente. Não foram identificados isolados pansusceptíveis. Todas as amostras analisadas foram classificadas como multirresistentes. Os resultados deste estudo mostram uma grande diversidade entre os isolados analisados, não só com respeito aos sorovares identificados em cada país, mas também sobre a sua resistência aos antimicrobianos. Os resultados desta pesquisa irão beneficiar a indústria avícola do sul do Brasil, da Colômbia e de Mississippi, porque a caracterização de cepas isoladas de aves comerciais poderá ser usada no futuro para o desenvolvimento e adaptação de programas de controle.

Palavras chave: *Salmonella enterica*, Ribotipificação de Sequências Intergênicas, Sorotipagem, *Salmonella* Enteritidis, resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

To assess diversity of *Salmonella enterica* serotypes present in poultry and their environment from Southern Brazil (n=155), Colombia (n=141) and Mississippi (EUA, n=50); 346 isolates were examined with conventional PCR (live bacteria from Mississippi) or nested PCR (Brazilian and Colombian *Salmonella* DNA in FTA cards) and sequencing of the *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping (ISR) region that assesses single nucleotide polymorphisms occurring around a 5S ribosomal gene. Overall agreement between Kauffman-White-LeMinor (KWL) scheme and ISR was 85.2% in Brazilian *Salmonella* isolates, and 89.58% in Mississippi's isolates. It is possible that the disagreement was due to the ability of ISR to detect mixtures of serotypes in culture. *Salmonella enterica* serotypes identified among Brazilian isolates were Heidelberg, Enteritidis, Hadar, Typhimurium, Gallinarum, Agona, Cerro, Livingstone, Infantis, Isangi, Mbandaka, Montevideo, and Senftenberg. Three unique ISRs were detected (UN0041, UN0042, UN0043). Regarding the Colombian isolates, serotypes Enteritidis, Gallinarum, Isangi, Heidelberg, Paratyphi B var. Java, Tennessee, Saintpaul, Agona, Isangi, Mbandaka, Urbana, Albany, Javiana, Fresno, Miami, Muenster, Rissen Braenderup, Yoruba, and One Unique ISR (UN0048) were identified and among Mississippian isolates, serotypes Enteritidis, Typhimurium, Kentucky, Bredeney, Mbandaka, Saintpaul, Montevideo, Cubana, Lille, Senftenberg, Johannesburg, and one Unique ISR (UN0094). Overall, ISR provided more information than KWL about the ecology of on-farm *Salmonella enterica*. In 73 isolates from Colombia and 50 isolates from Mississippi, there were established the antimicrobial resistance against 15 and 17 antimicrobial agents, respectively. No pansusceptible isolate was identified. All analyzed isolates were classified as Multidrug resistant. The results of this study show a great diversity among analyzed isolates, not only in respect to the serotypes, but also about their antimicrobial resistance. The results of this research will benefit the poultry industries of Southern Brazil, Colombia and Mississippi, because the characterization of strains isolated from poultry can be used in the future to the development and adaptation of *Salmonella* control programs.

Key words: *Salmonella enterica*, Ribotipificação de Sequências Intergênicas, Sorotipagem, *Salmonella* Enteritidis, resistência a antimicrobianos.

LISTA DE TABELAS

			P
Capítulo I	Tabela 1	Distribuição e resultados do teste de segurança para a avaliação da presença de <i>Salmonella</i> em cartões FTA. Avaliação de 155 amostras de <i>Salmonella enterica</i> , Subesp. <i>enterica</i> provenientes de produtos avícolas e seu ambiente de estabelecimentos avícolas do sul do Brasil, estocadas no CDPA durante os anos de 1996 até 2011.	39
	Tabela 2	Estatística dedutiva mostrando media, desvio padrão e intervalos de confiança para a média da concentração (ng/μL) e indicador de pureza (260/280) após amplificação de amostras de DNA de <i>Salmonella</i> transportadas em cartões FTA.	40
Capítulo II	Tabela 1	Primers used for nested PCR Intergenic Sequence Ribotyping (ISR)	52
	Tabela 2	Variation between reported serotype and serotype as detected by ISR analysis	54
	Tabela 3	<i>Salmonella enterica</i> serotypes from Southern Brazil as characterized by the Kauffman-White-Le Minor scheme	55
Capítulo III	Tabela 1	Information regarding <i>Salmonella</i> spp. isolated from commercial brown layers in Colombia from 2008 to 2012.	69
	Tabela 2	Primers used for nested PCR Intergenic Sequence Ribotyping (ISR)	73
	Tabela 3	Serotyping of Uniques ISR serotypes by using DNA hybridization microarray <i>Salmonella</i> serotyping method.	76
	Tabela 4	Serotyping of Uniques ISR serotypes by using DNA hybridization microarray <i>Salmonella</i> serotyping method.	77
Capítulo IV	Tabela 1	Information regarding <i>Salmonella</i> spp. isolates analyzed in this study	88
	Tabela 2	Primers used for nested PCR Intergenic Sequence Ribotyping (ISR)	89
	Tabela 3	Antimicrobials tested, disk potency, and breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and used in this study	91
	Tabela 4	Serotypes distribution by area identified in <i>Salmonella</i> isolates from vertical integrations in Colombia.	92
	Tabela 5	Multidrug resistance patterns among <i>Salmonella</i> isolates	95
	Tabela 6	Comparison of antimicrobial resistance among <i>Salmonella</i> isolates by area	97
	Tabela 7	Nonsusceptible antimicrobial class total resistance by serotype	98
Capítulo V	Tabela 1	<i>Salmonella enterica</i> isolates from Mississippi commercial birds and poultry environment included in this study. Serotyping by KWL and ISR	115
	Tabela 2	Primers used for PCR intergenic sequence ribotyping (ISR)	117
	Tabela 3	Percentages of susceptibility, resistance levels and MIC50 and	119

MIC90 values of 50 ISR *Salmonella* serotypes to 17 antimicrobials

Tabela 4	Distribution of antimicrobial resistance patterns for 50 ISR <i>Salmonella enterica</i> isolates (13 antimicrobials)	122
Tabela 5	Antimicrobial resistance pattern (ARP) distribution by ISR <i>Salmonella</i> serotypes	125

LISTA DE FIGURAS

		p
Figura 1	Região espaçadora intergênica 3 (ISR-3): Região de aproximadamente 500 pb entre o gene ribossomal 5S e as regiões vizinhas do gene <i>dkgB</i> (MORALES <i>et al.</i> , 2006; GUARD <i>et al.</i> , 2012).	23
Capítulo I	Uso dos cartões FTA para armazenamento e transporte do DNA	37
Figura 1	de amostras de <i>Salmonella enterica</i> sem risco biológico.	

LISTA DE ABREVIATURAS - PORTUGUÊS

DTA	Doenças transmitidas por alimentos
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ISR	Ribotipificação de Sequencias Intergênicas
KWL	Esquema Kauffmann-White-Le Minor
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
CDPA – UFRGS	Centro de Diagnóstico e Pesquisa Aviaria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
RAPD/PCR	DNA polimórfico amplificado ao acaso
PFGE	Eletroforese em Campo Pulsado
LPA-UN	Laboratório de Patologia Aviária da Universidade Nacional da Colômbia
SNP	Polimorfismo de nucleotídeos específicos
MLSP	Tipificação multilocus
RFLP	Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição
Rep-PCR	Amplificação de elementos palindrômicos extragênicos repetitivos
DNA-DNA hybridization microarray	Ribotipagem e hibridização por microarranjos
FTA	Cartões FTA - Flinders Technology Associates - FTA® Cards for DNA Analysis
SXT	Trimetoprim/ sulfametoxazol

LISTA DE ABREVIATURAS - INGLÉS

ISR	Intergenic sequence ribotyping
BHI	Brain and hearth infusion
KWL	Kauffmann-White-Le Minor.
AOAC	Association of Official Analytical Chemist.
ARP	Antimicrobial resistance pattern
MDR	Multidrug resistant
CSLI	Clinical and Laboratory Standards Institute
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring System
USDA-ARS-	Egg Safety and Quality Research Unit, United States
ESQRU	Department of Agriculture, Agricultural Research Service
NVSL	National Veterinary Services Laboratory
PRDL	Poultry Research and Diagnostic Lab
WHO	World Health Organization
AMX	Amoxicillin
TIO	Ceftiofur
CLI	Clindamycin
ENR	Enrofloxacin
ERI	Erythromycin
FLR	Florfenicol
GEN	Gentamicin
NEO	Neomycin
NOV	Novobiocin
OXY	Oxytetracycline
PEN	Penicillin
SPT	Spectinomycin
<i>STR</i>	Streptomycin
SUD	Sulfadimethoxine
SUT	Sulfathiazole
TCY	Tetracycline
SXT	Trimethoprim/sulfamethoxazole
CIP	Ciprofloxacin
NOR	Norfloxacin
AMK	Amikacin
AMP	Ampicillin
CHL	Cloramphenicol
FLR	Florfenicol
DOX	Doxicycline
FOX	Fosfomicin
LEX	Cephalexin.
ACSSuT	Resistant to Ampicilin, chloramphenicol, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and tetracycline

SUMÁRIO

	P	
1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Etiologia	16
2.2	Importância da salmonelose na saúde pública	17
2.3	Técnicas moleculares para o diagnóstico de <i>Salmonella</i>	18
2.4	O uso dos cartões FTA [®] para o transporte de DNA sem risco biológico	22
2.5	<i>Salmonella</i> e a resistência aos antimicrobianos	24
2.6	Referencias bibliográficas	25
3	CAPÍTULO I: Uso dos cartões FTA para o transporte de amostras de DNA de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de produtos avícolas do Sul do Brasil	32
4	CAPÍTULO II: Assignment of serotype to <i>Salmonella enterica</i> isolates obtained from poultry and their environment in Southern Brazil	47
5	CAPÍTULO III: Presence of <i>Salmonella</i> Enteritidis and <i>Salmonella</i> Gallinarum in commercial laying hens diagnosed with Fowl Typhoid Disease in Colombia	63
6	CAPÍTULO IV: Serotyping and Determination of Antimicrobial Resistance of <i>Salmonella</i> Isolates from Poultry Vertical Integrations of Colombia	82
7	CAPÍTULO V: Serotype and Antimicrobial Resistance Patterns of <i>Salmonella</i> Isolates from Commercial Birds and Poultry Environment in Mississippi.	108
8	Considerações e conclusões finais	132
APÊNDICE A:	Proposta para a preservação da coleção de bactérias do CDPA: Bacterioteca- <i>Salmonella</i>	135
APÊNDICE B:	Use of Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) for serotyping <i>Salmonella</i> obtained from poultry and their environment. Proceedings AAAP meeting 2012. San Diego-CA. USA.	166
APÊNDICE C:	Characterization of <i>Salmonella</i> isolates from commercial layers of Colombia using an Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) method. Proceedings Poultry Scientific Forum (SCAD) 2013. Atlanta, GA. USA.	167
APÊNDICE D:	Use of intergenic sequence ribotyping (ISR) for serotyping <i>Salmonella</i> obtained from commercial birds and poultry environment in Mississippi and determination of their antibiotic resistance patterns. Proceedings AAAP meeting 2013. Chicago. USA.	168

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos produtos avícolas com *Salmonella* é uma grande ameaça para este setor, tanto do ponto de vista de saúde pública, devido à possibilidade de causar doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em seres humanos, como do ponto de vista econômico, devido às perdas ocasionadas pela enfermidade (Salmonelose) nas aves. Estas perdas econômicas são representadas na queda da postura, diminuição do ganho de peso, mortalidade e, em alguns casos, à adoção de medidas conforme os regulamentos de cada país, como o sacrifício de um lote quando verificada a presença de *Salmonella Gallinarum* (SG) ou *Pullorum* (SP) (BRASIL, 2003; GAST, 2008; Brasil, 2013).

A indústria avícola enfrenta muitos desafios, e um dos mais importantes é a crescente demanda dos consumidores por um produto de alto valor nutritivo, econômico e inofensivo à saúde humana. Estas exigências refletem em um maior cuidado com o estado de saúde de um lote de aves. A presença de *Salmonella* afeta negativamente a indústria avícola, e o surgimento de linhagens de bactérias resistentes aos antimicrobianos emerge como um dos grandes problemas da indústria avícola atual (OIE, 2009; NASCIMENTO; BORSOI, 2010).

No Brasil, segundo os dados fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde, dos 2834 surtos de DTAs registrados de 1999 a 2007, 42% foram causados pelos diferentes sorovares de *Salmonella* spp. Conforme os dados publicados pela ANVISA em 2007, 460 pessoas foram acometidas por *Salmonella* spp., sendo que 378 destes casos estavam relacionados com o consumo de carne de aves ou ovos (NASCIMENTO; BORSOI, 2010). Nos EUA, em 2011, a *Salmonella* nontyphoidal foi identificada como a segunda maior causa (depois de norovírus) de doenças transmitidas por alimentos e como a principal causa de hospitalização e morte (SCALLAN *et al.*, 2011).

Salmonella Enteritidis é considerado o sorovar mais comumente isolado nos casos de salmonelose. Esta bactéria é capaz de colonizar o sistema reprodutivo das aves, contaminando os ovos muitas vezes sem produzir doença nas aves (MORALES *et al.*, 2006; GANTOIS *et al.*, 2009; GUARD *et al.*, 2009), sendo este um desafio para as estratégias de controle dos microrganismos patogênicos. Além de *S. Enteritidis* existem outros sorovares que podem causar doença nos seres humanos e nos animais, como *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, e as salmonelas que causam doenças somente nas aves: *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Recentemente foi relatado por Hennessy *et al.*, (2004) que sorovares prevalentes no ambiente, como *S. Heidelberg*, estão relacionados com a contaminação de ovos.

Considerando que o Brasil é um dos maiores exportadores de carne de frango do mundo, existe no país um grande compromisso no controle e erradicação desta doença, aplicando normas de controle de salmonelas, referidos no Plano Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 2001; BRASIL, 2003; BRASIL, 2008; BRASIL, 2013). Por seu turno, a Colômbia está iniciando o processo de certificação de granjas livres de *Salmonella* e está revendo a legislação em vigor (CONPES, 2007).

Porém, um dos principais obstáculos para os dois países é a ausência de ferramentas de diagnóstico para identificar com rapidez e segurança os sorovares de *Salmonella* envolvidos nos surtos. A ribotipificação de sequências intergênicas (ISR, por sua sigla em Inglês) é uma técnica desenvolvida pela Egg Safety and Quality Research Unit, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA-ARS-ESQRU) para sorotipificar isolados de *Salmonella enterica*. A ISR é uma técnica específica, sensível, com alto poder discriminatório e alta repetitividade, que oferece a grande vantagem de ter um tempo de retorno para os resultados de no máximo três dias (GUARD *et al.*, 2012). A caracterização de isolados de *Salmonella* é a base para a compreensão da ecologia dessa bactéria, fornecendo informações importantes para a formulação de futuros estudos epidemiológicos que procurem identificar estirpes de uma região ou país. Além disso, o conhecimento dos resultados desta pesquisa trará benefícios para a indústria avícola, pois a caracterização das cepas isoladas de aves poderá ser utilizada como informação base no desenvolvimento e adaptação dos programas de controle.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Etiologia

O gênero *Salmonella* pertencente à família *Enterobacteriaceae*. A classificação reconhecida atualmente inclui duas espécies: *Salmonella enterica* (com seis subespécies) e *Salmonella bongori*. A bactéria conhecida como *Salmonella subterranea* ainda não é reconhecida como espécie. No ano 2007, o Instituto Pasteur descreveu 2.557 sorovares através do esquema Kauffmann-White-LeMinor (KWL) para caracterizar os diferentes sorotipos do gênero com base em suas fórmulas antigênicas (GRIMONT; WEIL, 2007). Já no ano 2010, o suplemento 47 (2003 – 2007) desse instituto relatou a caracterização de 70 sorovares a mais (GUIBOURDENCHE *et al.*; 2010).

A espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* inclui bactérias móveis e imóveis com uma grande variedade de hospedeiros. O habitat natural da salmonela pode ser dividido

em três categorias, com base na especificidade do hospedeiro e padrão clínico por ele determinado: altamente adaptadas ao homem, incluindo *S. Typhi* e *S. Paratyphi A, B e C*, agentes da febre entérica e altamente adaptadas aos animais: *S. Dublin* (bovinos), *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* (suínos). A terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem o homem e animais, designadas salmonelas zoonóticas, responsáveis por doenças de transmissão alimentar, de distribuição mundial. (GAST, 2008; RODRIGUES, 2011).

O tifo aviário e pulorose são causados por sorovares específicos, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, respectivamente, enquanto que o paratifo aviário é causado por sorovares não restritos às aves, sendo detectados na maioria das espécies animais utilizados para consumo humano, além de animais silvestres e domésticos (GAST, 2008; SHIVAPRASAD, H.L.; BARROW, 2008; BERCHIERI; OLIVEIRA, 2009).

2.2. Importância da salmonelose na saúde pública

O tifo aviário e a pulorose foram uma das causas mais comuns de doença com alta mortalidade em galinhas, resultando no retardo do desenvolvimento da indústria avícola. Com o controle destes sorovares (principalmente *S. Pullorum*), que em muitas regiões do mundo estão erradicados ou sob controle, ocorreu um maior progresso técnico e científico da avicultura industrial. Por outro lado, foram registrados casos de salmonelose em humanos, relacionados com sorovares paratíficos isolados de aves, sendo *S. Enteritidis* considerado o agente etiológico mais importante nas doenças de origem alimentar (MEAD *et al.*, 2010).

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexas em sua epidemiologia e controle, com padrões diferenciados de acordo com diversos fatores numa região como às diferenças nos hábitos alimentares, práticas de elaboração de alimentos, criação de animais e padrões de higiene e saneamento. O controle das salmoneloses representa um desafio para a saúde pública, considerando a emergência de novos sorovares e a reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países emergentes quanto naqueles industrializados (Rodrigues, 2011).

Embora a *S. Enteritidis* fagotipo 4 seja o agente etiológico mais importante do paratifo aviário, os sorovares *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, entre outros, também foram isolados de pacientes acometidos por salmonelose (BERCHIERI; OLIVEIRA, 2009; CDC, 2013).

Os esforços para o controle da *Salmonella* são muitas vezes dificultados pela diversidade de sorovares. As variações na frequência de isolamento desta bactéria estão relacionadas com a eficiência das medidas de controle aceitas conforme a regulamentação

e com o nível de biossegurança adotado em cada país. Devido ao grande número de variáveis envolvidas na cadeia de produção, torna-se difícil padronizar os níveis de *Salmonella* presentes nos aviários que devem ser aceitos, uma vez que estes dados podem interferir com as normas de comércio internacional (MEAD *et al.*, 2010).

Os produtos de origem avícola são considerados importantes fontes de contaminação de *Salmonella* para o homem, mas o número de casos confirmados que foram provocados pelo consumo destes produtos é difícil de quantificar. Com a finalidade de desenvolver métodos de diagnósticos que possam ser utilizados mundialmente, é preciso levar em conta as análises de dados dos surtos, os estudos caso-controle e as possíveis fontes da doença. Grandes esforços têm sido feitos, mas não existe um critério unificado, porque o que pode ser eficaz em um país pode não ser para outro (MEAD *et al.*, 2010).

Outro aspecto relacionado com a presença de *Salmonella* que tem um impacto negativo na saúde pública é a apresentação de resíduos de antimicrobianos na carne de frango e nos ovos. Atualmente é crescente a preocupação mundial quanto a resistência aos antimicrobianos adquirida por bactérias deste gênero. Nas explorações de frango de corte, são usados alguns antimicrobianos como promotores de crescimento, sendo os mesmos adicionados às rações em doses contínuas e subterapêuticas; esse uso pode levar a uma pressão seletiva que propicia o aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos, provocando o que atualmente é considerado um problema de saúde pública mundial, devido ao risco de disseminação de patógenos e de elementos móveis (genes de resistência transferíveis, plasmídeos e transposons) (LEVY *et al.*, 2004; MIRIAGOU *et al.*, 2006) via cadeia alimentar, para microrganismos patogênicos ou comensais humanos, diminuindo as opções de tratamento nas infecções (BRASIL, 2004; MANTILLA *et al.*, 2010; MEDEIROS, 2011).

2.3. Técnicas moleculares para o diagnóstico de *Salmonella*

Na maioria dos países, o diagnóstico da salmonelose é baseado em testes microbiológicos e sorológicos que podem demorar dias até que se obtenha o resultado. Além disto, muitas vezes pode-se não chegar a uma identificação do agente. Atualmente, sabe-se que a maioria dos surtos é causada por cepas específicas. Por esta razão, diversos estudos têm demonstrado a necessidade da utilização de técnicas moleculares com alto poder de discriminação para a investigação destes micro-organismos (OLIVEIRA, 2005; GAST, 2008).

Diferentes testes têm sido empregados para a caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* spp., sendo que caracterizações mais precisas requerem a utilização simultânea de diferentes métodos. Neste contexto, o diagnóstico molecular surge como uma alternativa para a caracterização dos agentes causadores de doenças, podendo ser aplicado em conjunto com os testes bioquímicos e sorológicos (OLIVEIRA, 2005).

A diferenciação específica entre os sorovares utilizando-se o esquema Kauffmann-White-Le Minor (KWL), baseado na combinação de antígenos somáticos e flagelares pode ser difícil, pois muitos deles compartilham as mesmas características fenotípicas. Esta diferenciação pode ser ainda mais difícil quando mais de um sorovar está presente em uma mesma amostra. Considerando-se estes problemas, torna-se necessário a utilização de um método de diagnóstico que permita a identificação rápida, eficiente e específica dos sorovares que causam a salmonelose (MORALES *et al.*, 2006; GRIMONT; WEIL, 2007; GUARD *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) permitiu a identificação rápida e a classificação efetiva dos agentes patogênicos causadores de doenças, tornando-se uma ferramenta valiosa para a microbiologia. A PCR tem sido aplicada com sucesso em estudos epidemiológicos, pois permite a tipificação simultânea de vários isolados de uma maneira simples e rápida. Existem diversas técnicas para pesquisa de diferentes regiões no genoma microbiano, mas nem todos são igualmente eficazes, diferenciando-se principalmente na especificidade da reação. Algumas delas apresentam baixa reprodutibilidade, que pode estar relacionada com as diferenças na execução, uma vez que qualquer alteração nas condições da reação pode alterar os resultados (OLIVEIRA, 2005; MORALES *et al.*, 2006). A escolha da técnica a ser empregada depende de fatores como tempo e facilidade de execução, além da clareza na interpretação. Porém, aliado a estes fatores, também se deve priorizar metodologias com alto poder de discriminação e reprodutibilidade ótima (MANTILLA, 2010).

A biologia molecular tem sido utilizada mundialmente para a identificação e caracterização efetiva de *Salmonella*. O Centro de Diagnóstico e Pesquisa Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA - UFRGS) possui uma linha de trabalho com biologia molecular aplicada ao diagnóstico de *Salmonella* desde 1997. Nesta linha de pesquisa, são utilizados métodos de diagnóstico molecular para a pesquisa de diferentes características desta bactéria. Até o momento, já foram analisados mais de 200 isolados de *Salmonella* provenientes de aves, dos quais a maior porcentagem corresponde ao sorovar *S.*

Enteritidis. Além disso, já foram publicadas informações importantes a respeito das cepas isoladas de produtos avícolas no estado de Rio Grande do Sul.

Os estudos usando estes métodos foram iniciados por PONTES (1999), quando avaliou e comparou a sensibilidade e a especificidade da técnica microbiológica convencional com a PCR para a detecção de *Salmonella* spp. Posteriormente, LOVATO *et al.*, (2001) usaram a PCR para a detecção de *Salmonella* spp. em ovos com e sem casca, para avaliar se as substâncias presentes na casca influenciariam a reação. SANTOS *et al.* (2001) avaliaram a PCR em relação a sua especificidade, seletividade e sensibilidade para a pesquisa do gene *invA*. Em 2002, OLIVEIRA *et al.*, desenvolveram um ensaio para a detecção de *Salmonella* spp e a identificação de *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*.

Também em 2002, SANTOS *et al.*, conduziram um estudo que objetivou padronizar a RAPD/PCR (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e identificar fagotipos de amostras de *S. Enteritidis* isoladas de materiais de origem avícola, de alimentos e de material biológico de humanos envolvidos em casos de toxinfecções alimentares (SANTOS *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2008). LOVATO *et al.*, (2003) analisaram a contaminação por *Salmonella* em sessenta amostras de ovos do tipo colonial através da PCR.

RIBEIRO (2008) realizou um experimento com 42 cepas de *S. Enteritidis* resistentes ao ácido nalidíxico e isoladas de amostras clínicas, suabes de arrasto, carcaças de frangos de corte e matrizes nas regiões nordeste e sul de Brasil com o propósito de detectar a mutação no gene *gyrA*. BORSOI *et al.*, (2009) avaliaram 65 amostras de *S. Heidelberg* utilizando as técnicas de PCR e eletroforese em campo pulsado (PFGE) para identificação das diferenças entre estas cepas. A pesquisa de fatores associados à virulência de *S. Hadar* através da PCR em 41 isolados provenientes de materiais de origem avícola encontrou quatro perfis genéticos diferentes para os sete genes de virulência avaliados (*agfA*, *avrA*, *hilA*, *invA*, *lpfA*, *sopE* e *spvC*) (CESCO, 2010).

Recentemente, BORGES (2011), também utilizando a PCR, pesquisou genes associados à virulência em cepas de *S. Enteritidis* isoladas de produtos avícolas e PERDONCINI (2011) determinou a presença de *Salmonella* spp. em granjas de postura em processo de certificação para produção orgânica no Rio Grande do Sul usando a eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Todos os trabalhos conduzidos pelo grupo de pesquisa em *Salmonella* do CDPA concluem que o diagnóstico molecular tem uma alta sensibilidade e especificidade, e que os resultados são obtidos em um menor período de tempo, quando comparado ao processo

microbiológico normal. Desta forma, estes testes podem ser usados com sucesso na detecção e caracterização de *Salmonella* em amostras provenientes de produtos avícolas.

Na Colômbia, em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa em *Salmonella* vinculado ao Laboratório de Patologia Aviária da Universidade Nacional da Colômbia (LPA-UN), a PCR alelo-específica tem sido usada para caracterizar as salmonelas aviárias do grupo D₁. Esta técnica está baseada na identificação do gene *rfbS* que codifica a enzima *paratose syntetase*, que atua na síntese da parede celular das bactérias. Baseando-se no polimorfismo de nucleotídeos específicos (SNPs) para *S. Pullorum* (SP) e *S. Gallinarum* (SG) presentes neste gene, procura-se obter a diferenciação entre SP e SG (SHA *et al.*, 2005; MANTILLA; PULIDO, 2009; MANTILLA, 2010).

Os métodos moleculares têm substituído os fenotípicos como forma de confirmar a proximidade entre cepas de bactérias envolvidas em um surto. O genoma da *Salmonella* tem sido analisado utilizando-se diferentes técnicas moleculares como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), tipificação multilocus (MLSP), polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (RFLP), amplificação de elementos palindrômicos extragênicos repetitivos (Rep-PCR), ribotipagem e hibridização por microarranjos (DNA-DNA hybridization microarray). Estes métodos detectam heterogeneidades entre as cepas do mesmo sorovar, mas não estabelecem uma correlação confiável entre o fenótipo e o genótipo. A análise das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) que separam o DNA do gene ribossomal (gene rRNA) atinge um outro nível de discriminação. No entanto, os genes rRNA são altamente conservados, sendo úteis para a diferenciação entre sorovares de *S. enterica* (LIEBANA *et al.*, 2001; SWAMINATHAN *et al.*, 2001; LIEBANA, 2002; JASPERS; OVERMANN, 2004; CHIU *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 2005; SUKHNANAND *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 2006; Guard *et al.*, 2012).

A maioria das técnicas moleculares atualmente utilizadas para a detecção de *Salmonella* baseia-se no fato de que as bactérias deste gênero possuem sete cópias do gene ribossomal (rRNA), sendo que destas, seis possuem um arranjo 16S-23S-5S (HELM *et al.*, 2004). Vários estudos têm focado na ISR 16S-23S, mas outros têm observado o alto poder de discriminação da ISR 23S-5S (ZHU *et al.*, 1996; HERPERS *et al.*, 2003).

Em estudo realizado por Morales *et al.* (2006), foi analisada a sequência dos 183 pares de bases existente entre o final do gene 23S *rlH* rRNA e o início do gene 5S rRNA *rrfH* (ISR-1), e os 197 pares de bases entre o final do gene rRNA *rrfH* e o início do gene de transferência RNA *aspU* (ISR-2) de *Salmonella enterica* de aves comerciais. As cepas estudadas incluíam *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovares. Enteritidis,

Typhimurium, Pullorum, Heidelberg, Gallinarum, Typhi e Choleraesuis. As sequências identificadas permitiram a organização de três grupos, o primeiro formado por os sorovares Pullorum, Gallinarum e Enteritidis, o segundo formado por Typhimurium e Heidelberg e o terceiro por os sorovares Newport, Paratyphi A e Typhi. Posteriormente, a identificação de genes relacionados com a ilha de patogenicidade 2 (SPI-2) diferenciou os sorovares adaptados para as aves (*S. Pullorum* e *S. Gallinarum*). Um achado interessante deste estudo sugere que os sorovares Heidelberg e Choleraesuis compartilham tendências de evolução com os sorovares contaminantes de ovos, conceito que abre uma grande possibilidade de que possam ter potencial zoonótico.

Este trabalho demonstrou a necessidade de se ter uma análise detalhada das cepas envolvidas em surtos de *Salmonella*, a fim de se obter o máximo de informações sobre possíveis mudanças em sua epidemiologia, permitindo que sejam feitas diferentes abordagens para a compreensão do seu impacto em saúde pública e na saúde das aves. Portanto, destaca a necessidade de ter novas e melhores ferramentas para o diagnóstico e controle desta doença (MORALES *et al.*, 2006).

Baseados neste trabalho, a equipe da USDA-ARS-ESQRU recentemente desenvolveu o teste de ribotipificação de sequências Intergênicas, como um método rápido para sorotipagem. Os resultados obtidos com a análise de várias cepas isoladas de produtos avícolas indicam que o sequenciamento de uma região de aproximadamente 500 bp entre o gene ribossomal 5S e as regiões vizinhas do gene *dkgB* (Figura 1) pode ser usado para a caracterização da *Salmonella* com maior especificidade e sensibilidade do que o método KWL (MORALES *et al.*, 2006; GUARD *et al.*, 2012). Estes resultados também mostraram que este teste possui um custo menor do que outros métodos de sorotipificação molecular e, portanto, é mais aplicável ao estudo de várias colônias de *Salmonella*. Um aspecto importante a se destacar é que estas investigações têm demonstrado que muitas culturas são compostas por mais de um sorovar, e que muitas vezes não são reconhecidos por testes que escolhem uma colônia para sorotipagem (GUARD *et al.*, 2012).

2.4. O uso dos cartões FTA[®] para o transporte de DNA sem risco biológico

Os cartões FTA (*Flinders Technology Associates - FTA[®] Cards for DNA Analysis*), desenhados para o transporte do DNA de amostras, baseiam-se no uso de um papel filtro de celulose impregnado com uma fórmula química patenteada, que produz a lise das membranas celulares dos microrganismos a partir da desnaturação das suas proteínas. Os ácidos nucleicos são fisicamente retidos nestes cartões e estabilizados para o armazenamento em temperatura

ambiente (WHATMAN, 2006). Os cartões FTA também protegem os ácidos nucleicos da presença de agentes inibidores (nucleases), da oxidação, de danos por raios UV e de ataques bacterianos ou fúngicos.

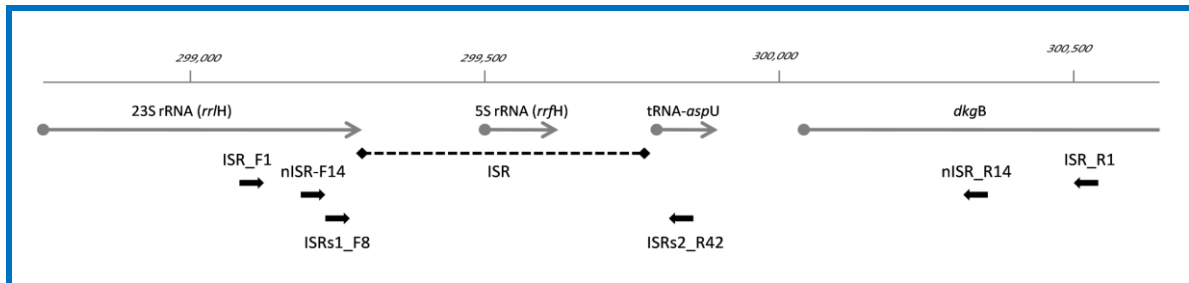


Figura 1: Região espaçadora intergênica: Região de aproximadamente 500 pb entre o gene ribossomal 5S e as regiões vizinhas do gene *dkgB* (MORALES *et al.*, 2006; GUARD *et al.*, 2012).

Diversas pesquisas no mundo empregam os cartões para a coleta de amostras de DNA, assim evitando-se o risco biológico do transporte deste material até os laboratórios de diagnóstico. Desta forma, o envio de amostras de campo em cartões FTA, acondicionados em embalagens com fechamento hermético, torna-se uma ferramenta viável e útil.

Neste contexto, MOSCOSO *et al.* (2004) selecionaram cartões FTA para a coleta de líquido alantóide de ovos embrionados contendo o vírus da bronquite infecciosa (IBV- *Infectious Bronchitis Virus*), inativado ao entrar em contato com o material do cartão. A inatividade do vírus acondicionado foi comprovada a partir da incapacidade do micro-organismo de propagar em ovos embrionados de galinha. Contudo, a prova de RT-PCR do gene S1 do IBV mostrou que o RNA viral manteve-se estável após o armazenamento durante no mínimo 15 dias. O uso da técnica neste caso mostrou ser segura, barata e adequada para o diagnóstico molecular.

O mesmo grupo de pesquisadores avaliou a viabilidade do uso de impressões de fígado em cartões FTA para a coleta, inativação e análise molecular de adenovírus de origem aviária. Neste estudo, a inativação do adenovírus sorotipo 1 foi comprovada a partir da não formação de efeito citopático do vírus quando inoculado em cultivos primários de órgãos de aves SPF. O DNA de adenovírus estocado à temperatura de 20 °C manteve-se viável por 198 dias (MOSCOSO *et al.*, 2006). Outros trabalhos citados na literatura utilizam os cartões FTA para o transporte de amostras de diferentes vírus - doença de Gumboro, doença de Marek e doença de Newcastle - e de diferentes bactérias como salmonelas e micoplasmas.

(MOSCOSO *et al.*, 2004; MOSCOSO, 2006; MOSCOSO *et al.*, 2007; MONTIEL; GIMENO, 2009; NARAYANAN, *et al.*, 2010).

LAMPEL *et al.* (2000) aplicaram amostras de diversas bactérias - *Shigella flexneri*, *S. Typhimurium*, e *Listeria monocytogenes* - em cartões FTA e os usaram como modelos para demonstrar a sua aplicabilidade na PCR como teste de detecção. Com culturas puras, as sensibilidades de detecção por PCR usando os cartões FTA foram de 30 a 50 e 200 UFC para bactérias entéricas gram-negativas e *L. monocytogenes*, respectivamente. Os pesquisadores concluíram que o uso dos cartões FTA como método universal para o transporte de amostras de células bacterianas e posterior realização da PCR é rápida, altamente sensível e reduz a interferência associada à presença de inibidores. Além disso, sua ampla aplicabilidade elimina a necessidade de múltiplos métodos para análise de matrizes de alimentos.

Ao contrário de amostras clínicas, o isolamento de DNA de amostras de alimentos, particularmente a partir de produtos frescos e recém-coletados, pode influenciar o resultado da PCR na detecção de patógenos e interferir negativamente na sensibilidade e na especificidade dos métodos moleculares (ANDREWS-POLYMENIS *et al.*, 2009). Chua e Bhagwat (2009) compararam a técnica de isolamento do DNA em cartões FTA com dois procedimentos de extração do DNA comercialmente disponíveis. Os métodos foram avaliados utilizando-se a PCR em tempo real (RT-PCR) a partir de amostras de *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes*. As duas bactérias foram detectadas com sucesso a partir de produtos frescos artificialmente inoculados com os dois micro-organismos em baixo número de células (nível antes do enriquecimento: 4 a 7 UFC por 25 g). O protocolo FTA apresentou menor interferência de produtos que contêm inibidores da PCR, além da maior simplicidade, biossegurança e melhor rendimento.

2.5. Salmonella e a resistência aos antimicrobianos

A utilização de agentes antibacterianos em animais é crítica para a manutenção da sua saúde e bem-estar, geralmente os antibacterianos são necessários para libertar os animais de dor e sofrimento, mas a utilização destes produtos em alimentos para animais tem também um risco para o consumidor. Recentemente, tem havido uma preocupação crescente sobre o uso de antibióticos em animais, porque muitas vezes os alimentos de origem animal podem ter bactérias, tais como *Salmonella spp.* e *Campylobacter jejuni*, resistentes aos antibióticos (BRASIL, 2004; RIBEIRO, 2007; HUR *et al.*, 2012).

Sempre que um animal ou ser humano é exposto a um agente antimicrobiano, existe certo grau de seletividade para uma população de bactérias resistentes. Esta seleção depende

do tipo de antimicrobiano utilizado, o número de indivíduos tratados, a dosagem e a duração do tratamento. Assim, é vital limitar a utilização de agentes antimicrobianos em animais e seres humanos (MIRIAGOU *et al.*, 2006; MANTILLA *et al.*, 2010; HUR *et al.*, 2012).

Atualmente, os consumidores de produtos de origem animal são muito mais exigentes com a segurança alimentar e, acima de tudo, há uma maior consciência da importância da contaminação da carne de frango e ovos com substâncias antibacterianas (LEVY *et al.*, 2004; GUARD-BOULDIN *et al.*, 2007).

A maioria das infecções por *Salmonella* são atribuídas ao consumo de alimentos de origem animal tais como ovos, carne de frango, carne de porco, etc. As doenças causadas por essa bactéria frequentemente necessitam de terapia antimicrobiana para auxiliar na eliminação da infecção. Com isso, um problema potencial é o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. Assim, existe uma preocupação crescente ao longo dos últimos 30 anos sobre a emergência mundial de fenótipos multirresistentes entre os sorotipos de *Salmonella* como *S. Typhimurium* DT104 e *S. Enteritidis* PT4, entre outros (DORAN *et al.*, 2007; HUR *et al.*, 2012). É de particular importância a emergência de resistência às quinolonas (enrofloxacina e ciprofloxacina) e às cefalosporinas de espectro estendido (ceftiofur e ceftriaxona) (FRYE *et al.*, 2007; GUARD-BOULDIN *et al.*, 2007; MANTILLA *et al.*, 2010). Recentemente, foi relatada nos EUA uma tendência ao aumento da ocorrência de salmonelas resistentes a estes antibióticos (NARMS, 2012; NARMS 2013).

A aquisição da resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de aves comerciais é considerada na atualidade como um grave problema de saúde pública. Assim o acompanhamento do desenvolvimento dessa resistência é importante para garantir o uso criterioso de produtos antimicrobianos em animais, para evitar o surgimento de bactérias multirresistentes.

2.6. Referencias bibliográficas

1. Andrews-Polymenis, H; Santiviago, C; McClelland, M. 2009. Novel genetic tools for studying food borne *Salmonella*. *Curr Opin Biotechnol.* 20(2): 149–157. doi:10.1016/j.copbio.2009.02.002.
2. Berchieri, A; Neto O. 2009. Salmoneloses. Em *Doenças das aves*. 2ª. Edição. FACTA. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 435-454 pp.

3. Borges, K, 2011. Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* enteritidis através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias, UFRGS.
4. BRASIL, 2001, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 44, de 23 de agosto 2001.
5. BRASIL, 2003, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. Normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e livres ou controladas para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*
6. BRASIL,2004. ANVISA Programa Nacional de Monitoramento da Prevalencia e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF) – Manual de procedimentos,
7. BRASIL, 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Manual de procedimentos para implementação do plano de vigilância e controlo de Salmonelas em bandos de galinhas poedeiras por parte do operador industrial. Plano Nacional de Vigilância e Controlo de Salmonelas em galinhas poedeiras para 2008-2010.
8. BRASIL, 2013, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 10, de 11 de Abril de 2013. Programa de gestão de risco diferenciado, baseado em vigilância epidemiológica e adoção de vacinas, para os estabelecimentos avícolas considerados de maior susceptibilidade à introdução e disseminação de agentes patogênicos no plantel avícola nacional e para estabelecimentos avícolas que exerçam atividades que necessitam de maior rigor sanitário.
9. CDC-2010. Centers for Disease Control and Prevention. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs. <http://www.cdc.gov.salmonella/outbreaks.html>. Accessed September 20, 2010.
10. CDC-2013. Centers for Disease Control and Prevention. Subject: Reports of Selected *Salmonella* Outbreak Investigations. (2010-2013). Accessed Jun 2013. <http://www.cdc.gov.salmonella/outbreaks.html>. 2013.

11. Cortes, A; Montiel, E; Gimeno I. Validation of Marek's Disease Diagnosis and Monitoring of Marek's Disease Vaccines from Samples Collected in FTA® Cards. Avian Dis, 53(4):510-516. 2009.
12. Cesco, M; 2010. Pesquisa de fatores associados a virulência de *Salmonella* Hadar através da reação em cadeia da polimerase (PCR), Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias, UFRGS.

13. COLOMBIA, 2007. Política Nacional de Sanidad e Inocuidad para la Cadena Avícola. Documento CONPES 3468. Consejo Nacional de Política Económica y Social. República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación.
14. Chua, T; Bhagwat, A. 2009. A Rapid and Simple DNA Extraction Procedure to Detect *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* from Fresh Produce Using Real-time PCR.
15. Doran, G., M. NiChulain, N. DeLappe, C. O'Hare, G. Corbett-Feeney, and M. Cormican. Interpreting streptomycin susceptibility test results for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:538-540. 2006.
16. Freitas, J. 2011. Evolução de sorovares Modelo de Banco de Cepas. MAPA. Anais “Seminário internacional sobre Salmonellosis aviar”. ALA-UBABEF. Rio de Janeiro 28-30 de junho de 2011.
17. Frye, J. G., and P. J. Fedorka-Cray. Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30:134-142. 2007.
18. Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Gast, T. J. Humphrey, and F. Van Immerseel. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:718-738. 2009.

19. Gast, R. 2008. Paratyphoid infections. *Diseases of Poultry*. 12⁰Ed. American Association of Avian Pathologist.
20. Grimont, P; Weil, F. 2007. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. World Health Organization WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur. 9th edition. 6 P.
21. Guard-Bouldin, J. and R. J. Buhr. Evaluation of eggshell quality of hens infected with *Salmonella enteritidis* by application of compression. *Poult Sci* 85(1):129-135. 2006.
22. Guard-Bouldin, J., C. A. Morales, J. G. Frye, R. K. Gast, and M. Musgrove. Detection of *Salmonella enterica* subpopulations by phenotype microarray antibiotic resistance patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7753-6. 2007.
23. Guard, J. 2011. Improving food safety by understanding the evolution of egg-contaminating *Salmonella* Enteritidis. *Memorias XXX Seminario internacional de Amevea*.
24. Guard, J., R. Sanchez-Ingunza, C. Morales, T. Stewart, K. Liljebjelke, J. Van Kessel, K. Ingram, D. Jones, C. Jackson, P. Fedorka-Cray, J. Frye, R. Gast, and A. Hinton, Jr. Comparison of *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett.* 337:61-72. 2012.

25. Guibourdenche, M; Roggentin, P; Mikoleit, M; Fields, P; Bockemuhl, J; Grimont, P; Weill, F. 2010. Supplement 2003e2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Institut Pasteur. Research in Microbiology 161: 26-29.
26. Helm RA, Porwollik S, Stanley AE, Maloy S, McClelland M, Rabsch W & Eisenstark A. 2004. Pigeon-associated strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT2 have genomic rearrangements at rRNA operons. Infect Immun 72: 7338–7341.
27. Hennessy TW, Cheng LH, Kassenborg H. 2004 Egg consumption is the principal risk factor for sporadic *Salmonella* serotype Heidelberg infections: a case–control study in foodnet sites. Clin Infect Dis 38: (Suppl 3): S237–S243.
28. Herpers, B; Jongh, B; Zwaluw, K; Hannen, 2003. Real-Time PCR Assay Targets the 23S-5S Spacer for Direct Detection and Differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. Jour. of clinical microb. Vol. 41, No. 10, p. 4815–4816.
29. Hur, j., Jawale, C, Lee, J 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. Food Research International 45: 819-830.
30. Jaspers E.; Overmann J 2004 Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. Appl Environ Microbiol 70: 4831–4839.
31. Levy, D. D., B. Sharma, and T. A. Cebula. Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a mutator phenotype. Antimicrob. Agents Chemother. 48:2355-2363. 2004.
32. Liebana E, Garcia-Migura L, Breslin MF, Davies RH & Woodward MJ 2001. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. J Clin Microbiol 39: 154–161
33. Liebana E. 2002. Molecular tools for epidemiological investigations of *S. enterica* subspecies *enterica* infections. Res Vet Sci 72: 169–17.
34. Lovato, M; Nascimento, V; Troglia, I; Santos, L; Pontes, A; Salle, T, Lopes, RF. 2001. Métodos de extração de DNA para a detecção de *salmonela* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. Ciência rural, Santa Maria, v.31, n.2, p.315-318,
35. Mantilla, J; Pulido, M. 2009. Valoración de la situación actual de explotaciones de ponedoras comerciales con cuadros compatibles con Tifoidea Aviar en Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 22:3.

36. Mantilla, J; Pulido, M; Jaime, J. 2010. Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de Salmonella Grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia. *Rev.Med. Vet. Zoot.* 57:168-177.
37. Miriagou, V., A. Carattoli, and S. Fanning. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect.* 8:1923-1930. 2006.
38. Medeiros, M. 2011. Prevalência de *Salmonella* spp. e resistência antimicrobiana dos isolados em carcaças de frango congelado no varejo. Brasil, 2004 a 2006. Anais “Seminário internacional sobre Salmonellosis aviar”. ALA-UBABEF. Rio de Janeiro 28-30 de junho de 2011.
39. Mead, G; Lammerding, A; Cox, N; Doyle, M; Humbert, F; Kulikovskiy, A; Pinheiro do Nascimento, V; Wierup, M; Pulido, M; And the Salmonella on raw poultry writing committee. 2010. Scientific and Technical Factors Affecting the Setting of Salmonella Criteria for Raw Poultry: A Global Perspective. *Journal of Food Protection*, Vol. 73, No. 8, Pages 1566–1590.
40. Morales, C. A., R. Gast, and J. Guard-Bouldin. 2006. Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit *rrfH* of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett* 264:48-58.
41. Moscoso, H; Alvarado, I; Hofacre, C. 2006. Molecular Analysis of Infectious Bursal Disease Virus from Bursal Tissues Collected on FTA_ Filter Paper. *Avian DIS.* 50:391–396.
42. Morales C. A., M. Musgrove, T. J. Humphrey, C. Cates, R. Gast, and J. Guard-Bouldin 2007. Pathotyping of *Salmonella enterica* by analysis of single-nucleotide polymorphisms in *cyaA* and flanking 23S ribosomal sequences. *Environ Microbiol* 9:1047-1059.
43. Moscoso, H; Thayer, S; Hofacre, C, Kleven, S. 2004. Inactivation, Storage, and PCR Detection of Mycoplasma on FTA_ Filter Paper, *Avian Dis*, 48:841–850.
44. Moscoso, H; Raybon, E; Thayer, S; Hofacre, C. 2005. Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA filter paper. *Avian Dis.* 49:24–29.
45. Moscoso, H.; Bruzual, J.; Sellers, H; Hofacre, C. 2007. FTA_ Liver Impressions as DNA Template for Detecting and Genotyping Fowl Adenovirus. *Avian Dis.* 51:118–121.
46. NARMS 2012. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Retail Meat Report 2010. Accessed Jun 2013.
<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM312360.pdf>.
47. NARMS 2013. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Retail Meat Report 2011. Accessed Jun 2013.

<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM334834.pdf>

48. Nascimento, V.P., Borsoi, A. Salmonella: situação mundial. Memórias XII Seminário Internacional de Medicina Aviar. Universidad de Georgia - AMEVEA. 26 al 30 de abril de 2010. Athens, Georgia, USA.
49. OIE, 2009. Prevention, detection and control of *Salmonella* in poultry. Disponível em URL. http://www.oie.int/eng/normes/en_chapitre_1.6.5.pdf
50. Oliveira, S, Santos, L; Schucha, D; Silva, A; Salle, T; Canal, C. 2002. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. Veterinary Microbiology 87: 25–35
51. Oliveira, F, 2009, Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-Ribotipificação e RADP de *Salmonella* Enteritidis envolvidas em surtos de doenças veiculadas por alimentos ocorridas no Rio Grande do Sul nos anos 2001 e 2002. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS
52. Perdoncini, G, K, 2011. *Salmonella* spp. em granjas de postura em processo de certificação para produção orgânica no Rio Grande do Sul. Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias, UFRGS.
53. Pontes, A, 2001. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase(PCR) na detecção de *Salmonella* sp. em amostras ambientais de origem avícola (“swab” de arrasto), Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias, UFRGS.
54. PREBAF, 2007. 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.
55. Ribeiro, A, 2007. *Salmonella* Enteritidis de origem aviária: determinação de padrões de resistência antimicrobiana, detecção de mutação no gene *gyrA* de cepas resistentes ao ácido nalidixico, fagotipagem e ribotipagem. Tese doutorado em Ciências Veterinárias, UFRGS.
56. Rodrigues, D. 2011. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. Anais “Seminário internacional sobre Salmonellosis aviar”. ALA-UBABEF. Rio de Janeiro 28-30 de junho de 2011.
57. Santos, L; Nascimento, V; Oliveira, S; Flores, S; Pontes, A; Pilotto, F; Neves, N; Salle, T; Lopes, RF. 2001. Identificação de salmonella através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS. 29(2):87-92,
58. Santos, L; Ribeiro, A; Oliveira, A; Rodrigues, A; Flores, A; Lopes, RF; Nascimento, V. 2008.

RAPD/PCR and phage typing of *salmonella* enteritidis isolated from poultry and food poisoning outbreaks *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.75, n.1, p.91-94, jan./mar.

59. Scallan, E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, M. A. Widdowson, S. L. Roy, J. L. Jones, and P. M. Griffin. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17:7-15. 2011.
60. Shah H. D., Park, J. H., Cho, M. R., Kim, M. Ch., Chae, J. S. 2005. Allele-specific PCR method based on rfbS sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: serotype-specific rfbS sequence polymorphism. *Journal of Microbiological Methods* 60, 169–177.
61. Shivaprasad, H.L.; Barrow, P.A. 2008. Pullorum Disease and Fowl Typhoid. *Diseases of Poultry*. 12⁰Ed. American Association of Avian Pathologist.
62. Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD et al. (2005) DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. *J Clin Microbiol* 43: 3688–3698.
63. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB & Tauxe RV (2001). Pulsenet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 7: 382–389.
64. Thompson, J.D. et al. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positive-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, v.22, p.4673-4680, 1994.
65. Whatman, 2006. Applying and Preparing Bacteria on FTA[®] Cards for DNA Analysis. Whatman FTA Protocol BD02.
66. Zhu Q; Lim CK; Chan YN. 1996. Detection of *Salmonella* Typhi by polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 80: 244–251

3. CAPITULO I:

Uso dos cartões FTA para o transporte de amostras de DNA de *Salmonella* spp. isoladas de produtos avícolas do Sul do Brasil

Use of FTA Cards for the Transport of DNA Samples of *Salmonella* spp. from Poultry Products from Southern Brazil

Martha Pulido-Landínez^{1,2}, Vanessa Laviniki², Roxana Sánchez-Ingunza³, Jean Guard³
& Vladimir Pinheiro do Nascimento²

ABSTRACT

Background: The contamination of products with *Salmonella* is a major threat to the poultry industry because the possible transmission to humans and animals can produce a huge negative impact. The diversity of *Salmonella enterica* serotypes complicates the diagnostic systems and the transport of live cultures to the diagnostic labs may represent a biohazard. Current methods for serotyping using antibodies do not work well for many *Salmonella* serotypes and reagents are not often available. For these reasons, methods that assign serotype by the analysis of DNA are preferred. One step that is currently in development is streamlining methods for DNA submission to the laboratories for sequencing. For this purpose, we investigated filter papers commercially available (Flinders Technology Associates - FTA) to ship DNA samples. Filter papers are impregnated with a chemical formulation that lyses cells, immobilizes DNA, and protects it from degradation. The objective of this study was to assess the feasibility of the FTA cards for transporting *Salmonella* DNA samples in order to reduce biohazards and if they would yield enough DNA in quantity and quality for molecular analyses.

Material, Methods & Results: In this study 156 samples of *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis, Heidelberg, Hadar, Gallinarum, Typhimurium, Agona and Pullorum were isolated from poultry products and environments in southern Brazil. Samples were stored in the Avian Diagnostic and Research Center of the Federal University of Rio Grande do Sul. Following instructions for spotting cards with cell cultures at a density that visually matched a McFarland Turbidity Standard 0.5; they were shipped to the Agriculture Research Service of the United States Department of Agriculture (USDA-ARS, Athens, GA-USA), using FTA cards. Upon the reception of the cards, safety testing was performed by transferring one disk from each sample into 10 mL of brain heart infusion (BHI) tubes and incubated at 37°C for 24 h. The BHI tube that showed turbidity after incubation was transferred to brilliant green (BG) agar and incubated at 37°C for 24 h to 48 h. If colonies were obtained in BG, biochemical analyses were performed by using the Enterotube method. Only one sample (*S. Enteritidis*) showed turbidity in BHI, but any bacterial growth was observed in the BG agar. The average DNA concentration, as measured by spectrophotometry, was 42.32 (\pm 9.84) ng/ μ L and the average 280/260 ratio was 1.9 (\pm 0.09). All the analyzed samples were negative for live cultures of *Salmonella* and the DNA obtained was suitable for molecular testing.

Discussion: FTA cards can be used to transport DNA samples from pathogenic bacteria, reducing biohazards associated with shipping live cultures. The possibility of shipping DNA, in an economic and safe way, for testing samples at the laboratories facilitates the identification of *Salmonella enterica* serotypes that are circulating in the environment of poultry. Turbidity in BHI tubes that did not result in colonies on agar media may be caused by the presence of other contaminants such as environmental saprophytic microorganisms that may occurred during the process of handling the cards. DNA samples of *Salmonella enterica* shipped from Brazil to the United States for this set of isolates did not show bacterial growth. Thus the FTA cards provided safe and effective inactivation of the pathogen, and the DNA obtained from the cards were adequate for downstream analyses.

Keywords: FTA cards, *Salmonella enterica*, biohazard, PCR.

Descritores: cartões FTA, *Salmonella enterica*, risco biológico, PCR.

Received: April 2012

www.ufrgs.br/octavet

Accepted: July 2012

¹Universidade Nacional da Colômbia, Bogotá, Colômbia. ²Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ³Egg Safety and Quality Research Unit, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA-ARS-ESQRU) Athens, GA, USA. CORRESPONDENCE: M. Pulido-Landínez (mpulidola@unal.edu.co - Fax: +55 (51) 3308-6130). Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves n. 9090. CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

Uso dos cartões FTA para o transporte de amostras de DNA de *Salmonella* spp. isoladas de produtos avícolas do Sul do Brasil

Use of FTA Cards for the Transport of DNA Samples of *Salmonella* spp. from Poultry Products from Southern Brazil

Martha Pulido-Landínez^{1,2}, Vanessa Laviniki², Roxana Sánchez-Ingunza³, Jean Guard³ & Vladimir Pinheiro do Nascimento²

¹Universidade Nacional da Colômbia, Bogotá, Colômbia. ²Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ³Egg Safety and Quality Research Unit, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA-ARS-ESQRU) Athens, GA, USA. CORRESPONDENCE: M. Pulido-Landínez [mpulidola@unal.edu.co - Fax: +55 (51) 3308-6130]. Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves n. 9090. CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

Background: The contamination of products with *Salmonella* is a major threat to the poultry industry because the possible transmission to humans and animals can produce a huge negative impact. The diversity of *Salmonella enterica* serotypes complicates the diagnostic systems and the transport of live cultures to the diagnostic labs may represent a biohazard. Current methods for serotyping using antibodies do not work well for many *Salmonella* serotypes and reagents are not often available. For these reasons, methods that assign serotype by the analysis of DNA are preferred. One step that is currently in development is streamlining methods for DNA submission to the laboratories for sequencing. For this purpose, we investigated filter papers commercially available (Flinders Technology Associates - FTA) to ship DNA samples. Filter papers are impregnated with a chemical formulation that lyses cells, immobilizes DNA, and protects it from degradation. The objective of this study was to assess the feasibility of the FTA cards for transporting *Salmonella* DNA samples in order to reduce biohazards and if they would yield enough DNA in quantity and quality for molecular analyses.

Material, Methods & Results: In this study, 156 samples of *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis, Heidelberg, Hadar, Gallinarum, Typhimurium, Agona and Pullorum were isolated from poultry products and environments in southern Brazil. Samples were stored in the Avian Diagnostic and Research Center of the Federal University of Rio Grande do Sul. Following instructions for spotting cards with cell cultures at a density that visually matched a McFarland Turbidity Standard 0,5; they were shipped to the Agriculture Research Service of the United States Department of Agriculture (USDA-ARS, Athens, GA-USA), using FTA cards. Upon the reception of the cards, safety testing was performed by transferring one disk from each sample into 10 mL of brain heart infusion (BHI) tubes and incubated at 37°C for 24 h. The BHI tube that showed turbidity after incubation was transferred to brilliant green (BG) agar and incubated at 37°C for 24 h to 48 h. If colonies were obtained in BG, biochemical analyses were performed by using the Enterotube method. Only one sample (*S. Enteritidis*) showed turbidity in BHI, but any bacterial growth was observed in the BG agar. The average DNA concentration, as measured by spectrophotometry, was 42,32 (\pm 9,84) ng/ μ L and the average 280/260 ratio was 1,9 (\pm 0,09). All the analyzed samples were negative for live cultures of *Salmonella* and the DNA obtained was suitable for molecular testing.

Discussion: FTA cards can be used to transport DNA samples from pathogenic bacteria, reducing biohazards associated with shipping live cultures. The possibility of shipping DNA, in an economic and safe way, for testing samples at the laboratories facilitates the identification of *Salmonella enterica* serotypes that are circulating in the environment of poultry. Turbidity in BHI tubes that did not result in colonies on agar media may be caused by the presence of other contaminants such as environmental saprophytic microorganisms that may occurred during the process of handling the cards. DNA samples of *Salmonella enterica* shipped from Brazil to the United States for this set of isolates did not show bacterial growth. Thus the FTA cards provided safe and effective inactivation of the pathogen, and the DNA obtained from the cards were adequate for downstream analyses.

Keywords: FTA cards, *Salmonella enterica*, biohazard, PCR.

Descritores: cartões FTA, *Salmonella enterica*, risco biológico, PCR.

INTRODUÇÃO

A contaminação dos produtos avícolas com bactérias do gênero *Salmonella* é uma grande ameaça para este setor, porque existe a possibilidade de transmitir doenças aos seres humanos e por perdas econômicas para a avicultura como queda de postura, mortalidade, diminuição do ganho de peso e, em alguns casos, o sacrifício do lote quando verificada a presença de *S. Gallinarum* ou *S. Pullorum*, medida esta adotada devido à legislação de cada país [1,6].

Os cartões FTA[®] foram desenhados para o transporte de amostras de DNA ou RNA, para serem usadas posteriormente em testes de análises moleculares. Utilizam papel filtro impregnado com uma fórmula química, que produz lise das membranas celulares por desnaturação proteica. Os ácidos nucleicos são fisicamente retidos nestes cartões e estabilizados para o armazenamento em temperatura ambiente. Além disso, a amostra fica protegida da presença de agentes inibidores, oxidação, danos por raios UV e de ataques bacterianos ou por fungos [4,12,21].

Diversos pesquisadores têm usado os cartões para o transporte de DNA ou RNA para coletar amostras de doenças aviárias causadas por vírus (Bronquite Infecciosa, Gumboro, Marek e New Castle) e por bactérias como *Salmonella* e *Mycoplasma* [4,5,12-16].

Esta pesquisa visou estabelecer se o uso dos cartões FTA era viável para o transporte sem risco biológico de amostras de DNA de *Salmonella*, como também, se o DNA obtido tinha uma concentração e um grau de pureza adequada para a realização de testes moleculares e assim ser utilizado como uma ferramenta para futuras pesquisas e no diagnóstico molecular da salmonelose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, Brasil e na Egg Safety and Quality Research Unit, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA-ARS-ESQRU) em Athens, GA, USA.

No CDPA realizou-se a recepção, coleta, armazenamento e preparo para o transporte das amostras e no USDA-ARS-ESQRU foram realizados testes para estabelecer se as amostras presentes nos cartões foram inativadas ou não e se o DNA contido neles era viável para a realização de testes moleculares.

Realizou-se uma amostragem de conveniência, coletando 156 amostras de *Salmonella enterica ssp enterica*, sorovares Enteritidis, Heidelberg, Hadar, Gallinarum, Typhimurium,

Agona e Pullorum provenientes de produtos avícolas e seu ambiente de estabelecimentos avícolas do sul do Brasil, estocadas no CDPA durante os anos de 1996 até 2011.

A partir de um isolado estocado refrigerado ou congelado, cada amostra selecionada foi recuperada em 5 mL de caldo de infusão cérebro e coração estéril (BHI), e incubada a 37°C por 24 h. A cultura crescida em BHI semeou-se em uma placa de Petri contendo ágar seletivo (XLD - XLT4) e incubou-se a 37°C por 24 h. Uma vez obtidas colônias compatíveis com *Salmonella* transferiu-se uma delas ao caldo BHI que foi incubado a 37°C por 24 h.

Após, pipetou-se 115 µL de caldo BHI nos cartões FTA[®] clássicos (Cat. No. WB12 0206) [21], que possuem quatro círculos para as amostras, tomando cuidado de não deixar espaços em branco entre cada ponto de aplicação, de forma que o caldo foi uniformemente absorvido pelo papel filtro e, portanto, a amostra foi exposta melhor ao reagente impregnado na sua matriz. Cada cartão foi utilizado para o transporte de duas amostras, trabalhando em duplicata (Figura 1), depois cada um ficou exposto no fluxo à temperatura ambiente por 24 horas para secagem. Cada amostra recebeu um número de identificação.

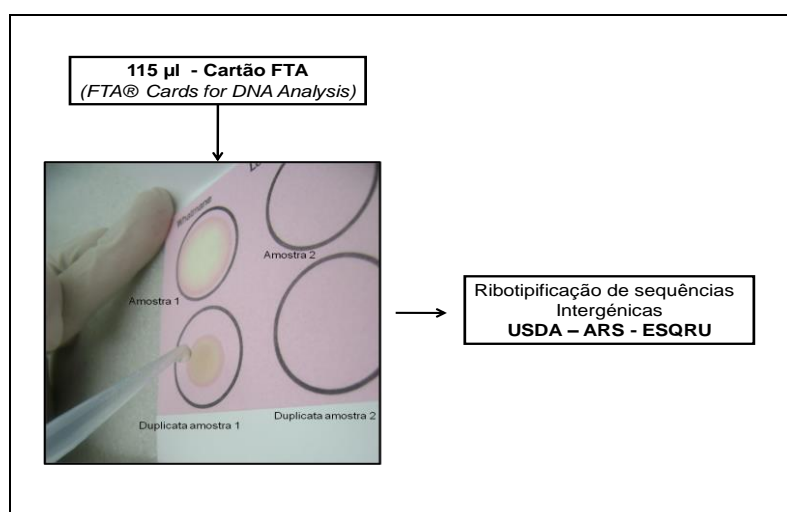


Figura 1. Uso dos cartões FTA para armazenamento e transporte do DNA de amostras de *Salmonella enterica* sem risco biológico. Procedimento de colocação da amostra bacteriana nos cartões, pipetando 115 µL de caldo BHI, tomando cuidado de não deixar espaços em branco entre cada ponto de aplicação. Assim o caldo é uniformemente absorvido pelo papel filtro e a amostra fica mais bem exposta aos reagentes impregnados na matriz do cartão. Cada cartão foi utilizado para o transporte de duas amostras, cada uma em duplicata.

Posteriormente os cartões foram embalados em plástico com fechamento hermético e usaram-se dois tipos de envelopes, um resistente à flexão e outro impermeável, como descrito

nas normas para embalagem, identificação e categorização de substâncias infecciosas ou amostra biológica, seguindo as indicações de biossegurança estabelecidas no "Guia sobre a regulamentação relativa ao transporte de substâncias infecciosas" [2,22]. Entre estes envelopes foi colocada uma cópia da licença do Serviço de Inspeção de Saúde Animal dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service; USDA- APHIS*) para transporte de DNA de *Salmonella enterica* isolada de aves e seu ambiente. Esse material sem risco biológico foi enviado para a USDA-ARS-ESQRU.

Na ESQRU realizou-se um teste de segurança dos cartões [20]. Usando um coletor de amostras Harris Uni-Core[®] obtiveram-se discos de 3 mm, utilizando como base um tapete de corte Harris[®]. O cartão foi colocado no fluxo assegurando que a área a ser cortada estivesse em contato direto com o tapete de corte. Posteriormente, colocou-se a ponta do coletor na área a ser amostrada, pressionando o aparelho firmemente para baixo e cortando o papel filtro com a amostra fazendo movimentos circulares. Com o disco no dispositivo de corte, pressionava-se o ejetor para transferir a amostra a um tubo contendo 10 mL de caldo BHI, o qual era incubado a 37°C por 24 h. Outros dois discos eram coletados para processos de PCR.

Para evitar a contaminação cruzada, o dispositivo de corte foi limpo através da coleta de dois discos de papel filtro limpo, sem amostra inoculada, entre cada amostra.

Se algum caldo BHI apresenta-se turbidez, uma alçada era semeada em ágar verde brilhante (BG) e incubada a 37°C por 24 e 48 h. Se crescesse alguma colônia compatível com *Salmonella* se utilizava um método rápido para a identificação de enterobactérias (Enterotubo[®]).

Os discos coletados para PCR foram submetidos a testes de sequenciamento de DNA para a identificação de sorovares de *Salmonella* baseados em técnica previamente descrita [11]. Para a determinação da concentração do DNA e seu grau de pureza foi usado o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000[®]. Usou-se absorvância de 260 nm para obter a concentração de DNA em ng/μL e a relação de 260/280 como indicador de pureza.

Os resultados foram analisados com o PROG GLM do programa estatístico SAS (*SAS Institute Inc*), usando estatística indutiva para estimar os valores da média e desvio padrão e também foram determinados os intervalos de confiança para a média da população analisada. A confiança foi estabelecida em 95% com um alfa de 5%.

RESULTADOS

Foram avaliados 155 cartões FTA com 156 amostras de *Salmonella enterica*, sorovares Enteritidis, Heidelberg, Hadar, Gallinarum, Typhimurium, Agona e Pullorum (tabela 1). Em 99,35% das amostras não se observou turbidez no BHI. Uma amostra (contendo DNA de *S. Enteritidis*) turvou o caldo após 24 horas de incubação a 37°C, e foi então semeada em ágar BG. Após 24 e 48 horas de incubação a 37°C, não foi identificado crescimento bacteriano nessa amostra.

Tabela 1. Distribuição e resultados do teste de segurança para a avaliação da presença de *Salmonella* em cartões FTA. Avaliação de 156 amostras de *Salmonella enterica*, Subesp. *enterica* provenientes de produtos avícolas e seu ambiente de estabelecimentos avícolas do sul do Brasil, estocadas no CDPA durante os anos de 1996 até 2011.

Sorovar	N	Turbidez em BHI	Isolamento em ágar verde brilhante
<i>S. Heidelberg</i>	62	0	-
<i>S. Enteritidis</i>	54	1	Negativo
<i>S. Hadar</i>	14	0	-
<i>S. Gallinarum</i>	10	0	-
<i>S. Typhimurium</i>	8	0	-
<i>S. Agona</i>	4	0	-
<i>S. Pullorum</i>	3	0	-
Total	155	1	0

As concentrações de DNA após a amplificação mostraram uma media de 42,32 ng/μL com um valor mínimo de 9,61 e um máximo de 77,73 ng/μL. Os valores para a relação 260/280 tiveram uma média de 1,9 com um mínimo de 1,66 e um máximo de 2,32. Os intervalos de confiança para as variáveis analisadas estão descritos na tabela 2. Todas as amostras foram usadas posteriormente com sucesso para a realização de testes de sequenciamento de DNA [11].

DISCUSSÃO

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e a classificação reconhecida atualmente incluem duas espécies: *Salmonella enterica* (com seis subespécies) e *Salmonella bongori*. Em 2010, o Instituto Pasteur descreveu a existência de 2.610 sorovares

classificados através do esquema White – Kauffmann - Le Minor usado para caracterizar os diferentes sorotipos do gênero com base em suas fórmulas antigênicas [7,8]. Assim, a grande diversidade de sorovares deste gênero, torna necessária a inovação nos sistemas de diagnóstico e na forma como são transportadas as amostras ao laboratório.

Tabela 2. Estatística dedutiva mostrando media, desvio padrão e intervalos de confiança para a média da concentração (ng/μL) e indicador de pureza (260/280) após amplificação de amostras de DNA de *Salmonella* transportadas em cartões FTA.

Parâmetro	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Intervalo de confiança para a média
Concentração de DNA (ng/μL)	42,32	9,84	9,61	77,73	P(40,78<42,32<43,87)=0,95
Relação 260/280	1,90	0,09	1,66	2,32	P(1,88<1,90<1,91)=0,95

P<0,05.

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexas em sua epidemiologia e controle, com padrões diferenciados de acordo com a região. Isto ocorre devido a diferenças nos hábitos alimentares, práticas de elaboração de alimentos, criação de animais e padrões de higiene e saneamento. O controle das salmoneloses representa um desafio para a saúde pública, tendo em vista a emergência de novos sorovares e a re-emergência de outros em determinadas áreas, tanto em países emergentes como industrializados [18]. Assim, seu diagnóstico específico é de vital importância na formulação de programas de controle efetivos.

Na maioria dos países, o diagnóstico da salmonelose é baseado em testes microbiológicos e sorológicos que podem demorar dias até que se obtenha o resultado e, muitas vezes, podendo não chegar a uma identificação adequada do agente. Atualmente, sabe-se que a maioria dos surtos é causada por cepas específicas e por esta razão, diversos estudos têm demonstrado a necessidade de utilizar técnicas moleculares com alto poder discriminativo para a investigação destes microrganismos [6,17]. Entretanto, o envio das bactérias vivas para realizar o diagnóstico torna-se difícil quando existe a probabilidade de que sejam transportadas em condições inadequadas e possam causar doenças em uma região ou país onde anteriormente esse microrganismo não existia, impossibilitando muitas vezes a

identificação exata do sorovar envolvido no surto. Com isso, para contribuir no controle de doenças, precisa-se de um método de transporte adequado de amostras sem risco biológico.

Também é importante salientar que quando se trabalha com patógenos, seja no ensino, pesquisa, produção ou diagnóstico, existem riscos que podem contribuir à disseminação das doenças sendo necessária a identificação de métodos de transporte que reduzam a possibilidade de propagação de enfermidades.

No Brasil, o Ministério da Saúde através da portaria nº 472, regulamenta o transporte de substâncias infecciosas e amostras biológicas entre os Estados membros do MERCOSUL. Na portaria definiu-se “uma substância infecciosa como aquela onde se sabe ou se suspeita que possa conter agentes patógenos, tais como, bactérias, vírus, rickettsias, parasitas e fungos”. Também se considera que o transporte inadequado de uma substância infecciosa tem o potencial de causar uma incapacidade permanente, perigo de vida ou constituir uma enfermidade mortal para seres humanos ou animais, de forma que o transporte dessas substâncias pode representar um risco biológico que deve ser evitado [2,22].

Quando os testes realizados só utilizam os ácidos nucleicos dos micro-organismos (DNA ou RNA), os cartões FTA oferecem uma alternativa para o transporte de amostras sem risco biológico [3,4,9,13,21]. Nesta pesquisa uma amostra turvou o caldo BHI, mas não foi observado crescimento em ágar BG após 24 e 48 h de incubação. Uma vez que os cartões FTA não são materiais estéreis, a turbidez observada no BHI pode ter sido causada pela presença de algum contaminante externo. Assim, os microrganismos saprófitos do ambiente podem entrar em contato com a amostra no momento da colocação no cartão e durante o tempo requerido para a secagem. Os resultados desta pesquisa demonstraram que os produtos químicos impregnados nos cartões inativaram as bactérias, pois nenhuma das 156 amostras apresentou cultivos positivos de *Salmonella*, situação que coincide com o relatado por vários pesquisadores para amostras de outros patógenos [14-16].

Os cartões FTA também têm sido utilizados para a pesquisa do vírus da bronquite infecciosa (VBI), mediante coleta de líquido alantoide de ovos embrionados contendo o vírus, o qual foi inativado ao entrar em contato com o material do cartão. A inativação foi comprovada a partir da incapacidade do microrganismo de propagar-se em ovos embrionados de galinha. Contudo, a prova de reação da cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) do gene S1 do VBI mostrou que o RNA viral manteve-se estável após o armazenamento de, no mínimo, 15 dias [14].

A viabilidade do uso de impressões de fígado nesses cartões para a coleta, inativação e análise molecular de adenovírus de origem aviária foi avaliada em 2007 [13]. Neste estudo, a inativação do adenovírus sorotipo 1 foi comprovada a partir da não formação de efeito citopático do vírus quando inoculado em cultivos primários de órgãos de aves livres de patógenos. O DNA viral estocado a temperatura de 20°C manteve-se viável por 198 dias.

No caso de bactérias, foram aplicadas amostras de *Shigella flexneri*, *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* em cartões FTA, as quais foram viáveis para demonstrar a sua aplicabilidade em PCR como teste de detecção. Os pesquisadores concluíram que o uso dos cartões como método para o transporte de amostras de células bacterianas e posterior realização da PCR foi rápida, altamente sensível e reduziu a interferência associada à presença de inibidores, situação comum quando se usam bactérias puras para testes moleculares [4,9].

Outro aspecto a ser considerado é o tempo que podem ser conservadas as amostras usando os cartões FTA. Diversos estudos têm usado amostras de RNA ou DNA colocadas nesses cartões depois de vários meses de armazenamento com resultados satisfatórios [12-14]. Nesta pesquisa, o DNA de *Salmonella* foi usado com sucesso para análises moleculares depois de oito meses de estocagem.

A avaliação da concentração de DNA mostrou uma média de 42,32 ng/μL, com valores variando de 9,61 a 77,73 ng/μL. Em 99,36% das amostras (155/156) obtiveram-se concentrações de DNA acima de 20 ng/μL, valor este considerado adequado para realizar o teste PCR de acordo com o protocolo aplicado [3,20]. Mesmo na amostra de menor concentração de DNA (9,61 ng/μL) foi possível a realização posterior do teste de PCR.

O método mais utilizado para determinar a pureza do DNA é a análise espectrofotométrica, que avalia se a amostra está contaminada com substâncias, tais como proteínas, fenol, agarose e RNA. Esse método se baseia no conceito de que a absorvância medida a 260 nm é proporcional à concentração de ácidos nucleicos da amostra e de que, a absorvância medida a 280 nm é proporcional à quantidade de proteína e fenol presentes no material analisado. O grau de pureza é a relação das absorvâncias medidas (260/280). Normalmente o valor adequado desta relação deve estar entre 1,8 e 2,0. Resultados inferiores a 1,8 são considerados como indicadores de amostras contaminadas com proteína e/ou fenol [19].

Os resultados deste estudo mostraram uma média de 1,9 para a relação 260/280 com valores na faixa entre 1,61 e 2,15. Em 18 amostras obtiveram-se dados inferiores a 1,8, das quais duas eram inferiores a 1,7. Em 24 amostras os valores foram maiores do que 2,0. A

relação de 260/280 é considerada útil para a análise da pureza das amostras de ácidos nucleicos, mas tem que ser utilizada como um indicador da presença ou ausência de contaminantes a partir de DNA, de acordo com critérios específicos determinados pela experiência do pesquisador no desenvolvimento deste tipo de protocolo. As amostras no presente trabalho foram submetidas posteriormente ao teste de ribotipificação de sequências intergênicas [11], onde o DNA de todas as amostras mostrou-se apto para a realização dessa prova.

Considerando que o Brasil é o maior exportador de carne de frango no mundo, existe uma grande preocupação no controle e erradicação da salmonelose, tornando-o um possível líder no diagnóstico desta doença entre os países que fazem parte do MERCOSUL. Assim, o uso dos cartões FTA possibilita a recepção de amostras dos países membros que possam precisar deste serviço de diagnóstico.

Para a análise de sorotipificação de amostras de *Salmonella enterica* em cartões FTA, foi determinado que o uso de $6,5 \pm 0,5$ log CFU/mL para *Salmonella* spp. (correspondente a 0,5 na escala de McFarland), resultou na identificação com sucesso de sorotipos de *Salmonella*, assegurando a inocuidade da amostra [3]. Assim, os resultados do presente estudo mostraram que os cartões podem ser considerados ferramentas adequadas para o transporte de amostras de ácidos nucleicos. O uso com sucesso dos cartões FTA requer uma adequada manipulação antes, durante e depois da coleta para evitar possíveis contaminações, as quais podem dificultar a obtenção de bons resultados nos testes moleculares. Necessita-se também seguir um protocolo adequado para a coleta da amostra, evitando usar quantidades excessivas dos líquidos (BHI) ou dos tecidos (recomenda-se nesses casos evitar a sobreposição de amostras) porque os produtos químicos contidos no papel filtro poderiam saturar-se e com isso as amostras bacterianas ou virais não estariam totalmente inativadas, gerando assim um possível risco no transporte. Análises realizadas no ARS-USDA, não apresentados neste documento, indicam que a sobrecarga dos cartões com bactéria aumenta o potencial de obter células vivas (Guard J., comunicação pessoal, 2011).

CONCLUSÕES

As amostras de DNA de *Salmonella enterica* do Brasil enviadas para análise nos Estados Unidos não apresentaram nenhum crescimento bacteriano. Assim, essas amostras não constituem risco biológico nenhum ao serem transportadas. Os cartões FTA oferecem um meio seguro e efetivo de inativação de bactérias, como por exemplo, *Salmonella* e conservam o DNA em ótimas condições para posterior análise. Conclui-se que amostras enviadas aos

laboratórios, através destes cartões, são viáveis para a análise molecular sem oferecer risco de causar algum tipo de surto ou contaminação e sem comprometer o diagnóstico.

Sources and manufactures

¹FTA cards - (Flinders Technology Associates - FTA Cards for DNA Analysis). GE Healthcare companies. Uppsala - Sweden.

²Dispositivo Harris Uni-Core. GE Healthcare companies. Uppsala - Sweden.

³Harris Cutting Mat. GE Healthcare companies. Uppsala - Sweden.

⁴Enterotubo II prepared multimedia tube. Becton Dickinson GmbH BD Diagnostic Systems. Heidelberg - Germany.

⁵Nanodrop, Thermocientific. Wilmington, DE - USA.

Agradecimentos. Esta pesquisa foi patrocinada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) do Brasil, pela Associação Colombiana de Médicos Veterinários Especialistas em Avicultura (AMEVEA - Colômbia) e pelo *United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Egg Safety and Quality Research Unit; USDA-ARS-ESQRU*. Agradecimento especial a Tod Stewart (USDA) por sua assistência técnica, à professora Nhora Martínez (Universidade Nacional de Colômbia) pela assessoria estatística e à Daniela Tonini da Rocha (CDPA-UFRGS) por seu apoio na coleta das amostras.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Comunicação pessoal

Guard J., 2011. jean.guard@ars.usda.gov

REFERÊNCIAS

- 1. Brasil. 2003.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 78 de 03 de novembro de 2003. *Normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de Salmonella Gallinarum e de Salmonella Pullorum e livres ou controladas para Salmonella Enteritidis e para Salmonella Typhimurium*. Diário Oficial da União. Seção 1. p. 3. Edição de 05/11/2003.
- 2. Brasil. 2009.** Ministério da Saúde. Portaria n. 472 de 09 de março de 2009. *Regulamento técnico MERCOSUL para transporte de substâncias infecciosas e amostras biológicas entre*

os estados partes do MERCOSUL. Diário Oficial da União. Seção 1. p. 31-32. Edição de 10/03/09.

3. **Chirinos-Zegarra B., Sánchez-Ingunza R. & Guard J. 2011.** Optimization of a DNA method using Whatman FTA cards for the identification of *Salmonella* serotypes. *In: Abstracts of International Seminar of Peruvian Association of Poultry Veterinaries* (Lima, Perú). 1 CD- ROM.
4. **Chua T. & Bhagwat A. 2009.** A Rapid and Simple DNA Extraction Procedure to Detect *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* from Fresh Produce Using Real-time PCR. *Food Analyses Methods*. 2: 96–101.
5. **Cortes A., Montiel E. & Gimeno I. 2009.** Validation of Marek's Diseases Diagnostic and Monitoring of Marek's disease Vaccines from samples collected in FTA cards. *Avian Diseases*. 53(4): 510-516.
6. **Gast R. 2008.** Paratyphoid infections. In Y.M. Saif (Ed). *Diseases of Poultry*. 12 ed. Iowa: Blackwell Publishing, pp. 636-665.
7. **Grimont P. & Weil F. 2007.** Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In World Health Organization. Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. *Institute Pasteur*. 9th edn. Paris: pp. 6-7.
8. **Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M., Fields P., Bockemühl J., Grimont P. & Weill F. 2010.** Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*. 161: 26-29.
9. **Lampel K., Palmer A. & Kornegay L. 2000.** Improved Template Preparation for PCR-Based Assays for Detection of Food-Borne Bacterial Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10): 4539-4542.
10. **McFarland Turbidity Standards. 2010.** Disponível em: <<http://www.keyscientific.com/McFarland%20Standards.pdf>>. Acessado em 18/04/2012.
11. **Morales C.A., Gast R. & Guard J. 2006.** Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit *rrfH* of *Salmonella enterica*. *Microbiology Letters*. 264: 48-58.
12. **Moscoso H., Alvarado I. & Hofacre C. 2006.** Molecular Analysis of Infectious Bursal Disease Virus from Bursal Tissues Collected on FTA- Filter Paper. *Avian Diseases*. 50(3): 391-396.
13. **Moscoso H., Bruzual J., Sellers H. & Hofacre C. 2007.** FTA Liver Impressions as DNA Template for Detecting and Genotyping Fowl Adenovirus. *Avian Diseases*. 51(1): 118-121.
14. **Moscoso H., Raybon E., Thayer S. & Hofacre C. 2005.** Molecular detection and

- serotyping of infectious bronchitis virus from FTA filter paper. *Avian Diseases*. 49(1): 24–29.
- 15. Moscoso H., Thayer S., Hofacre C. & Kleven S. 2004.** Inactivation, Storage, and PCR Detection of Mycoplasma on FTA- Filter Paper. *Avian Diseases*. 48(4): 841–850.
- 16. Narayanan M.S., Parthiban P., Sathiya P. & Kumanan K. 2010.** Molecular detection of Newcastle disease virus using Flinders Technology Associates-PCR. *Veterinarski Arhiv*. 80(1): 51-60.
- 17. Oliveira S., Santos L., Schucha D., Silva A., Salle T. & Canal C. 2002.** Detection and identification of salmonella from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*. 87: 25-35.
- 18. Rodrigues D. 2011.** Perspectivas atuais e falhas no diagnostico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. In: *Anais do Seminário Internacional sobre Salmonelose aviar*. Associação Latino-americana de Avicultura - União Brasileira de Avicultura. (Rio de Janeiro, Brasil). 1 CD- ROM.
- 19. Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 956p.
- 20. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA-ARS). 2011.** Standard Operation Process (SOP). Serotyping of *Salmonella* spp. by processing DNA from FTA cards. Athens - GA - USA. 3p.
- 21. Whatman. 2006.** Applying and Preparing Bacteria on FTA Cards for DNA Analysis. Whatman FTA Protocol BD02. Disponível em <<http://www.whatman.com/UserFiles/File/Protocols/Bioscience>>. Acessado em 10/2010.
- 22. World Health Organization. 2007.** Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2007- 2008. Geneva. (WHO/CDS/EPR/2007.2). 29p.

4. CAPITULO II:

ORIGINAL ARTICLE

Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil

M. Pulido-Landínez^{1,2}, R. Sánchez-Ingunza³, J. Guard³ and V. Pinheiro do Nascimento²

¹ Avian Pathology Laboratory, College of Veterinary Medicine, National University of Colombia, Bogotá, Colombia

² Avian Diagnostic and Research Center, College of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

³ United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Athens, GA, USA

Significance and Impact of Study: Single nucleotide polymorphisms found in a group of poultry-associated *Salmonella* isolates from southern Brazil provided evidence of mixtures of serovar group D serotypes on-farm and in single samples from birds. This finding suggests that co-infection and interserotype competition of *Salmonella enterica* in poultry could impact the incidence of disease in animals or humans. In addition, unique serotypes were identified on-farm that escaped characterization by antibody typing. Application of cost-efficient and highly discriminatory genomic methods for assigning serotype may alter concepts about the epidemiology of *Salm. enterica* on-farm and in foods.

Keywords

epidemiology, food safety, genotype, poultry, *Salmonella enterica*, serotype.

Correspondence

Jean Guard, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 950 College Station Rd, Athens, GA 30605, USA.
E-mail: jean.guard@ars.usda.gov

2013/2165: received 4 December 2012, revised 24 May 2013 and accepted 24 May 2013

doi:10.1111/lam.12110

Abstract

To assess diversity of *Salmonella enterica* serotypes present in poultry and their environment from southern Brazil, the Kauffmann–White–Le Minor (KWL) scheme was used to serotype a total of 155 isolates. Isolates were then re-examined with nested PCR and sequencing of the *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping (ISR) region that assesses single nucleotide polymorphisms occurring around a 5S ribosomal gene. Serotypes identified were Heidelberg (40.6%), Enteritidis (34.2%), Hadar (8.4%), Typhimurium (3.9%), Gallinarum (3.2%), Agona (1.3%), Cerro (1.3%), Livingstone (1.3%), Infantis (0.6%), Isangi (0.6%), Mbandaka (0.6%), Montevideo (0.6%) and Senftenberg (0.6%). Three unique ISRs were detected from four strains. Day old chicks yielded only *S. Enteritidis*, whereas *S. Heidelberg* was most often associated with poultry carcasses. Overall agreement between KWL and ISR was 85.2%, with disagreement possibly due to the ability of ISR to detect mixtures of serotypes in culture. Overall, ISR provided more information than did KWL about the ecology of *Salm. enterica* on-farm. The O-antigen group D *Salm. enterica* serovars such as Pullorum, Gallinarum and Enteritidis appear susceptible to overgrowth by other serotypes.

Introduction

Brazil currently ranks as the major exporter of chicken meat in the world with markets in more than 150 countries. *Salmonella enterica* (*Salm. enterica*) is one of the most important bacterial pathogens that can cause food-borne illness (Schroeder *et al.* 2006). It is often transmitted to people by eggs and other poultry products (Hogue *et al.* 1997). The Brazilian poultry industry is committed to the control of *Salmonella* and its impact on the health

of birds and the safety of poultry products. The industry follows the guidelines listed in the National Poultry Health Plan that includes monitoring of *Salm. enterica* on farms and in poultry products. (www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual). Efforts to control *Salm. enterica* in poultry are complicated by differences in the predominant serotype, strain heterogeneity, prevalence, biosecurity practices, extent of regulatory control and the nature, size and logistic complexity of this industry (Mead *et al.* 2010). The increasingly strong demand

Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in Southern Brazil

Martha Pulido-Landínez^{1,3}, Roxana Sánchez-Ingunza², Jean Guard*² & Vladimir Pinheiro do Nascimento³

1. Avian Pathology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, National University of Colombia, Bogotá – Colombia
2. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Athens, GA, USA.
3. Avian Diagnostic and Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

*Communicating author:

Jean Guard, D.V.M., Ph.D.

USDA, ARS

950 College Station Rd

Athens, GA 30605

Email: jean.guard@ars.usda.gov

Tel: 706-546-3446

Fax: 706-546-3035

KEYWORDS:

***Salmonella enterica*, genotype, serotype, epidemiology, food safety, poultry**

SIGNIFICANCE AND IMPACT: Single nucleotide polymorphisms found in a group of poultry-associated *Salmonella* isolates from Southern Brazil provided evidence of mixtures of serovar Group D serotypes on-farm and in single samples from birds. This finding suggests that co-infection and inter-serotype competition of *Salmonella enterica* in poultry could impact the incidence of disease in animals or humans. In addition, unique serotypes were identified on-farm that escaped detection by antibody typing. Application of cost-efficient and highly discriminatory genomic methods for assigning serotype may alter concepts about the epidemiology of *Salmonella enterica* on-farm and in foods.

ABSTRACT: To assess diversity of *Salmonella enterica* serotypes present in poultry and their environment from Southern Brazil, the Kauffman-White-LeMinor (KWL) scheme was used to serotype a total of 155 isolates. Isolates were then re-examined with nested PCR and sequencing of the *dkgB*-linked Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) region that assesses single nucleotide polymorphisms occurring around a 5S ribosomal gene. Serotypes identified were Heidelberg (40.6%), Enteritidis (34.2%), Hadar (8.4%), Typhimurium (3.9%), Gallinarum (3.2%), Agona (1.3%), Cerro (1.3%), Livingstone (1.3%), Infantis (0.6%), Isangi (0.6%), Mbandaka (0.6%), Montevideo (0.6%), and Senftenberg (0.6%). Three unique ISRs were detected from 4 strains. Day old chicks yielded only *S. Enteritidis*, whereas *S. Heidelberg* was most often associated with poultry carcasses. Overall agreement between KWL and ISR was 85.2%, with disagreement possibly due to the ability of ISR to detect mixtures of serotypes in culture. Overall, ISR provided more information than did KWL about the ecology of *Salmonella enterica* on-farm. The O-antigen group D *Salmonella enterica* serovars such as Pullorum, Gallinarum and Enteritidis appear susceptible to overgrowth by other serotypes.

INTRODUCTION

Brazil currently ranks as the major exporter of chicken meat in the world with markets in more than 150 countries. *Salmonella enterica* (*S. enterica*) is one of the most important bacterial pathogens that can cause food borne illness (Schroeder et al. 2006). It is often transmitted to people by eggs and other poultry products (Hogue et al. 1997). The Brazilian poultry industry is committed to the control of *Salmonella* and its impact on the health of birds and the safety of poultry products. The industry follows the guidelines listed in the National Poultry Health Plan that includes monitoring of *S. enterica* on farms and in poultry products. (www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual). Efforts to control *S. enterica* in poultry are complicated by differences in the predominant serotype, strain heterogeneity, prevalence, biosecurity practices, extent of regulatory control, and the nature, size, and logistic complexity of this industry (Mead et al. 2010). The increasingly strong demand for safe poultry products requires application of diagnostic tools that enable rapid and reliable identification of pathogenic microorganisms.

An obstacle to maintaining the safety of poultry products is the difficulty in accessing reliable diagnostic tools to characterize *S. enterica* as part of a continuously operational monitoring program. Serotyping is an important epidemiological tool in the characterization of *S. enterica*, because it helps determine the prevalence and emergence of pathogenic

serotypes in different regions. The Kauffmann-White-Le Minor (KWL) scheme is the historical method for determining serotype (Grimont and Weil 2007; Hendriksen et al. 2009). It is antibody-based and uses a combination of agglutination reactions to determine serotype. More than 2,600 serotypes have been described on the basis of the antigenic structure of the cell surface lipopolysaccharide (O antigen) and flagellar proteins (H antigen) (Grimont and Weil 2007). The KWL scheme is prone to subjective interpretations arising from combinatorial complexity, mixtures of serotypes in culture, and the absence of cell surface epitopes that are targeted by antisera (Guard et al. 2012). A lack of information about which serotypes are circulating on-farm impedes measures for effective treatment and control because different serotypes have different niches (Dorneles et al. 2010). Molecular methods for subtyping strains have potential for assigning serotype in reference to the historical database developed from the KWL scheme, because serotype is a class of strain variation and thus results from variation in the genome of *Salmonella enterica* (Murase et al. 1995; McQuiston et al. 2008; Wattiau et al. 2011; Achtman et al. 2012; Fabre et al. 2012). Pulsed-field-gel-electrophoresis (PFGE) is considered a pivotal DNA-based method that complements the KWL scheme in regards to detecting strain variation occurring within serotype, and it has been used successfully to identify origins of outbreaks. Other DNA based methods can be used to subtype and may also provide serotype information, and each one has its advantages and disadvantages (Wattiau et al. 2011). Common disadvantages of most DNA-based methods are the need to purchase proprietary equipment, reagents and software for analysis (Tankouo-Sandjong et al. 2008; Wise et al. 2009; McQuiston et al. 2011)). Overall, most molecular techniques are restricted to centralized public health laboratories with infrastructure that supports objectives to conduct research and epidemiological studies.

Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) is a rapid strain typing method that lowers barriers to implementation because costs for equipment and software are modest (Guard et al. 2012). It is sequence based and has been shown to distinguish between serotypes at the level of the single nucleotide polymorphism (SNP). Cultures with more than one serotype can be detected when forward and reverse sequences do not align. The attributes of low cost, simplicity of application, and the ability to access reference sequences suggested that ISR was suitable for application to widespread use for environmental studies. The objective of the present study was to determine if sequence-based ISR analysis of 155 isolates of *S. enterica* isolated from poultry and their environment from southern Brazil would yield additional information in comparison to those obtained using KWL serotyping. Results suggest that the

ecology of *Salmonella enterica* has aspects that have not yet been considered in determining risks to the safety of the food supply.

RESULTS AND DISCUSSION

ISR assigned a *Salmonella enterica* serotype to 151 of 155 samples collected from poultry in southern Brazil (Tables 1 and 2). The KWL serotype initially reported was confirmed for 85.2% (132/155) of the samples. A total of 15 serotypes were identified, which included *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Agona*, *S. Senftenberg*, *S. Livingstone*, *S. Cerro*, *S. Infantis*, *S. Mbdanka*, *S. Montevideo*, *S. Isangi* and 3 different unique sequences (UN0041, UN0042 and UN0043). Of the 155 samples, 23 (14.8%) had an ISR that did not agree with initial KWL serotyping (Table 2). Of the samples reported as *S. Heidelberg*, two were identified by ISR as *S. Enteritidis* and two as unique sequence UN0042. *S. Hadar* had one observed difference, which was *S. Heidelberg*. In the four samples reported as *S. Agona*, two sequences were assigned *S. Isangi* and UN0043. For 8 *S. Typhimurium* identified by KWL, two were assigned *S. Heidelberg* by ISR (Table 2).

Table 1. Primers used for nested PCR Intergenic Sequence Ribotyping (ISR)

Primer Name	Orientation	Primer sequence (5' to 3')	Reference	Amplicon size (bp)
ISR-F1	Forward	GCCAATGGCACTGCCCGGTA	Guard <i>et al</i> , 2012	1464
ISR-R1	Reverse	TACCGTGCGCTTTCGCCAG	Guard <i>et al</i> , 2012	
nISR-F14	Forward	TGCCCCGAGATGAGTTCTCCC	This study	1187*
nISR-R14	Reverse	CACCCGGAGATGGCCAGTGGAT	This study	
ISRs1_F8	Forward	AGGCCGGGTGTGTAAGCGCA	This study	--
ISRs2_R42	Reverse	CGGAACGGACGGGACTCGA	This study	

Three avian-associated serovar Group D *Salmonella* serovars, namely Enteritidis, Gallinarum and Pullorum, had several disagreements between the KWL serotype and ISR (Table 2). Of the 67 samples, 14 (20.9%) disagreed with KWL serotyping. Of the other 88 isolates that were not group D, 9 had disagreement between KWL serotype and ISR (10.2%) (Table 2). *S. Pullorum* and *S. Gallinarum* are avian pathogens with a fastidious growth habit that can require longer incubation times. Of the 13 samples in this collection, 8 (61.5%) were putatively mixed as detected by an ISR indicating the presence of a different serotype (Table 2). These results suggest that the group D Salmonellae may be prone to overgrowth by minority serotypes present within culture during storage. Alternatively, the group D Salmonellae may have a propensity to associate with other serotypes and thus overgrowth is a related outcome. Further research using competition experiments would be required to understand why so many isolates of the group D Salmonellae yielded a secondary serotype. In three cases, *S. Enteritidis* was isolated after either *S. Gallinarum* or *S. Pullorum* had been isolated (B138, B143 & B145). For B137, *S. Heidelberg* was identified by ISR, but *S. Gallinarum* was found by KWL serotype. This result supports that mixtures of serotypes in culture were common.

S. Agona was isolated 4 times from commercial layer organic farms in 2010 and these results were confirmed by PFGE (Tables 2 & 3). In this study, DNA samples identified as B133 and B134 were again classified as *S. Agona* by ISR (498 bp), whereas B154 and B155 were not. It is possible that PFGE analysis was not sensitive enough to detect differences between the two *S. Agona* strains and the other two isolates. However, sequence alignment indicated that disagreement of both B154 and B155 ISRs with the one from *S. Agona* was substantial, and no alignment was possible at 90% similarity. These results suggest that two isolates of *S. Agona* were overgrown with serotype *S. Isangi* in one case and UN0043 in the other.

Four sources of isolates included over 10 samples, and these were poultry carcass (73), drag swab (27), cloacal swab (11) and 1-day old chick (13) (Table 3). The 1-day old chick samples yielded only *S. Enteritidis* and there were no mixtures. Cloacal swabs had only *S. Heidelberg* by KWL serotyping, but 1 sample (B94) may have been mixed with UN0042. Serotypes from drag swabs were 81.5% *S. Enteritidis* by KWL serotyping with one sample putatively mixed with *S. Mbandaka* (B15). The remaining samples were *S. Heidelberg* with one sample putatively mixed with *S. Typhimurium* (B146). Poultry carcasses had the most complicated *Salmonella* flora. According to the KWL scheme, 43 of 73 samples (58.9%) were *S. Heidelberg*, 16 (21.9%) were *S. Enteritidis*, and 14 (19.2%) were *S. Hadar*. Of the 3

serotypes initially recovered from poultry carcasses, 5 of 16 (31.3%) *S. Enteritidis* cultures may have been mixed. In contrast, 7.1% and 4.7% of samples initially found to have *S. Hadar* and *S. Heidelberg* were putatively mixed. These results suggest that *S. Enteritidis* was frequently overgrown by other *Salmonella* serotypes when stored. An alternative explanation is that *S. Enteritidis* had a propensity to associate with other serotypes.

Table 2. Variation between reported serotype and serotype as detected by ISR analysis

Reported serotype	Number of samples	Number confirmed as reported by ISR	Number of other ISRs detected	Other ISR serotypes detected (number per ISR is in parentheses)
Heidelberg	62	58 (93.5%)	4 (6.5%)	Enteritidis_499bp (2) UN0042_365bp (2)
Enteritidis	54	48 (88.9%)	6 (11.1%)	Heidelberg_498bp (1), Mbandaka_11813C_499bp (1), Livingstone_11841_361bp (1) Infantis_9381_500bp (1) Cerro_5767N_502bp (2)
Hadar	14	13 (92.9%)	1 (7.1%)	Heidelberg_498bp (1)
Gallinarum	10	5 (50.0%)	5 (50.0%)	Heidelberg_498bp (1) Enteritidis_499bp (1) Montevideo_6690_362bp (1) Senftenberg_362 (1) Livingstone_11841_361 (1)
Typhimurium	8	6 (75.0%)	2 (25.0%)	Heidelberg_498bp (2)
Agona	4	2 (50.0%)	2 (50.0%)	Isangi_13416_258 bp (1) UN0043_399bp (1)
Pullorum	3	0	3 (100.0%)	Enteritidis_499bp (2) UN0041_361bp (1)
TOTAL	155	132 (85.2%)	23 (14.8%)	---

Table 3. *Salmonella enterica* serotypes from Southern Brazil as characterized by the Kauffman-White-Le Minor scheme

Reported serotype	Source of isolation of <i>Salmonella enterica</i>									TOTAL
	Poultry carcass	Drag swab	1 day-old Broiler	Cloacal swab	Organic farm	Feed	Liver	Pips	Unknown	
Heidelberg	42	4	-	11	-	1	1	-	3	62
Enteritidis	16	22	13	-	-	2	-	1	-	54
Hadar	14	-	-	-	-	-	-	-	-	14
Gallinarum	-	-	-	-	1	1	-	-	8	10
Typhimurium	-	1	-	-	1	-	-	-	6	8
Agona*	-	-	-	-	4	-	-	-	-	4
Pullorum	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
TOTAL	72	27	13	11	6	4	1	1	20	155

*Strains also identified by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Perdoncini, 2011).

(www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/36857/000819160.pdf)

ISR analysis revealed substantially new information about the collection of 155 isolates from Southern Brazil that could impact assessment of risk for emergent food borne illness in humans or disease in poultry on-farm. The most frequent contributor to disagreement between KLV serotyping and ISR in this study, as it was previously, was the presence of mixed serotypes in culture (Guard *et al.*, 2012). For example, detection of multiple serotypes present when single colonies are passaged strongly suggests that the human pathogen *S. Enteritidis* circulates with the avian pathogens *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* on-farm. This finding contradicts the concept that closely related *Salmonella enterica* serotypes are mutually exclusive (Baumler *et al.* 2000). It is conceivable that a flock could be infected with two serotypes at one time, and co-infection could affect the percentage of contaminated eggs that enter the market or the health of a flock. Further research is needed to address the impact of co-infection of chickens with serovar group D avian-associated *Salmonella*, especially as it impacts internal egg contamination, public health and disease in chickens.

DNA microarray was used for samples that had unique ISRs because references were not yet available in sequence databases (Guard *et al.* 2012). Serovars *S. Mbandaka*, *S. Montevideo*, *S. Livingstone*, *S. Infantis*, and *S. Cerro* were thus assigned to ISRs that are now part of a reference database maintained at the U. S. Department of Agriculture. Serotypes *S. Mbandaka* and *S. Infantis* are considered emergent *Salmonella* serotypes in Brazil with low frequencies of isolation from poultry products (4.8 and 7.6% respectively) [<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorioprebaf.pdf>]. The other 3 serotypes have not yet been reported as prevalent serotypes in Brazil. These results indicate that ISR can be used to find serotypes that may not necessarily have a whole genome reference, but that are represented within DNA microarray hybridization databases.

Serotypes may differ in how they are impacted by storage and by how likely they associate with other serotypes. For example, storage of *S. Enteritidis* at -80°C caused a shift in phenotypes as assayed by composition of the outer membrane, but storage of *S. Typhimurium* did not (Parker *et al.* 2001). Another complication of evaluating stored cultures is that a change could occur in the relative prevalence of mixtures of serotypes over time (Borsoi *et al.*, 2009, Oliveira *et al.*, 2002, Santos *et al.*, 2008). Access to a less expensive, efficient and highly discriminatory technique for serotyping that can find mixtures should enable appropriate decisions to be made to improve the safety and security of the food supply.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

A total of 155 isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* obtained from different poultry sources were evaluated in this study (Table 2). Strains were provided by the Avian Diagnostic and Research Center at the Federal University of Rio Grande do Sul (CDPA - UFRGS for acronym in Portuguese) (Table 2). Bacteria were isolated from poultry facilities located in the state of Rio Grande do Sul in southern Brazil between 1995 and 2010. Serotyping, using the Kauffman-White-Le Minor (KWL) scheme, was done by the National Reference Institute Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Strains were conserved at -80°C in 20% glycerol until analysis by ISR.

Preparation of *Salmonella* DNA

Salmonella strains were revived from freezer stocks in 5 ml of brain heart infusion (BHI) broth by transferring one 10 µL loop of frozen cells in the media and statically incubating the suspension for 24 h at 37°C. Cultures were streaked on XLD and XLT4agar and incubated for 24 h at 37°C to obtain separated colonies. One colony was transferred to BHI broth and incubated overnight at 37°C. Cell culture was diluted to match a McFarland Turbidity Standard 0.5, and 150 µL of the cell suspension were applied to one circle on Whatman FTA® classic cards (GE Healthcare, USA). FTA cards were subsequently shipped with an APHIS permit for importation and transportation of controlled materials for analysis at the United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Egg Safety and Quality Research Unit; (USDA-ARS-ESQRU) in Athens, GA, USA (Pulido *et al.*, 2012).

DNA Isolation

Whatman FTA® cards were processed following manufacturer instructions with some refinements (Pulido-Landinez *et al.*, 2012). Briefly, discs were excised from the cards using a 3.00 mm Harris Uni-Core device and transferred in to sterile 1.5 mL Eppendorf tubes before adding 200 µl of FTA purification reagent. To avoid cross contamination between samples, the collecting device was cleaned by cutting two discs from a non-inoculated FTA card. Tubes were vortexed for 5 s and incubated at 25°C for 5 min at 450 rpm using an Eppendorf Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany). The purification reagent was discarded and replaced with fresh reagent to repeat this step one more time. Discs were then washed twice with 200 µL of TE buffer under the similar conditions indicated for the purification reagent and discarding the buffer in between washes. TE buffer was completely removed before

continuing with PCR analysis. Safety testing was conducted on each DNA sample adsorbed in the FTA cards in order to determine if embedded reagents killed bacteria. One disc was placed in BHI broth and incubated with shaking for 24 h at 37°C. If turbidity was observed, culture was streaked on brilliant green (BG) agar (Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, MI) to test for the presence of *Salmonella*.

PCR analysis and sequencing of DNA

Nested Polymerase Chain Reaction (N-PCR) method was used to obtain PCR products for analysis of sequence. N-PCR and sequencing primers were designed using the Primer-Blast designing tool from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Table 2). Purified DNA in FTA discs was amplified using primers ISR-F1 and ISR-R1 in the first PCR and primers nISR-F14 and nISR-R14 in the second PCR reaction. Briefly, FTA discs were transferred to 0.2 mL PCR tubes containing 2X Gene Amp Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 200 nmol of primers ISR-F1 and ISR-R1 in a volume of 30 µL. One µL of the PCR product from this reaction was transferred in to 29 µL of Master Mix solution containing primers nISR-F14 and nISR-R14 in the same aforementioned primer concentrations. Amplification was performed on a Veriti 96 well Fast Thermal cycler (Applied Biosystems) under the following cycling conditions: initial denaturation at 95°C for 10 s followed by 35 cycles of 94°C for 0 s, 64°C for 40 s and 72 °C for 10 s with a final extension at 72°C for 10 s. DNA products from the second PCR were resolved in 2% ethidium bromide agarose gels (Invitrogen, Carlsbad, CA). Then, the amplified DNA in those samples containing the expected nucleotide size was purified using a PureLink® PCR purification kit (Invitrogen). DNA concentrations, ranging from 15 to 50 ng/µL, were measured in a NanoDrop ND-1000, Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE) and purified PCR products were submitted to Retrogen, Inc. (San Diego, CA) for DNA sequencing in an ABI Prism 3730 DNA analyzer using primers ISRs1_F8 and ISRs2_R42.

Construction of ISR sequences and data analysis

The ISR sequence starts from the nucleotide located immediately after the 23S rRNA gene and the nucleotide located immediately before the tRNA-*aspU* gene in the *Salmonella* genome region linked to the *dkgB* gene (Morales et al. 2006). Finding no ambiguous nucleotides within at least 300 base pairs (bp) of remaining sequence after ends were trimmed assessed the quality of sequence data. In addition, substantial overlap of forward and reverse

sequences consisting of at least one flanking intergenic sequence and some of the 5S rRNA gene should be observed. Forward and reverse sequencing data corresponding to each individual sample were aligned using SeqMan Pro Lasergene v8.0 (DNASTAR, Madison, WI) and ISR sequences were assigned serotype. ISR sequences were assigned serotype using SeqMan Pro after a 100% similarity match with the ISR sequence database for *Salmonella* serotyping maintained at the USDA-ARS-ESQRU was observed (Guard et al. 2012).

Analysis of ISR sequences with no available sequence database

The DNA hybridization microarray (DNAhyb) *Salmonella* serotyping method is AOAC RI certified and marketed as Check&Trace (Checkpoints, Wageningen, The Netherlands) was used to resolve *Salmonella* serotype identity of the unique ISR sequences detected in this study (Guard et al., 2012). DNAhyb was modified to analyze DNA extracted from FTA discs (Pulido-Landinez et al. 2012), because international restrictions on shipment of live pathogens encourages shipment of DNA only. *Salmonella* DNA was prepared as suggested by E. Mundt (personal communication). Briefly, three FTA discs were placed in to a 1.5 mL Eppendorf tube containing 0.5% SDS and 0.5 mg/mL Proteinase K in 180 μ L distilled water. Tubes were briefly vortexed and incubated at 55°C for 60 min at 450 rpm in an Eppendorf Thermomixer. DNA was extracted from the liquid fraction using a PureLink™ Genomic DNA kit from Invitrogen and following the protocol for Gram-negative bacteria cell lysates after proteinase K digestion. DNA concentrations were measured in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) and 10 μ L of extracted DNA were added in to the PCR reaction tubes provided within the kit. DNAhyb was otherwise followed as indicated by the manufacturer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Colombian Veterinary Poultry Association (AMEVEA), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) from Brazil and the United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA, ARS). Special thanks are made to Tod Stewart (USDA) for technical assistance and professor Nhora Martínez (National University of Colombia) for the assistance in statistical analyses. Authors have no conflict of interest to declare, financial or otherwise.

REFERENCES

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H. and Brisse, S. (2012) Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS pathogens* **8**, e1002776.
- Baumler, A.J., Hargis, B.M. and Tsolis, R.M. (2000) Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science* **287**, 50-52.
- Dorneles, C., Correa, J.M., Mendes, S., Haas, S., Tiba, M.L. and Campanher, R. (2010) Microbiological analysis of the foods involved in foodborne disease outbreaks occurring in the Rio Grande do Sul State, Brazil. *R Bras Biosci* **8**, 44-48.
- Fabre, L., Zhang, J., Guigon, G., Le Hello, S., Guibert, V., Accou-Demartin, M., de Romans, S., Lim, C., Roux, C., Passet, V., Diancourt, L., Guibourdenche, M., Issenhuth-Jeanjean, S., Achtman, M., Brisse, S., Sola, C. and Weill, F.X. (2012) CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. *PloS one* **7**, e36995.
- Grimont, P. and Weil, F. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In *WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella* eds. Grimont, P. and Weil, F. Paris, France: Institut Pasteur.
- Guard, J., Sanchez-Ingunza, R., Morales, C., Stewart, T., Liljebjelke, K., Van Kessel, J., Ingram, K., Jones, D., Jackson, C., Fedorka-Cray, P., Frye, J., Gast, R. and Hinton, A., Jr. (2012) Comparison of *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica*. *FEMS microbiology letters* **337**, 61-72.
- Hendriksen, R.S., Mikoleit, M., Carlson, V.P., Karlsmose, S., Vieira, A.R., Jensen, A.B., Seyfarth, A.M., DeLong, S.M., Weill, F.X., Lo Fo Wong, D.M., Angulo, F.J., Wegener, H.C. and Aarestrup, F.M. (2009) WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for serotyping of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *Journal of clinical microbiology* **47**, 2729-2736.
- Hogue, A., White, P., Guard-Petter, J., Schlosser, W., Gast, R., Ebel, E., Farrar, J., Gomez, T., Madden, J., Madison, M., McNamara, A.M., Morales, R., Parham, D., Sparling, P., Sutherlin, W. and Swerdlow, D. (1997) Epidemiology and control of egg-associated *Salmonella enteritidis* in the United States of America. *Rev Sci Tech* **16**, 542-553.
- McQuiston, J.R., Herrera-Leon, S., Wertheim, B.C., Doyle, J., Fields, P.I., Tauxe, R.V. and Logsdon, J.M., Jr. (2008) Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among

- Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *Journal of bacteriology* **190**, 7060-7067.
- McQuiston, J.R., Waters, R.J., Dinsmore, B.A., Mikoleit, M.L. and Fields, P.I. (2011) Molecular determination of H antigens of *Salmonella* by use of a microsphere-based liquid array. *Journal of clinical microbiology* **49**, 565-573.
- Mead, G., Lammerding, A.M., Cox, N., Doyle, M.P., Humbert, F., Kulikovskiy, A., Panin, A., do Nascimento, V.P. and Wierup, M. (2010) Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective. *Journal of food protection* **73**, 1566-1590.
- Morales, C.A., Gast, R. and Guard-Bouldin, J. (2006) Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit *rrfH* of *Salmonella enterica*. *FEMS microbiology letters* **264**, 48-58.
- Murase, T., Okitsu, T., Suzuki, R., Morozumi, H., Matsushima, A., Nakamura, A. and Yamai, S. (1995) Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbiology and immunology* **39**, 673-676.
- Parker, C.T., Liebana, E., Henzler, D.J. and Guard-Petter, J. (2001) Lipopolysaccharide O-chain microheterogeneity of *Salmonella* serotypes Enteritidis and Typhimurium. *Environmental microbiology* **3**, 332-342.
- Pulido-Landinez, M., Laviniki, V., Sanchez-Ingunza, R., Guard, J. and Nascimento, V.P. (2012) Uso dos cartões FTA para o transporte de amostras de DNA de *Salmonella* spp. isoladas de produtos avícolas do Sul do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae* **40**, 1073.
- Schroeder, C.M., Latimer, H.K., Schlosser, W.D., Golden, N.J., Marks, H.M., Coleman, M.E., Hogue, A.T., Ebel, E.D., Quiring, N.M., Kadry, A.R. and Kause, J. (2006) Overview and summary of the Food Safety and Inspection Service risk assessment for *Salmonella enteritidis* in shell eggs, October 2005. *Foodborne pathogens and disease* **3**, 403-412.
- Tankouo-Sandjong, B., Sessitsch, A., Stralis-Pavese, N., Liebana, E., Kornschober, C., Allerberger, F., Hachler, H. and Bodrossy, L. (2008) Development of an oligonucleotide microarray method for *Salmonella* serotyping. *Microbial biotechnology* **1**, 513-522.
- Wattiau, P., Boland, C. and Bertrand, S. (2011) Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and environmental microbiology* **77**, 7877-7885.

Wise, M.G., Siragusa, G.R., Plumblee, J., Healy, M., Cray, P.J. and Seal, B.S. (2009)
Predicting *Salmonella enterica* serotypes by repetitive sequence-based PCR. *Journal of
microbiological methods* **76**, 18-24.

5. CAPITULO III:

Avian Diseases Decision for Manuscript #10598-062613-CaseR

avian.diseases@aaap.info <avian.diseases@aaap.info>

30 de agosto de 2013
07:46

Para: mpulidola@unal.edu.co
Cc: mepulidol@yahoo.com.co

Dear Dr. Pulido-Landinez,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in an early issue of AVIAN DISEASES. Congratulations.

Please respond to the following to expedite the publication of your article in a forthcoming issue of the journal:

Please send us signed "Page Charges Agreement" and the "Transfer of Copyright Agreement" for publication of your article in AVIAN DISEASES. The Avian Diseases office must receive these documents NO LATER THAN 20 DAYS from the date of this acceptance letter. The documents may be sent by regular mail, e-mail with pdf attachment to avian.diseases@aaap.info. Use the link below to access these documents:

http://aviandiseases.allentrack.net/letters/avdi_copyright_transfer.rtf

http://aviandiseases.allentrack.net/letters/Page_Charge_Form.rtf

Allen Press will contact you regarding galleys and other issues in processing your manuscript.

Very sincerely,

Y. M.Saif, DVM, PhD
Avian Diseases Editor
Email: m.saif@aaap.info

Presence of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in commercial laying hens diagnosed with Fowl Typhoid Disease in Colombia

Martha Pulido-Landínez^{ACD}, Roxana Sánchez-Ingunza^B, Jean Guard^B & Vladimir Pinheiro do Nascimento^C

A. Avian Pathology Laboratory, College of Veterinary Medicine, National University of Colombia, Bogotá – Colombia

B. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Athens, GA, USA.

C. Avian Diagnostic and Research Center, College of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

D. Corresponding author e-mail:

Martha Pulido-Landínez, Cra. 30 # 45-03. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá DC – Colombia.

Email: mpulidola@unal.edu.co

SUMMARY. A severe outbreak of salmonellosis in commercial brown table egg layers first occurred in Colombia in 2006. From 2008 to 2012, 35 samples collected from commercial layers farms in the states of Cundinamarca, Santander, Bolivar and San Andres, were positive to *Salmonella enterica*. *Salmonella* (*S*) was isolated from liver and spleen (71.42%), pools of organs (liver, spleen and ovarian follicles), (25.71%) and drag swabs (2.85%). Serotype was assigned using single nucleotide polymorphisms (SNPs) or DNA microarray hybridization. Sixteen strains of *S. Enteritidis* and 13 of *S. Gallinarum* were identified. Seven strains yielded 3 unique sequences and they were designated as UN0038, UN0052 and UN0054 by intergenic sequence ribotyping. These strains were later identified as serotypes Isangi, Braenderup and Yoruba, respectively, by DNA microarray hybridization. The discovery that a common human pathogen (*S. Enteritidis*) was co-isolated from farms with an avian pathogen (*S. Gallinarum*) in similar commercial brown layer hens and in different regions indicates that it is important to investigate the dynamics of *Salmonella* infection and determine the serotypes circulating within the same ecological niche.

RESUMEN. Un brote severo de salmonelosis en ponedoras comerciales marrón ocurrió en Colombia en 2006. Entre los años 2008 a 2012, un total de 35 muestras provenientes

de granjas de ponedoras comerciales ubicadas en los departamentos de Cundinamarca, Santander, Bolívar y San Andrés; fueron positivas a *Salmonella enterica*. Los aislamientos fueron realizados a partir de hígado y bazo (71.42%), pool de órganos - hígado, bazo y folículos ováricos- (25.71%) e hisopos de arrastre (2.85%). El serotipo fue asignado usando polimorfismo de nucleótido simple (SNPs por sus siglas en inglés) o hibridación de DNA. Se identificaron diez y seis cepas de *S. Enteritidis*, trece de *S. Gallinarum* y siete serotipos con secuencias únicas (UN0038, UN0052 y UN0054); posteriormente éstos fueron identificados como serotipos Isangi, Branderup y Yoruba, respectivamente, mediante el uso de hibridación de DNA. El hallazgo de un patógeno humano común (*S. Enteritidis*) aislado en co-existencia con un patógeno aviar (*S. Gallinarum*) en granjas de gallinas comerciales marrón similares, ubicadas en diferentes regiones, indica que es importante investigar las dinámicas de la infección que están ocurriendo entre serotipos que circulan en el mismo nicho ecológico.

Key words: *Salmonella enterica*, Enteritidis, Gallinarum, serotype, single nucleotide polymorphism, eggs, food safety, commercial layers, Colombia.

Abbreviations: XLD =Xylose- Lysine- deoxicholate agar; BHI= brain–heart infusion; ISR= Intergenic Sequence Ribotyping. USDA-ARS-ESQRU= United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Egg Safety and Quality Research Unit. APHIS= Animal and Plant Health Inspection Service. AOAC= Association of Official Analytical Chemists. LPA=Avian Pathology Laboratory of National University of Colombia.

Salmonella colonization of poultry and the contamination of commercial eggs by approximately 20 serotypes out of over 1400; often results in food borne disease in people. However, only *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* are pathogens of poultry, and cause severe diseases that threaten the economic sustainability of the industry by causing fowl typhoid and pullorum disease respectively; nevertheless, they do not cause illness in humans (3,21,24). In contrast, *S. Enteritidis*, the world's leading cause of salmonellosis in people, can spread throughout poultry flocks and contaminate eggs without adversely impacting the flock health (1,4,7,8). These three serogroup D *Salmonella* serotypes illustrate the more extreme outcomes associated with colonization of poultry by *Salmonella enterica*, namely disease in chickens versus disease in humans.

During 2006, several cases of fowl typhoid were reported in commercial brown table egg layers in Colombia. Affected flocks showed high morbidity and mortality, with birds exhibiting moderate to severe depression, low feed intake, and diarrhea. The greatest impact was on egg production, where a reduction of 30 to 50% was commonly observed. In addition, mortality rates ranged from 10% up to 80%. A preliminary diagnosis done by the Avian Pathology Laboratory (LPA) of the National University of Colombia reported the isolation of motile and non-motile serogroup D *Salmonella* (16). A confusing aspect of laboratory findings was that both motile and non-motile serogroup D strains were detected. Since both *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* are non-motile due to irreversible mutations in flagella structural genes (11), these results suggested that other *Salmonella* serotypes were present. Although epidemiological analysis of on-farm *Salmonella* prevalence is complex, the lack of rapid and definitive *Salmonella* serotyping methods in Colombia hampered the adoption of appropriate control programs and may have contributed to the implementation of inadequate vaccination programs and mistakes in medications. It has been suggested that ineffective treatments of chickens are related to the emergence of multi-drug resistant *Salmonella* strains (1,12,19), to continuous economic losses due to condemnation of flocks and chicken products, and to continuous repercussions in public health by failure to prevent food borne diseases.

To better understand why certain flocks in Colombia were impacted by disease and mortality attributed to *Salmonella*, this bacterium was isolated from samples collected from commercial layers farms from 2008 to 2012. The aim of this study is to report the clinical and diagnostic findings from laying hens involved in these outbreaks. Determining *Salmonella* serotype is important in evaluating *S. enterica* population trends on farm and determining the success of intervention steps. DNA-based methods for serotyping *Salmonella* were thus used to assign serotype. Results from this study suggest that a more complicated epidemiology was present on the farms than initially suspected, based solely on the signs of the birds. On-farm co-habitation of multiple serogroup D *Salmonella* serotypes, including those causing disease in poultry and those causing human illness, may complicate the implementation of intervention methods, as well as our understanding on the best practices to protect the health of people and poultry on a global scale.

MATERIALS AND METHODS

Specimen Collection and Isolation of Bacteria. From 2008 to 2012, 35 cases of high mortality and severe egg drops occurred in commercial brown layers farms in Colombia, located in the states of Cundinamarca, Santander, Bolivar and San Andres. The samples collected from these cases were positive for *Salmonella* spp. To obtain isolates, each group of affected animals was necropsied and samples from liver, spleen or pool of liver, spleen and ovarian follicles were collected for bacterial isolation (Table 1). As part of the regular diagnostic of the LPA, samples were cultured for *Salmonella* following traditional bacteriological methods (24). Briefly, the samples were incubated overnight at 37°C in peptone water. One ml of the sample was then added to 9 ml of selenite broth, and repeated with tetrathionate broth. After overnight incubation at 37°C, samples were streaked onto McConkey Agar, Hektoen Agar and XLD agar (Oxoid®). Plates were incubated for 24 to 48 hours at 37°C. Colonies were examined to identify characteristic morphology of *Salmonella*. Pure cultures were used to perform biochemical confirmation. Finally, serological confirmation was done by transferring a single colony to a glass slide and mixing it with a drop of sterile saline and a drop of polyvalent A-I with Vi O-antigen antiserum. Only 23 out of 35 samples were tested with the O-antigen 9 antiserum (B.D Difco®). After confirming the presence of the bacteria, strains were frozen at -80°C in Brain Heart Infusion (BHI) broth with 15% glycerol.

Inoculation of FTA cards with bacteria. *Salmonella* was cultured from frozen stock in 5 ml of brain heart infusion (BHI) and the suspension was incubated without shaking for 24 h at 37°C. Cultures were plated on XLD agar and incubated for 24 h at 37°C to obtain well separated colonies. One bacterial colony was then transferred to BHI broth and incubated overnight at 37°C. Bacterial suspensions were spotted onto Whatman FTA cards (GE Healthcare USA) as previously described (18). Critical points in the methodology were a) diluting bacterial suspensions to a density that visually matched a McFarland Turbidity Standard of 0.5, b) loading only 115 µl of the adjusted cell suspension to one circle on the Whatman FTA® classic cards, and c) applying the 115 µl at multiple points per circle as previously described (17,18). FTA cards were subsequently shipped under Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) permit number 116119 to the United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service in Athens, GA, USA for further processing.

Table 1: Information regarding *Salmonella* spp. isolated from commercial brown layers in Colombia from 2008 to 2012.

Accession number	Original source	State	Farm Number	Year of isolation	Serotype	Age	Reference
DNA-08-2011-C44	Liver	Cundinamarca	1	2008	D - non-motile	38 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C45	Liver	Cundinamarca	2	2008	D - non-motile	20 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C46	Liver	Cundinamarca	3	2008	D - non-motile	22 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C47	Pool	Cundinamarca	4	2008	D - non-motile	72 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C48	Liver	Cundinamarca	5	2008	D - non-motile	61 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C49	Liver	Cundinamarca	6	2008	D - non-motile	52 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C50	Pool	Santander	7	2008	D - non-motile	62 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C51	Pool	Cundinamarca	8	2008	D - non-motile	77 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C52	Spleen	Cundinamarca	9	2008	D - non-motile	35 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C53	Spleen	Cundinamarca	10	2008	D - non-motile	52 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C54	Pool	Santander	11	2008	D - non-motile	58 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010

DNA-08-2011-C55	Liver	Cundinamarca	12	2008	D - non-motile	54 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C56	Liver	Cundinamarca	13	2008	D - non-motile	31 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C57	Pool	Santander	14	2008	D - motile	Adult ¹	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C58	Pool	Cundinamarca	15	2008	D - motile	Adult ¹	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C59	Liver	Cundinamarca	16	2008	D - motile	25 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C60	Pool	Bolivar	17	2008	D - motile	Adult ¹	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C61	Spleen	Bolivar	18	2008	D - motile	Adult ¹	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C62	Pool	San Andres	19	2008	D - motile	60 Weeks	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C63	Liver	Cundinamarca	20	2008	D - motile	Adult ¹	Mantilla <i>et al.</i> , 2010
DNA-08-2011-C64	Drag swab ²	Cundinamarca	21	2009	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C75	Liver	Cundinamarca	22	2011	D - non-motile	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C76	Liver	Cundinamarca	23	2011	D - non-motile	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C77	Liver	Cundinamarca	24	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C78	Liver	Cundinamarca	25	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C79	Liver	Cundinamarca	26	2011	Not done	Adult ¹	This study

DNA-08-2011-C80	Liver	Cundinamarca	27	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C81	Liver	Cundinamarca	28	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C82	Liver	Cundinamarca	29	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C83	Liver	Cundinamarca	30	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C89	Pool	Cundinamarca	31	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C98	Liver	Cundinamarca	32	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C99	Liver	Cundinamarca	33	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C104	Liver	Cundinamarca	34	2011	Not done	Adult ¹	This study
DNA-08-2011-C129	Liver	Cundinamarca	35	2012	D - non-motile	42 Weeks	This study

Pool: Liver, spleen, ovary. Not done: only isolation of *Salmonella* was done with no further characterization. Adult¹: reported as older than 30 weeks, ²Routine monitoring program – No clinical signs.

All samples included in this study were provided by the Avian Pathology Laboratory at the National University of Colombia; all submissions that were part of thesis research are by the last name and year of completion at LPA.

DNA isolation from FTA cards. DNA extraction from FTA cards was performed as previously described (17,18). Briefly, two discs were obtained per sample using a Harris Uni-Core 3.00 mm sampling tool (Whatman, UK). Discs were washed twice with 200 µl of FTA Purification Reagent followed by two washes with 200 µl TE buffer in 1.5 ml Eppendorf tubes. Discs were washed at 25°C for 5 min in an Eppendorf Thermomixer set at 450 rpm. The buffer was completely removed with a pipette prior to final processing.

PCR and sequencing reactions. The Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) method for *Salmonella* serotyping was conducted as previously described (10), with adaptations introduced to analyze DNA from FTA cards (17,18). The ISR region is the sequence from the first nucleotide after the 23S ribosomal gene to the nucleotide immediately before the tRNA *aspU* gene in the ribosomal region linked to *dkgB* in the *Salmonella* genome (14). Primers for nested PCR are listed in Table 2. As a positive control, DNA from *S. Typhimurium* LT2 was also amplified by nested PCR and yielded a product of approximately 1187 bp, sterile water was included as a negative control. PCR amplifications were conducted in a Fast 96-Well PCR Veriti Thermocycler (Applied Biosystems). PCR parameters included an initial denaturation at 95°C for 10 s, followed by 35 cycles of 94°C for 0 s and 64°C for 40 s and a final extension at 72°C for 10 s. The nested PCR product was resolved in 2% agarose gels with ethidium bromide (E-Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA) in an E-base system from Invitrogen. Images were recorded in a BioRad ChemiDoc XRS scanner and analyzed using the BioRad Quantity One 4.6.5 software (10,17). PCR products were purified for sequencing analysis using the PureLink ® PCR purification kit (Invitrogen) as instructed. DNA concentrations and DNA quality were assessed by spectrophotometry in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, measuring the absorbance at 260 nm to obtain DNA concentration in ng/µl and the 260/280 ratio as an indicator of purity (18). Sequencing was performed by Retrogen Inc. (San Diego, CA) in an ABI Prism® 3730 DNA Analyzer using the primers ISRs2_R42 and ISRs1_F8 (Table 2).

Construction of ISR sequences and Sequence Analysis. Forward and reverse sequencing data corresponding to each individual sample were assembled and aligned using SeqMan Pro Lasergene v8.0 (DNASTAR, Madison, WI) and a database of ISR sequences as previously described (10). Once identified, the ISR sequences were analyzed, and a serotype name was assigned if a 100% similarity was observed with the

sequences included in the ISR sequence database for *Salmonella* serotyping maintained at the USDA-ARS-ESQRU.

Table 2. Primers used for nested PCR Intergenic Sequence Ribotyping (ISR)

Primer Name	Orientation	Primer sequence (5' to 3')	Reference	Amplicon size (bp)
ISR-F1	Forward	GCCAATGGCACTGCCCCGGTA	Guard <i>et al</i> , 2012	1464
ISR-R1	Reverse	TACCGTGCCTTTTCGCCAG	Guard <i>et al</i> , 2012	
nISR-F14	Forward	TGCCCCGAGATGAGTTCTCCC	This study	1187*
nISR-R14	Reverse	CACCCGGAGATGGCCAGTGGAT	This study	
ISRs1_F8	Forward	AGGCCGGGTGTGTAAGCGCA	This study	Variable
ISRs2_R42	Reverse	CGGAACGGACGGGACTCGA	This study	

*Size of amplicon may vary as much as 250bp between serotypes

DNA microarray hybridization assay. Some isolates had a unique sequence in the ISR region, which indicated that serotype for that sequence had not yet been assigned. In these cases, DNA was analyzed by using an Association of Official Analytical Chemists (AOAC) approved DNA hybridization microarray *Salmonella* serotyping method (Check & Trace by Checkpoints, Wageningen, The Netherlands) (10). This procedure was modified to analyze DNA extracted from FTA discs (17). Briefly, three to five FTA discs were placed into a 1.5 ml Eppendorf tube containing 0.5% SDS and 0.5 mg/ml Proteinase K in 180 µl distilled water. Tubes were briefly vortexed and incubated at 55°C for 60 min at 450 rpm in an Eppendorf Thermomixer. DNA was extracted from the liquid fraction using a PureLink™ Genomic DNA kit, following the protocol for Gram negative bacteria cell lysates after proteinase K digestion.

Afterwards, 10 µl of extracted DNA were added to the PCR reaction tubes and the procedure was followed as indicated by the manufacturer.

RESULTS

Clinical signs and lesions. The clinical data available showed that most cases of morbidity and mortality (94.3%) occurred in hens during egg production (Table 1). Variable degrees of depression, diarrhea, anorexia and decreased water consumption were reported. Labored breathing and gasping were observed in some birds. Mortality ranged from 20% to 50%. In all cases, drops in egg production up to 50% of daily flock production were reported. Necropsy findings included hepatic lesions characterized by hepatomegaly with mild to moderate greenish discoloration (bile-stained liver) and white spots scattered in the parenchyma (multifocal necrosis) along with splenomegaly and some mottled spleens. Enlarged and congested kidneys with mild to severe greenish discoloration were observed in two cases. Typhilitis with cecal cores was observed in one case. The ovarian follicles were atrophic and hardened, showing nodular or regressing follicles with discoloration and misshapen. This feature has been referred to as a Pullorum lesion sometimes. The presence of flat and round worms was detected in two cases.

Salmonella was isolated mainly from liver and spleen (71.42%) and a lower proportion (25.71%) was isolated from pooled organs (liver, spleen and ovary). In one case (2.85%), it was isolated from a drag swab of an egg collection belt during routine sampling included in a monitoring program. However, no clinical signs were reported in this case (Table 1).

ISR and DNA-Hyb Serotyping: *Salmonella* DNA samples that were successfully amplified showed the expected size (DNA amplicon bands of approximately 1187 base pairs (bp) (14). It was possible to serotype thirty-two (91.43%) out of 35 *Salmonella* spp. isolates by ISR. Three samples were removed from analysis because DNA was not recoverable from FTA cards. Four samples (11.43%) had mixed *Salmonella* serotypes (Table 3).

Sequencing showed that ISR sizes ranged from 258 to 499 bp. Sixteen out of 35 (45.71%) isolates were *S. Enteritidis* (499 bp) and thirteen (37.14%) were *S. Gallinarum* (498 bp). Seven isolates (14.29%) were classified as unique ISR serotypes. Of these,

five were designated as UN0038 (258 bp) and the other two isolates as UN0052 (498 bp) and UN0054 (499 bp), respectively (Table 3).

DNA microarray hybridization identified the seven strains with unique ISRs encompassing 3 different serotypes as *S. Isangi* (UN0038), *S. Braenderup* (UN0052) and *S. Yoruba* (UN0054) (Table 4). *S. Isangi* was isolated from samples collected in 2008 while *S. Yoruba* and *S. Braenderup* were isolated from samples from 2009 and 2011, respectively. *S. Yoruba* was isolated from the one positive drag swab and no illness was reported in this flock. *S. Braenderup* was isolated from liver samples of adult hens showing mild depression, diarrhea and drop in egg production.

DISCUSSION

In this study, 35 *Salmonella enterica* samples isolated from commercial layer farms located in four states of Colombia were analyzed (Table 1). Most of the samples (n=29) were from the state of Cundinamarca, which is considered the principal poultry producer in the country; in this state there are regions involved in the production of commercial eggs, (mainly brown eggs). According to the field observations of the first author, some of the egg production areas exhibit risk factors for the presentation of salmonellosis. These areas are mainly characterized for the presence of multiage farms with high stock densities, and in many cases with inefficient or improper practices for the disposal of the mortality, and also by the inadequate mobilization of wastes and culled hens. Deficiencies in the biosecurity programs have been also identified.

The analyzed cases occurred mostly in 2008 (20 cases) and 2011 (13 cases), two cases occurred on 2009 and 2012, respectively. Unfortunately, epidemiological studies about the situation of *Salmonella* in commercial layers in Colombia are not available, *Salmonella* prevalence is unknown, and there is not information about the circulating *Salmonella* serotypes (13). Moreover, these few studies have not been published in peer reviewed journals, only in national trade magazines or proceedings of national and international seminars (16,19,20). On the other hand, some studies carried out with commercial layers have been focused on the evaluation of clinically healthy flocks, with the collection of environmental samples (16), whereas in this study, most of the cases involved flocks clinically sick.

Table 3. *Salmonella* serotypes present in commercial brown laying hens

<i>Salmonella</i>	ISR size	Age (Weeks)							
		ISR Serotype	(bp)	Total	%	20 – 30	31-40	41-60	>60
Enteritidis	499		15	42.86	1	—	2	1	11
Enteritidis and UN0038 ²	499/258		1	2.86	—	1	—	—	—
Gallinarum	498		10	28.57	—	2	2	2	4
Gallinarum and UN0038 ²	498/258		3	8.57	1	—	1	—	1
Unique 0038	258		1	2.86	—	—	—	1	—
Unique 0052	499		1	2.86	—	—	—	—	1
Unique 0054	498		1	2.86	—	—	1	—	—
Removed from analysis			3	8.57	1	—	—	—	2

¹ Reported as older than 30 weeks

² It was determined that these samples contained a mixture of at least two serotypes as evidenced by the presence of different forward and reverse ISR sequences.

In Colombia, salmonellosis diagnostic capabilities are limited, and they are based mostly on the isolation and identification of *Salmonella* spp with no further characterization of the isolates. The limited information on the prevalence of *Salmonella* in poultry products evidences the lack of systematic studies that allow determining the mechanisms of contamination of the poultry facilities and final products (13).

The presence of *S. Enteritidis* or *S. Gallinarum* within the same commercial layers farms calls for similar interventions for two different reasons. Namely, *S. Enteritidis* is a threat to public health and *S. Gallinarum* is a threat to animal health. Methods for breaking the cycle of infection involving both pathogens include quarantines, culling, improvements to biosecurity, replacement of hens with clean stock, and immunization. Implementing continuous monitoring programs to identify changes in pathogenic serotypes on-farm and to assess effectiveness of interventions may facilitate the control of problems due to both serotypes (1,19,24). Considering that globalized markets require reliable supplies of safe products, the poultry industry in Colombia must advocate for the identification and subsequent elimination of dangerous pathogens in their poultry flocks for both reasons, namely the safety of the product and the security of the supply.

Table 4. Serotyping of Uniques ISR serotypes by using DNA hybridization microarray *Salmonella* serotyping method.

Accession number	Source	Year of isolation	ISR		DNAhyb*
			<i>Salmonella</i> serotype	ISR size (bp)	
DNA-08-2011-C44.1	Liver	2008	UN0038	258	Genovar 13416 - Isangi
DNA-08-2011-C44.2	Liver	2008	Enteritidis	499	Genovar 13416 - Isangi
DNA-08-2011-C51	Pool	2008	UN0038	258	
DNA-08-2011-C54.1	Pool	2008	Gallinarum	498	Genovar 13416 – Isangi
DNA-08-2011-C54.2	Pool	2008	UN0038	258	
DNA-08-2011-C58.1	Pool	2008	Gallinarum	498	Genovar 13416 – Isangi
DNA-08-2011-C58.2	Pool	2008	UN0038	258	
DNA-08-2011-C59.1	Liver	2008	UN0038	258	Genovar 13416 – Isangi
DNA-08-2011-C59.2	Liver	2008	Gallinarum	498	Genovar 13416 – Isangi
DNA-08-2011-C64	Drag swab	2009	UN0054	499	Yoruba 14615
DNA-08-2011-C104	Liver	2011	UN0052	498	Braenderup 9610

In this study, *S. Enteritidis* was identified in 45.71% of samples from farms suspicious to be suffering outbreaks of fowl typhoid based on clinical signs. In 37.14% of the cases, *S. Gallinarum* was identified. It is unknown if the presence of *S. Enteritidis* altered the presentation of *S. Gallinarum* or vice versa, or how relative ratios impacted the disease in hens. Compared to *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* displays an attenuated virulence for hens while remaining the world’s most common cause of food borne salmonellosis (15,22). For example, previous research suggests that infection of hens by *S. Enteritidis* has the potential to increase egg production (9). If the disease presentation decreases in a flock as *S. Enteritidis* emerges, farmers may form the wrong idea that they are controlling disease, when in reality they may be at a tipping point for producing contaminated eggs. The frequency with which the *Salmonella* serotypes were isolated strongly suggests that they do not displace each other (2), but may instead represent a succession that eventually limits morbidity and mortality within any given flock.

Other *Salmonella* serotypes identified in this study (Isangi, Yoruba, and Braenderup) have been identified occasionally in birds but they mostly had been associated with contaminated poultry feed and environmental samples (5, 23). More research is needed to determine the way *Salmonella* serotypes interact with each other and how they might impact the epidemiology to two major pathogens such as *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum*.

In many countries of the European Union, *Salmonella* control programs in laying hens appear to have contributed to a reduction in the prevalence of human salmonellosis. This is the case in Denmark and Belgium where the implementation of plans for the eradication of *Salmonella* in table-egg production correlated to a decrease in the proportion of infected layer flocks and to a reduction in the number of reported cases of human salmonellosis (6). The results obtained in the present study show the need for implementing similar control measures to achieve the reduction of *Salmonella* in poultry farms in Colombia to assure both the safety of food and the economic viability of the industry. Those measures must include constant monitoring of these operations, improvement of the diagnostic technics that includes serotyping of *Salmonella* isolates, as well as compliance to strict biosecurity plans and careful vaccination plan designs.

REFERENCES

1. Barrow, P. A. The paratyphoid *salmonellae*. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 19:351-375. 2000.
2. Baumler, A. J., B. M. Hargis, and R. M. Tsois. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. Science 287:50-52. 2000.
3. Berchieri, Jr., A., G. Oliveira, L. Soeiro, and P. A. Barrow. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hens. Brazilian J. Microbiol. 31:50-52. 2000.
4. Braden, C. R. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. Clin. Infect. Dis. 43:512-517. 2006.
5. Dieckmann, R. and B. Malorny. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 77:4136-4146. 2011.

6. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. *EFSA J.* 8(4):1546:1-86. 2010.
7. Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Gast, T. J. Humphrey, and F. Van Immerseel. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:718-738. 2009.
8. Gast, R. K. Paratyphoid Infections. In: *Diseases of poultry*, 12th ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 583–613. 2008.
9. Guard-Bouldin, J. and R. J. Buhr. Evaluation of eggshell quality of hens infected with *Salmonella enteritidis* by application of compression. *Poult Sci* 85(1):129-135. 2006.
10. Guard, J., R. Sanchez-Ingunza, C. Morales, T. Stewart, K. Liljebjelke, J. Van Kessel, K. Ingram, D. Jones, C. Jackson, P. Fedorka-Cray, J. Frye, R. Gast, and A. Hinton, Jr. Comparison of *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett.* 337:61-72. 2012.
11. Li, J., N. H. Smith, K. Nelson, P.B. Crichton, D.C. Old, T.S. Whittam, and R. K. Selander. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile *salmonellae*. *J Med. Microbiol.* 38(2):129-139. 1993.
12. Mantilla, J., M. Pulido-Landínez, and J. Jaime. Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 57:168-177. 2010.
13. Ministerio de Salud y Protección Social. Documento de experiencias exitosas de como se ha aplicado el análisis de riesgos en Colombia. Proyecto UTF/COL/. Available at:
[http://www.osancolombia.gov.co/doc/Experiencias Exitosas ARIA Colombia 2012.pdf](http://www.osancolombia.gov.co/doc/Experiencias_Exitosas_ARIA_Colombia_2012.pdf)2013.
14. Morales, C. A., R. Gast, and J. Guard-Bouldin. Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit *rrfH* of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett* 264:48-58. 2006.
15. Porwollik, S., C. A. Santiviago, P. Cheng, L. Florea, S. Jackson, and M. McClelland. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar

Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. J. Bacteriol. 187:6545-6555. 2005.

16. Pulido-Landínez, M. Tifoidea aviar en ponedoras comerciales: diagnóstico y propuesta de control de una enfermedad emergente. Proceedings of 57th Western Poultry Disease Conference - XXXIII Convención Anual ANECA. 2008.

17. Pulido-Landínez, M., R. Sanchez-Ingunza, J. Guard, and V. P. do Nascimento. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in Southern Brazil. Lett Appl Microbiol. 57:288-294

18. Pulido-Landínez, M., V. Laviniki, R. Sánchez-Ingunza, J. Guard, and V.P. do Nascimento. Use of FTA Cards for the Transport of DNA Samples of *Salmonella* spp. from Poultry Products from Southern Brazil. Acta Sci.Vet. 40(4):1073:1-7. 2012.

19. Pulido-Landínez, M., and J. Mantilla. Resurgimiento de la tifoidea aviar. In Proceedings of XII International Seminar in Avian Pathology and Production, University of Georgia and AMEVEA Colombia. Athens Georgia, April 26-30, 2010.

20. Ruiz, J.D., M. Suárez, and C. Uribe. Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Salmonella* spp. en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia. Rev. Col. Cienc. Pec. 19(3):297-305. Available at: <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/236>. 2006.

21. Shivaprasad, H. L. Pullorum Disease and Fowl Typhoid. In: Diseases of Poultry, 12th ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 568–582. 2008.

22. Thomson, N. R., D. J. Clayton, D. Windhorst, G. Vernikos, S. Davidson, C. Churcher, M. A. Quail, M. Stevens, M. A. Jones, M. Watson, A. Barron, A. Layton, D. Pickard, R. A. Kingsley, A. Bignell, L. Clark, B. Harris, D. Ormond, Z. Abdellah, K. Brooks, I. Cherevach, T. Chillingworth, J. Woodward, H. Norberczak, A. Lord, C. Arrowsmith, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, M. Sanders, S. Whitehead, J. A. Chabalgoity, D. Maskell, T. Humphrey, M. Roberts, P. A. Barrow, G. Dougan, and J. Parkhill. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. Genome Res. 18:1624-1637. 2008.

23. Wierup, M., and P. Hagglblom. An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of *Salmonella* contamination in pig production. Acta Vet. Scand. 52(15):1-9. 2010.

24. World Organization for Animal Health (OIE). Fowl typhoid and pullorum disease. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (online). Part 2. Section 2.1, Chapter 2.3.11. Available at: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. 2012

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Colombian Veterinary Poultry Association (AMEVEA), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Special acknowledgement is made of Tod Stewart (USDA) and Dr. Catalina Torres (National University of Colombia) for their technical assistance. Authors have no conflict of interest to declare, financial or otherwise.

6. CAPITULO IV:

Serotyping and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolates from broiler Vertical Integrations in Colombia

M. Pulido-Landínez,^{**‡} C. Torres,^{*‡} R. Sánchez-Ingunza,[†] J. Guard,[†] and V. P. do Nascimento[‡]

* Avian Pathology Laboratory, College of Veterinary Medicine, National University of Colombia, Bogotá – Colombia.

† United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Athens, GA, USA.

‡ Avian Diagnostic and Research Center, College of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author e-mail: mpulidola@unal.edu.co

ABSTRACT This study analyzed 106 *Salmonella* isolates from different points in broiler vertical integrations of Colombia. It was possible to identify the presence of *Salmonella* in five categories: breeder farm (17.9%), hatchery (6.6 %), broiler farm (38.7 %), processing plant (9.4 %), and feed mills (27.4 %). Among these isolates, 17 serotypes were identified using intergenic sequence ribotyping. The most common serotype was *S. Heidelberg*, followed by *S. Paratyphi B* var. Java, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Tennessee*, and *S. Saintpaul*. Other serotypes identified in smaller proportion were Agona, Isangi, Mbandaka, Urbana, Albany, Javiana, Fresno, Miami, Muenster, Rissen, and one isolate UN0048. *S. Paratyphi B*-Java was the most common serotype in area A, and *S. Heidelberg* in area B. *S. Enteritidis* was present in higher proportion in area A (22%), compared with area B (1.8%). Serotype Gallinarum was present just in samples from area A, in breeder farms (50%), hatcheries (50%), and feed mill (18.2 %). A total of 73 isolates were analyzed for antimicrobial resistance. The analyzed isolates showed multiple levels of resistance, being resistant to at least two up to 15 antimicrobial agents. Seventy two isolates (98.6%) were resistant to three or more antimicrobials meeting the criteria to be designated as multidrug resistant. The results of the present study imply the possibility of cross contamination across the vertical integration. Additionally the presence of *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum* - Pullorum in samples from breeder farms and hatcheries highlight the main role of this serotype in vertical transmission; the presence of these serotypes should be considered as very

important, given that any practices conducted in breeding farms may result in the presence of the same *Salmonella* serotype in broiler farms and other points of vertical integration. These results show the need for the availability of more specific and rapid diagnostic tools for *Salmonella* serotyping in Colombia, and the need of further analysis of the particular characteristics of the different serotypes involved in broiler vertical integrations.

Key words: *Salmonella enterica*. Intergenic sequence ribotyping, Colombia, single nucleotide polymorphism, antimicrobial resistance, broiler vertical integration

INTRODUCTION

The genus *Salmonella* (*S*) is frequently associated with foodborne diseases, chicken meat and eggs are the products most commonly associated with salmonellosis outbreaks in humans around the world (Mead *et al.*, 2010; Gast *et al.*, 2011; Scallan *et al.*, 2011; CDC, 2012). *Salmonella enterica* serotype Enteritidis is considered the serotype most commonly isolated from cases of salmonellosis in humans. This bacterium is able to colonize different organs with no clinical disease in commercial birds; producing contamination of eggs and chicken meat (Gast, 2008; Guard *et al.* 2010). Besides *S. Enteritidis*, other serotypes such as *S. Typhimurium* and *S. Heidelberg* can cause diseases in humans and animals. Specifically in poultry; *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* are considered very important due to their clinical and productive impact. Other serotypes with low frequency of presentation in poultry such as *S. Mbandaka*, *S. Urbana*, and *S. Agona*, among others, have been identified as cause of foodborne diseases associated with different animal products (CDC 2012).

The characterization of all *Salmonella* serotypes present in poultry vertical integrations is important not only because the specific identification of serotypes related to clinical and productive problems is essential to instrument control and treatment programs, but also because they can be contaminants of poultry products and may have an impact in public health. Constant monitoring of different points within a vertical integration (breeder farm, hatchery, broiler farm, processing plant and feed mill) allows for the identification of potential risk factors that may contribute to the cross-contamination at different levels of the production process that may facilitate the spread of *Salmonella* within a poultry operation. Constant monitoring and identification of

specific *Salmonella* serotypes are crucial for the formulation of appropriate control schemes (Davies *et al.*, 1997; Davies and Wray 1997; Liljebjelke *et al.*, 2005).

Furthermore, the monitoring of the antimicrobial resistance is an important contribution to ensure judicious use of antimicrobial products in animals and to prevent the emergence of multidrug-resistant bacteria. Since *Salmonella* is a bacterial genus that can be used as sentinel for antimicrobial resistance (WHO 2009; NARMS 2010; NARMS 2011; NARMS 2012), it is important to establish these characteristics in order to contribute to the knowledge of the behavior regarding antibiotic resistance of *Salmonella* isolates in poultry vertical integrations.

Currently, the broiler industry in Colombia is almost entirely vertically integrated and it has made great technological progress in recent years, it is ranked fifth in Latin America in volume of production (WATT 2013). Beginning as a country whose poultry production was destined only to domestic consumption, today Colombia is an emerging exporter, aimed to the improvement of the country's economy. Additionally, Colombian domestic market increasingly demands for safe products with high nutritional quality. This condition forces the poultry industry not only to improve the management standards and modernization of technology on farms, but also to use new diagnostic tools that enable rapid and reliable identification of pathogenic microorganisms, considering that the control and/or eradication of diseases, and the implementation of successful treatments will depend on the improvement of diagnostic methodologies.

Nowadays in Colombia there is not a specific official program for the control of *Salmonella* and there is a large gap of information, with no systematic or epidemiological studies performed recently in vertical integrations. Additionally, the diagnosis of *Salmonella* is often limited to the determination of the bacteria presence or absence with no further characterization (Ministerio de Salud - Colombia, 2013). Given that this disease influences the purchase decision of many importer countries, the poultry vertical integrations in Colombia must seek to improve their standards related to *Salmonella* in order to enter in the international markets.

The aim of this study was to characterize isolates from five different sources within the vertical integrations in Colombia located in two geographical locations considered as the most important poultry production areas in the country. Isolates serotypes were assigned by both intergenic sequence ribotyping (ISR), single nucleotide polymorphisms (SNPs) based method, and DNA microarray hybridization. The

determination of their antimicrobial resistance was performed by Kirby Bauer disk diffusion susceptibility test. The results of this study may be considered as a baseline for future studies and comparisons in Colombia.

MATERIALS Y METHODS

Specimen Collection

The 106 *Salmonella* spp. isolates analyzed in this study were collected between 2008 to 2013, from broiler vertical integrations located in two Colombian geographical areas named area A (Cundinamarca state, n=50) and area B (Santander and Santander del Norte states, n=56). These isolates were part of the Avian Pathology Laboratory (LPA) collection, at the College of Veterinary Medicine of the National University of Colombia, and they were stored frozen at -80°C in Brain Heart Infusion (BHI) broth with 15% glycerol. With the purpose of analyzing the sources, these were classified into five categories by area: breeder farm, hatchery, broiler farm, processing plant and feed mill (table 1).

DNA Extraction and serotyping by ISR-PCR

Inoculation of FTA cards with bacteria. *Salmonella* isolates were cultured as previously reported (Pulido-Landínez *et al.*, 2012; Pulido-Landinez *et al.*, 2013). Briefly: a loop from frozen stock was cultured in 5 ml of brain heart infusion (BHI) and incubated overnight at 37°C. Cultures were plated on Xylose- Lysine- deoxicholate agar (XLD) and incubated for 24 h at 37°C. One bacterial colony was then transferred to BHI broth and incubated overnight at 37°C. 115 µl of BHI broth (bacterial suspension) were spotted onto Whatman FTA cards (GE Healthcare USA) as previously described (Pulido-Landínez *et al.*, 2012; Pulido-Landinez *et al.*, 2013). FTA cards were subsequently shipped under the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) permit number 116119 to the United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service in Athens, GA, USA for further processing.

DNA isolation from FTA cards. DNA extraction from FTA cards was performed as previously described **DNA isolation from FTA cards**. DNA extraction from FTA cards was performed as previously described (Pulido-Landínez *et al.*, 2012; Pulido-Landinez *et al.*, 2013). Briefly, two discs were obtained per sample. Discs were

washed twice with 200 µl of FTA Purification Reagent followed by two washes with 200 µl TE buffer. Later the discs were washed at 25°C for 5 min in an Eppendorf Thermomixer set at 450 rpm. The buffer was completely removed prior to final processing.

PCR and sequencing reactions. The Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) method for *Salmonella* serotyping was conducted as previously described with adaptations introduced to analyze DNA from FTA cards (Guard *et al.* 2012; Pulido-Landinez *et al.*, 2013). Briefly: PCR amplifications were conducted in a Fast 96-Well PCR Veriti Thermocycler (Applied Biosystems). The set of primers for nested PCR are listed in Table 2.

PCR parameters included an initial denaturation at 95°C for 10 s, followed by 35 cycles of 94°C for 0 s and 64°C for 40 s, and a final extension at 72°C for 10 s. The nested PCR product was resolved in 2% agarose gels with ethidium bromide (E-Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA). Images were recorded in a BioRad ChemiDoc XRS scanner and analyzed using the BioRad Quantity One 4.6.5 software. PCR products were purified for sequencing analysis using the PureLink ® PCR purification kit (Invitrogen) following the manufacturer directions. DNA concentrations and DNA quality were assessed by spectrophotometry (Pulido-Landínez *et al.*, 2012). Sequencing was performed by Retrogen Inc. (San Diego, CA) in an ABI Prism® 3730 DNA Analyzer using the primers ISRs2_R42 and ISRs1_F8 (Table 2).

Construction of ISR sequences and Sequence Analysis. Forward and reverse sequencing data corresponding to each individual sample were assembled and aligned using SeqMan Pro Lasergene v8.0 (DNASTAR, Madison, WI), and a database of ISR sequences was used as reference as previously described (Morales *et al.*, 2006; Guard *et al.*, 2012). Once identified, the ISR sequences were analyzed, and a serotype name was assigned if a 100% similarity was observed with the sequences included in the ISR sequence database for *Salmonella* serotyping maintained at the USDA-ARS-ESQRU. When the ISR sequence of an isolate did not match with any reference sequence included in the database, the isolate was designated as unique.

Table 1: Information regarding *Salmonella* spp. isolates analyzed in this study

Area	Department (State)	Source Category					
		Number of isolates	Breeder farm	Hatchery	Broiler farm	Slaughter plant	Feed mill
A	Cundinamarca	50	10	6	20	3	11
	Santander	54	9	1	19	7	18
B	Santander del Norte	2	—	—	2	—	—
	Total	106	19 (17.9%)	7 (6.5%)	41 (38.7%)	10 (9.4%)	29 (27.4%)

— Dashes means no isolates were available in that category

Table 2. Primers used for nested PCR Intergenic Sequence Ribotyping (ISR)

Primer Name	Orientation	Primer sequence (5' to 3')	Reference	Amplicon size (bp)
ISR-F1	Forward	GCCAATGGCACTGCCCCGGTA	Guard <i>et al</i> , 2012	1464
ISR-R1	Reverse	TACCGTGCGCTTTCGCCCAG	Guard <i>et al</i> , 2012	
nISR-F14	Forward	TGCCCCGAGATGAGTTCTCCC	Pulido <i>et al</i> 2013	1187*
nISR-R14	Reverse	CACCCGGAGATGGCCAGTGGAT	Pulido <i>et al</i> 2013	
ISRs1_F8	Forward	AGGCCGGGTGTGTAAGCGCA	Pulido <i>et al</i> 2013	Does not
ISRs2_R42	Reverse	CGGAACGGACGGGACTCGA	Pulido <i>et al</i> 2013	apply

DNA microarray hybridization assay. Some isolates had a unique sequence in the ISR region; it means that serotype for that sequence had not yet been assigned. In these cases, DNA was extracted from FTA discs (Pulido-Landinez *et al.*, 2013) and it was analyzed by using an Association of Official Analytical Chemists (AOAC), approved DNA hybridization microarray *Salmonella* serotyping method (Check & Trace by Checkpoints, Wageningen, The Netherlands) (Guard *et al.*, 2012). The procedure was followed as indicated by the manufacturer.

Antimicrobial resistance determination of selected isolates: It was possible to test 73 *Salmonella* isolates for susceptibility to 15 antimicrobial agents. Each *Salmonella* isolate was tested by Kirby Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test. Briefly: Two bacterial colonies were added to 2 ml of sterile saline solution (Carlo Erba®). The mixture was poured in Agar Mueller Hinton (Himedia®) in petri dishes. Upon ~~On~~ gelling, the negative antibiotic sensitivity disks were placed using sterile forceps and then the plates were incubated for 24 hours at 37°C. After incubation the zones of inhibition were measured with standard chart (refs) to evaluate antimicrobial resistance to a panel of 15 antimicrobials of 8 classes. The antimicrobials tested, the disk potency and the breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for clinical diagnostic are showed in table 3.

Statistical analysis: The frequency of serotype identification was calculated by serotype, source category, and by geographical area. The frequency of antimicrobial resistance was calculated by serotype and by area; additionally Fisher's exact test was

used to compare the results obtained for antimicrobial resistance between the two analyzed areas. The bacterial susceptibility results were analyzed using the software WHONET 5.6 to determine the percentage of resistant, intermediate and susceptible isolates (%RIS multifile analyses) and to establish the antimicrobial resistance patterns (ARP) by antimicrobial class, and by antimicrobial agent. Following the WHO directions and in order to obtain the antimicrobial resistant patterns (ARP), isolates with intermediate susceptibility results were classified as resistant. (WHO, 2011). *Salmonella* serotypes were considered resistant to the complete antimicrobial class when they showed resistance to all the antibiotics included in that class.

RESULTS

The 106 samples analyzed in this study were isolated from different points in broiler vertical integrations of two important poultry areas of Colombia. It was possible to identify the presence of *Salmonella* spp. in five categories: breeder farm (17.9%), hatchery (6.6 %), broiler farm (38.7 %), processing plant (9.4 %), and feed mills (27.4 %), (Table 1). Among these isolates 17 serotypes were identified. The most common serotype was *S. Heidelberg* (34%), followed by *S. Paratyphi B* var. *Java* (12.3 %), *S. Enteritidis* (11.3 %), *S. Gallinarum* (9.4 %), *S. Tennessee* (8.5 %) and *S. Saintpaul* (6.6 %). Other serotypes identified in smaller proportion (1 and 2 isolates per serotype) were *Agona*, *Isangi*, *Mbandaka*, *Urbana*, *Albany*, *Javiana*, *Fresno*, *Miami*, *Muenster*, *Rissen*, and one unique isolate designated as UN0048 (Table 4).

The analysis by area showed *S. Heidelberg* as the most common serotype in area B, compared with area A (60.7% and 4%, respectively); additionally, in the area B there were identified two *S. Heidelberg* isolates mixed with other serotypes (*S. Gallinarum* and *S. Tennessee*, respectively). *S. Enteritidis* was present in higher proportion in samples from the area A (22%), compared with area B (1.8%). Other serotypes present in the two studied areas were *S. Tennessee*, *S. Saintpaul*, and *S. Agona*. The serotype *S. Paratyphi B* was only identified in samples from the area A (26%). Some serotypes with low frequency of isolation from commercial birds (*Isangi*, *Mbandaka*, *Urbana*, *Albany*, *Javiana*, *Fresno*, and *Miami*) were present only in area B samples; while *S. Muenster* was identified only in area A (Table 4).

Table 3: Antimicrobials tested, disk potency, and breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and used in this study

Antibiotic name	Code	Antibiotic class	Antibiotic subclass	Disk potency (µg)	Breakpoints
Enrofloxacin	ENR			5	17 - 22
Ciprofloxacin	CIP	Quinolones	Fluoroquinolones	5	21 - 30
Norfloxacin	NOR			10	13 - 16
Streptomycin	STR			10	12 - 14
Gentamicin	GEN	Aminoglycosides		10	13 - 14
Amikacin	AMK			30	15 - 16
Ampicillin	AMP	Penicillins b-lactamase		10	14 - 16
Amoxicillin	AMX	inhibitors	Aminopenicillins	10	17 - 20
Chloramphenicol	CHL	Phenicol		30	13 - 17
Florfenicol	FLR			30	15 - 18
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	SXT	Folate pathway inhibitors		1.25/23.75	11 - 15
Tetracycline	TCY	Tetracyclines		30	12 - 14
Doxycycline	DOX			30	11 - 13
Fosfomicin	FOS	Fosfomicins	Fosfomicins	50	13 - 15
Cephalexin	LEX	Cephems-Oral	Cephalosporins	30	14 - 17

Table 4: Serotypes distribution by area identified in *Salmonella* isolates from broiler vertical integrations in Colombia.

ISR <i>Salmonella</i> serotypes	Area A Cundinamarca: N=50						Area B Santander and Santander del Norte: N=56				
	Isolates Source						Isolates source				
	Analyzed Isolates N=106	Breeder farm n=10	Hatchery n=6	Broiler farm n=20	Slaughter plant n=3	Feed mill n=11	Breeder farm n=9	Hatchery n=1	Broiler farm n=21	Slaughter plant n=7	Feed mill n=18
Heidelberg	36 34%	—	—	2 10%	—	—	5 55.6%	—	17 81%	6 85.7%	6 33.3%
Heidelberg and Gallinarum*	1 0.9%	—	—	—	—	—	—	—	—	1 14.3%	—
Heidelberg and Tennessee*	1 0.9%	—	—	—	—	—	—	—	1 4.8%	—	—
Enteritidis	12 11.3%	2 20%	3 50%	4 20%	2 66.7%	—	—	1 100%	—	—	—
Paratyphi B – Java	13 12.3%	—	—	10 50%	1 33.3%	2 18.2%	—	—	—	—	—
Gallinarum	10 9.4%	5 50%	3 50%	—	—	2 18.2%	—	—	—	—	—
Tennessee	9 8.5%	2 20%	—	1 5%	—	2 18.2%	—	—	—	—	4 22.2%
Saintpaul	7 6.6%	1 10%	—	1 5%	—	3 27.3%	2 22.2%	—	—	—	—
Agona	3 2.8%	—	—	2 10%	—	—	—	—	1 4.8%	—	—
Isangi	2 1.9%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2 11.1%
Mbandaka	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2

	1.9%											11.1%
Urbana	2 1.9%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2 11.1%
Albany	1 0.9%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 5.6%
Javiana	1 0.9%	—	—	—	—	—	1 11.1%	—	—	—	—	—
Fresno	2 1.9%	—	—	—	—	—	—	—	1 4.8%	—	—	1 5.6%
Miami	1 0.9%	—	—	—	—	—	—	—	1 4.8%	—	—	—
Muester	1 0.9%	—	—	—	—	1 - 9.1%	—	—	—	—	—	—
Rissen	1 0.9%	—	—	—	—	—	1 11.1%	—	—	—	—	—
UN0048	1 0.9%	—	—	—	—	1 9.1%	—	—	—	—	—	—

-- Dashes indicate no serotype presence in that source.

N: total number of analyzed isolates

n: number of isolates by source.

* It was determined that these samples contained a mixture of at least two serotypes as evidenced by the presence of different forward and reverse ISR sequences.

The analysis of serotypes by category showed that *S. Heidelberg* was present in the area B in broiler farms (81%), slaughter plants (85.7%), breeder farms (55.6%) and feed mill (33.3%); while in the area A, it was just found in broiler farms (10%). Two samples with mixed serotypes (*S. Heidelberg* plus *S. Gallinarum*, and *S. Heidelberg* plus *S. Tennessee*, respectively) were observed in the area B, in slaughter plants (14.3 %), and broiler farms (4.8 %). The greatest proportion of *S. Enteritidis* was identified in area A, in slaughter plants (66.7%), followed by hatcheries (50 %), breeder farms (20 %), and broiler farms (20 %). In contrast, in the area B, it was identified just one isolate serotype *Enteritidis* from a hatchery. *S. Paratyphi B* was identified only in the area A, in broiler farms (50%), slaughter plants (33.3 %) and feed mill (18.2 %). Serotype *Gallinarum* was present just in samples from area A, in breeder farms (50%), hatcheries (50%), and feed mill (18.2 %). Serotype *Tennessee* was identified in breeder farms (20%), feed mill (18.2%), and broiler farms (5%) in area A, and only in feed mill samples (22.2 %) of the area B. The largest proportion of *S. Saintpaul* was found in feed mill samples (27.3 %) of the zone A, followed by breeder farms (10%), and broiler farms (1%); while in the area B this serotype was identified only in isolates from breeder farms (22.2 %). Serotypes with low frequency of presentation in commercial birds were identified only in the zone B and mainly isolated from feed mill samples (Table 4).

Antimicrobial resistance determination: A total of 73 selected isolates were analyzed for antimicrobial resistance. In order to facilitate the analysis, serotypes with low frequency of presentation in commercial birds were grouped as other serotypes. The analyzed isolates showed multiple levels of resistance to the antimicrobial panel tested, being resistant to at least two antimicrobial agents, up to 15agents, representing two to eight antibiotic classes. Seventy two isolates (98.6%) were resistant to three or more antimicrobials meeting the criteria to be designated as multidrug resistant (MDR) isolates. Two *S. Heidelberg* isolates (2.7%) exhibited resistance to all antimicrobials agents tested (Table 5).

Sixty two different antimicrobial resistance patterns were identified. Regarding the class of the quinolones, the highest resistance (72%) was identified to ciprofloxacin, followed by enrofloxacin (62%) while norfloxacin exhibited the lowest resistance (25%). Among the aminoglycosides, gentamicin showed the lowest resistance (16%) and streptomycin the highest (63%). Tested isolates were moderate resistant to the

Table 5: Multidrug resistance patterns among *Salmonella* isolates

ISR <i>Salmonella</i> serotypes	Isolates by serotype	Nonsusceptible		Number of ARP identified	Isolates by serotype		Nonsusceptible		Nonsusceptible	
		Number of classes nonsusceptible	antimicrobial agent resistance range		Number of classes nonsusceptible	antimicrobial agent resistance range	Area A	Area B	Area A	Area B
# Total of isolates tested	73	2 to 8	2 to 15	62	Distribution by area					
Heidelberg	34	5 to 8	8 to 15	26	2	32	8	5 to 8	13 to 15	8 to 12
Paratyphi B - Java	5	6 to 7	8 to 10	5	5	0	6 to 7	0	8 to 10	0
Enteritidis	6	2 to 8	2 to 12	6	5	1	2 to 8	4	2 to 12	4
Gallinarum-Pullorum	4	2 to 6	4 to 10	4	3	1	2 to 6	6	4 to 8	10
Tennessee	7	3 to 6	4 to 11	7	3	4	3 to 5	6	4 to 9	6 to 11
Saintpaul	5	6 to 8	11 to 12	5	3	2	7 to 8	7 to 7	12	11 to 12
Other serotypes *	12	5 to 7	5 to 11	12	1	11	5	5 to 7	9	5 to 11

Other serotypes* : Agona, Isangi, Urbana, Mbandaka, Miami, UN0048, Fresno, Albany, Javiana, Rissen, Muester

penicillins with 69% to Amoxicillin and 52% to ampicillin. Phenicol class showed 34% of resistance to chloramphenicol and 42% to florphenicol. Regarding tetracyclines class, tetracycline showed lower resistant (55%). compared to doxycycline (63%). Isolates tested were 39% resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT) (representing the folate pathway inhibitors class). Fosfomycins exhibited the second lowest resistance among all antimicrobials included in the panel (26%). The resistance to cephalotaxine (a cephalosporin of first generation) was of 64%. Significant differences in antimicrobial resistance were observed by area with streptomycin, ampicillin, tetracycline, and cephalexin (Table 6).

Because of the high diversity of antimicrobial resistance among serotypes, and in order to facilitate the analysis, the antimicrobial resistance of each serotype was analyzed by the class to which each antimicrobial belonged, considering one isolate as resistant to the class if it showed resistance to all the antibiotics included in that class.

Analysis by serotype showed *S. Tennessee* as the most resistant serotype (42.9%) to quinolones, followed by the isolates grouped as other serotypes (33.3 %) and by *S. Heidelberg* (29.4 %). The highest resistance to aminoglycosides was observed in the group that included other serotypes (25%). Regarding penicillins, the highest resistance was observed to serotype Paratyphi B (100%), followed by *S. Gallinarum* (75%), and *S. Heidelberg* (52.9 %). The highest resistance to phenicols was exhibited by serotype *S. Saintpaul* (80%), followed by the group including other serotypes (66.7%), *S. Tennessee* (57.1 %), and *S. Heidelberg* (29.4 %). Serotypes *S. Paratyphi B* and *S. Gallinarum* were 100 % susceptible to phenicols class; in contrast, all *S. Paratyphi B* isolates were 100% resistant to SXT, followed by *S. Heidelberg* and *S. Saintpaul* (70.6% and 40%, respectively). Regarding the class of the tetracyclines, *S. Heidelberg* and *S. Saintpaul* showed the greatest resistance (94.1 % and 80% respectively), followed by *S. Paratyphi* and *S. Enteritidis* (60 and 50 % respectively). *S. Saintpaul* showed the highest resistance to fosfomycins (60%), followed by *S. Heidelberg* (58.8 %). In the case of the cepheems class, the greatest resistance was observed with *S. Paratyphi*, and *S. Saintpaul* (100 %, respectively), followed by *S. Heidelberg* (97.1 %), other serotypes (83 %), and *S. Gallinarum* (75%). Analyzing the pattern ACSSuT, it was observed that *S. Heidelberg* exhibited the highest resistance values (29.4 %). (Table 7)

Table 6: Comparison of antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates by area

Antimicrobial class/ agents by each class	Total of					
	isolates tested		Area A		Area B	
	N=73		N=22		N=51	
	n	%	n	%	n	%
Quinolones						
Enrofloxacin	62	84,9	18	81,8	44	86,3
Ciprofloxacin	72	98,6	21	95,5	51	100,0
Norfloxacin	25	34,2	4	18,2	21	41,2
Amynoglycosides						
Streptomycin*	63	86,3	15,0	68,2	48	94,1
Gentamycin	16	21,9	6,0	27,3	10	19,6
Amikacin	24	32,9	4,0	18,2	20	39,2
Penicillins b-lactamase inhibitors						
Ampicillin*	52	71,2	21,0	95,5	31	60,8
Amoxicilin	69	94,5	20,0	90,9	49	96,1
Phenicols						
Chloramphenicol	34	46,6	8,0	36,4	26	51,0
Florphenicol	42	57,5	10,0	45,5	32	62,7
Folate path way inhibitors:						
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	39	53,4	12,0	54,5	27	52,9
Tetracyclines						
Doxicyclin	63	86,3	16,0	72,7	47	92,2
Tetracycline*	55	75,3	12,0	54,5	43	84,3
Fosfomycins: Fosfomycin	26	35,6	6,0	27,3	20	39,2
Cephems - cephalosporins, 1st generation: Cephalexin*						
	64	87,7	15,0	68,2	49	96,1

* Resistance values with significant differences by Fischer test ($P \leq 0.05$).

Table 7: Nonsusceptible antimicrobial class total resistance by serotype

Antimicrobial class/ agents by each class	ISR Salmonella serotypes (N¹)						
	Paratyphi		Gallinarum-			Other	
	Heidelberg	B - Java	Enteritidis	Pullorum	Tennessee	Saintpaul	serotypes *
	(N=34)	(N=5)	(N=6)	(N=4)	(N=7)	(N=5)	(N=12)
	Resistant isolates to all AM in the class (n)						
Quinolones:	15	0	0	1	3	1	3
ENR+CIP+NOR	(44.1%)	(0.0%)	(0.0%)	(25%)	(42.9%)	(20%)	(25%)
Aminoglycosides:	3	0	0	0	1	0	3
STR+GEN+AMK	(8.8%)	(0.0%)	(0.0%)	(0.0%)	(14.3%)	(0.0%)	(25%)
Penicillins:	18	5	3	3	2	1	1
AMP+AMX	(52.9%)	(100%)	(50%)	(75%)	(28.6%)	(20%)	(8.3%)
Phenicols: CHL+FLR	10	0	0	0	4	4	8
	(29.4%)	(0.0%)	(0.0%)	(0.0%)	(57.1%)	(80%)	(66.7%)
Folate path way	24	5	1	1	2	2	4
inhibitors: SXT	(70.6%)	(100%)	(16.7%)	(25%)	(28.6%)	(40%)	(33.3%)
Tetracyclines:	32	3	3	1	2	4	5
DOX+TCY	(94.1%)	(60%)	(50%)	(25%)	(28.6%)	(80%)	(41.7%)

	20	0	1	0	1	3	1
Fosfomycins: FOS	(58.8%)	(0.0%)	(16.7%)	(0.0%)	(14.3%)	(60%)	(8.3%)
	33	5	4	3	4	5	10
Cephems: LEX	(97.1)	(100%)	(66.7%)	(75%)	(57.1%)	(100%)	(83.3%)
	10	0	0	0	0	1	0
at least ACSSuT ⁵	(29.4%)	(0.0%)	(0.0%)	(0.0%)	(0.0%)	(20%)	(0.0%)

N= Total of isolates examined by serotype

n= # resistance isolates per serotype

Other serotypes* : Agona, Isangi, Urbana, Mbandaka, Miami, UN0048, Fresno, Albany, Javiana, Rissen, Muester

ENR= enrofloxacin. CIP= ciprofloxacin. NOR= norfloxacin. STR= streptomycin. GEN= gentamicin. AMK=amikacin. AMP= ampicillin. AMX= amoxicillin. CHL= Chloramphenicol. FLR=florfenicol. SXT= trimethoprim/sulfamethoxazole. DOX= doxicycline. TCY= tetracycline. FOS= fosfomycins. LEX= cephalixin.

At least resistant to ACSSuT⁵: Ampicilin, chloramphenicol, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and tetracycline.

DISCUSSION

The broiler industry in Colombia is a vertically integrated production, processing, and distribution system. This industry mainly starts in the breeder farms, where there are used different farms during the rearing and laying period, on an all-in, all-out manage. Fertile eggs are mainly hatched in the company's own hatchery and the broiler chicks were placed in owner's and contract growers farms. Broilers are slaughtered mainly in the company's own poultry processing plant. Sometimes slaughter by-products such as feathers and viscera are rendered for inclusion in broiler rations produced in the company's own feed mill. Companies do not use this protein for breeder feed. Similar to other countries, this organization shows a number of potential cross-contamination hazards, such as the use of processed poultry proteins may widespread dissemination of *Salmonella* within an integrated poultry organization (Davies *et al.*, 1997; Davies and Wray 1997).

Analysis of *Salmonella* isolates from different parts of the broiler vertical integration in Colombia identified the presence of *Salmonella* at different points, showing that there is potential risk of cross-contamination and dissemination among different stages of this poultry organization. *Salmonella* was isolated from samples of breeder farms, hatchery, broiler farms, slaughter plant and food processing plant. The highest contamination was observed in broiler farms, followed by feed mills and processing plants. Breeder farms and hatchery exhibited the lowest percentages of contamination. The presence of *Salmonella* in different stages of vertical integration should be considered as a source of both vertical and horizontal transmission of the bacteria (Davies *et al.*, 1997; Davies and Wray 1997; Liljebjelke *et al.*, 2005). The behavior of the areas A and B was similar as previously reported by Donado *et al.*, in 2012, working with samples from broiler farms.

In this study was possible to identify the presence of 17 different serotypes using the ISR method. This genetic diversity shows another of the great difficulties for the implementation of control programs against *Salmonella*, because the specific diagnosis of serotypes acting on broiler integrations is not always available or it is made using techniques lacking of high specificity. Given the importance of *Salmonella* from both public and animal health, it is necessary not only to determine its presence, but also to

identify the specific serotypes that are having a negative impact over the poultry industry.

The serotype most frequently identified in this study was *S. Heidelberg*. It was present in breeder farms, broiler processing plants, and feed mills in area B and in broilers farms in Area A. This serotype has been found in a previous work as the most frequently isolated from broiler farms in Colombia (Donado-Godoy *et al.*, 2012), and the third one identified in chicken meat in USA (NARMS 2010; NARMS 2011). The second serotype most isolated was Paratiphya B- Java, it was identified in the present study only in the area A in broiler farms, slaughter plant and feed mills. In Colombia this serotype was identified as the most prevalent (76.4 %) in broiler farms in 2012 (Donado-Godoy *et al.*, 2012); while in Venezuela in 2007 was the most identified (Boscan-Duque *et al.*, 2007). The results of the present study imply the possibility of cross contamination across the vertical integration, maybe starting at the feed mill (Davies and Wray 1997). Further studies must be carried out to establish the possible interactions between broiler farms and processing plants, such as the role of cages used to transport broilers from the farms to the slaughter plants and the potential cross-contamination hazards, such as the use of processed poultry proteins at the company owned feed mill (Davies and Wray 1997).

S. Enteritidis was identified mainly in area A, it was found in samples from breeder farms, hatchery, broiler farms and slaughter plants. This serotype was not identified in feed mill samples from area A. A similar situation was observed with *S. Gallinarum - Pullorum* (identified in breeder farms, hatcheries and feed mills) in area A, too. Given the important role of *S. Enteritidis* as serotype egg adapted (Guard-Bouldin *et al.*, 2004; Hennessy *et al.*, 2004; Gantois *et al.*, 2009; Gast *et al.* 2010); and the main role of *S. Gallinarum-Pullorum* in vertical transmission; the presence of these serotypes in breeder farms and hatcheries should be considered as very important, given that any practices conducted in breeding farms can promote the presence of *Salmonella* in poultry organizations, and may result in the presence of the same *Salmonella* serotype in broiler farms and other points of the vertical integration (Davies *et al.*, 1997; Davies and Wray 1997; Liljebjelke *et al.*, 2005; Shivaprasad, 2008).

Due the importance of the vertical transmission of *S. Gallinarum-Pullorum* serotypes(Shivaprasad, 2008); these results are showing the importance of establishing an immediate monitoring program as well as control systems specific to this bacterium

in infected farms. The sacrifice of positive breeders could be required in order to achieve the control and eradication of fowl typhoid caused by this serotype.

The presence of serotypes Tennessee and Saintpaul in breeder farms, broiler farms and feed mills were identified in area A, and S. Tennessee and Saintpaul in feed mill and breeder farms, in area B. It indicates the possible widespread dissemination of *Salmonella* across poultry integration. Additionally, these findings are indicating the possible role of food as a possible source of contamination with *Salmonella*, as reported for other serotypes, because contamination of the ingredients of a food production facility should be considered as an important source of the vertical and horizontal transmission of *Salmonella* within integrated broiler production organization (Davies and Wray 1997).

In agreement with other studies, all isolates analyzed in this study were resistant to antimicrobials tested, showing resistance to a minimum of two and a maximum of 15 antimicrobial agents. None of the *Salmonella* isolates was pansusceptible (Donado-Godoy *et al.*, 2012). Considering that 98.6% of the isolates were resistant to three or more than three antimicrobials, they were classified as multidrug resistant. This condition is currently common in poultry products and has been reported mainly for *Salmonella* isolated from chicken meat (NARMS 2010; Goetting *et al.*, 2011; NARMS 2011; Alvarez-Fernandez *et al.*, 2012)

The 17 serotypes identified in this study exhibited a great diversity of antimicrobial resistance patterns. There were identified 62 different ARPs in 73 isolates analyzed. This condition has been identified in other studies of *Salmonella* from poultry (Donado-Godoy *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012). The isolates tested were highly resistant to quinolones and SXT, these products are commonly used in Colombia in poultry, and this resistance has been identified by several authors in Latin America countries where the use of these products is licensed for poultry (Boscan-Duque *et al.*, 2007; WHO, 2009; Mantilla *et al.*, 2010; Donado-Godoy *et al.*, 2012). In contrast, *Salmonella* isolates were 100% susceptible to these antimicrobial agents in countries where these products are prohibited to use in poultry (NARMS, 2011).

The resistance of *Salmonella* to the aminoglycosides has been extensively studied; different mechanisms of developing resistance related to modifying enzymes have been identified (Hur *et al.*, 2012). The resistance to gentamicin in the two areas was low, and similar to that observed by Donado *et al.*, (2012), while resistance to

streptomycin was lower in the area A and higher in the Area B that previously reported by these authors (Donado-Godoy, *et al.*, 2012).

Regarding to phenicols class it was observed higher resistance to florfenicol and chloramphenicol in area B in comparison with Area A. It is noteworthy that chloramphenicol is banned to use in poultry in Colombia since 1997. Therefore, lower resistance values were expected. When comparing these results with those of other authors, the resistance values of isolates from broiler farms were lower than that observed in vertical integrations (Donado-Godoy *et al.*, 2012).

It was analyzed the frequency of presentation of the pentaresistant pattern (ACSSuT); since this pattern has been linked to *Salmonella enterica* multidrug resistant serotype Typhimurium phage type DT104, (Doran *et al.*, 2006; NARMS 2010; NARMS 2011; Hur *et al.*, 2012). In the present study, 11 isolates (15.1 %) exhibited this pattern. Ten isolates *S. Heidelberg* exhibited the highest frequency (29.4 %) while only one isolated *S. Saintpaul* exhibited this characteristic.

Additional to the above behavior, *S. Heidelberg* exhibited the highest resistance values; two isolates were resistant to 15 antimicrobials. *S. Heidelberg* analyzed in this study showed resistance to gentamicin, streptomycin, amoxicillin, SXT, ampicillin and tetracycline as reported in other studies (NARMS 2011; Donado-Godoy, *et al.*, 2012; Hur *et al.*, 2012). In addition, this serotype was resistant to cephalosporins and fosfomicin.

Since *S. Enteritidis* is one of the serotypes most isolated from cases of foodborne illness in the U.S. and Europe (EFSA 2011; CDC 2012), it requires the constant monitoring of their prevalence and antimicrobial resistance behavior. Similar to other studies, in the present study this serotype was 100 % sensitive to quinolones, aminoglycosides, and phenicols; while exhibited moderate resistance to penicillins, tetracyclines and cephalosporins (Su *et al.* 2002; NARMS 2011; (Hur *et al.*, 2012).

The serotype Paratyphi B - Java isolated from broiler farms in 2012 showed resistance to 10 antimicrobials (Donado-Godoy *et al.*, 2012). In this study *S. Paratyphi B* exhibited 100% of resistant to penicillins, SXT, cephalosporins, and moderate resistance to tetracyclines. In contrast with broiler farms the isolates examined by Donado *et al.*, (2012), isolates in the present study were 100 % susceptible to quinolones and aminoglycosides.

S. Gallinarum - Pullorum has low frequency of isolation in Europe and the USA, while it is a commonly isolated in some countries of Central and South America and

Asia (Shivaprasad 2008; Hur *et al.*, 2012). In countries where this serotype is prevalent, the affected birds are treated with antimicrobial agents. The current study showed that this serotype was 100% susceptible to quinolones, aminoglycosides and phenicols. Showing a different behavior to that found by other authors (Hur *et al.*, 2012).

The MDR exhibited by serotypes Isangi, Urbana, Mbandaka, Miami, Fresno, Albany, Javiana, Muesnter, Rissen, and Agona (serotypes with low frequency of isolation from poultry products), raises questions about the origin of this resistance. Several of these serotypes have adapted to a broad animal host range (cattle, turkeys, pigs etc.) or they have been identified as contaminants in raw materials (CDC 2012). In some cases the resistance does not necessarily reflect recent drug exposure. It is possible that the coexistence of bacteria originating from different animal species and sharing the same ecological niche has facilitated the acquisition of mobile elements, such as plasmids and transposons, causing this MDR in *Salmonella* isolates from poultry (Levy *et al.*, 2004; Miriagou *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2010). The resistance to antimicrobial agents tends to occur with different frequencies and in different periods and places. Regardless a variety of differences in susceptibility of the serotypes prevalent in a region, even within the same serotype, have been observed. This also suggests the existence of great diversity among bacteria that could be due to subtle differences such as single nucleotide polymorphisms, or by minor genetic changes only detectable by genotypic tests (Miriagou *et al.*, 2006; Guard-Bouldin *et al.*, 2007).

The results of this study show the need for the availability of more specific and rapid diagnostic tools for *Salmonella* serotyping in Colombia, and the need of further analysis of the particular characteristics of the different serotypes involved in broiler vertical integrations. Considering the importance of antimicrobial resistance from a public health point of view, this study contributes to the knowledge of the current situation in Colombian broiler vertical integrations, highlighting the fact that the detection of multidrug resistant isolates must be considered as an important issue related with *Salmonella* in this country. Currently it is particularly important for the poultry industry to generate research aimed to understand the emergence, persistence, and spread of antimicrobial resistance in order to establish strategies to minimize the development of this resistance as well as measures to prevent its spread.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Colombian Veterinary Poultry Association (AMEVEA), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Special acknowledgement is made of Tod Stewart (USDA) for his technical assistance. Authors have no conflict of interest to declare, financial or otherwise.

REFERENCES

- Allen, H. K., J. Donato, et al. 2010. "Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments." *Nat Rev Microbiol* 8(4): 251-259.
- Alvarez-Fernandez, E., C. Alonso-Calleja, et al. 2012. "Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006." *Int J Food Microbiol* 153(3): 281-287.
- Boscan-Duque, L. A., A. M. Arzalluz-Fisher, et al. 2007. "Reduced susceptibility to quinolones among Salmonella serotypes isolated from poultry at slaughter in Venezuela." *J Food Prot* 70(9): 2030-2035.
- CDC. 2012. "Summary of Notifiable Diseases — United States, 2010." *Morbidity and Mortality weekly report* - 2010 59, 1-116.
- Davies, R. H., R. A. Nicholas, et al. 1997. "Bacteriological and serological investigation of persistent Salmonella enteritidis infection in an integrated poultry organisation." *Vet Microbiol* 58(2-4): 277-293.
- Davies, R. H. and C. Wray 1997. "Distribution of Salmonella contamination in ten animal feedmills." *Vet Microbiol* 57(2-3): 159-169.
- Donado-Godoy, P., I. Gardner, et al. 2012. "Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance profiles of Salmonella from commercial broiler farms in two important poultry-producing regions of Colombia." *J Food Prot* 75(5): 874-883.
- Doran, G., M. NiChulain, et al. 2006. "Interpreting streptomycin susceptibility test results for Salmonella enterica serovar Typhimurium." *Int J Antimicrob Agents* 27(6): 538-540.
- EFSA, P. o. B. H. 2011. "Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of Salmonella in broilers " *EFSA Journal* 9(7): 95.
- Gantois, I., R. Ducatelle, et al. 2009. "Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis." *FEMS Microbiol Rev* 33(4): 718-738.
- Gast, R. 2008. *Paratyphoid Infections. Diseases of Poultry*. Y. M. Saif. Ames, IA, Blackwell: 583-612.
- Gast, R. K., R. Guraya, et al. 2011. "The relationship between the numbers of Salmonella Enteritidis, Salmonella Heidelberg, or Salmonella Hadar colonizing reproductive tissues of experimentally infected laying hens and deposition inside eggs." *Avian Dis* 55(2): 243-247.
- Gast, R. K., D. R. Jones, et al. 2010. "In vitro penetration of Salmonella Enteritidis through yolk membranes of eggs from 6 genetically distinct commercial lines of laying hens." *Poult Sci* 89(8): 1732-1736.

Goetting, V., K. A. Lee, et al. 2011. "Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature." *J Vet Pharmacol Ther* 34(6): 521-556.

Guard-Bouldin, J., R. K. Gast, et al. 2004. "Subpopulation characteristics of egg-contaminating *Salmonella enterica* serovar Enteritidis as defined by the lipopolysaccharide O chain." *Appl Environ Microbiol* 70(5): 2756-2763.

Guard-Bouldin, J., C. A. Morales, et al. 2007. "Detection of *Salmonella enterica* subpopulations by phenotype microarray antibiotic resistance patterns." *Appl Environ Microbiol* 73(23): 7753-7756.

Guard, J., R. K. Gast, et al. 2010. "Colonization of avian reproductive-tract tissues by variant subpopulations of *Salmonella enteritidis*." *Avian Dis* 54(2): 857-861.

Guard, J., R. Sanchez-Ingunza, et al. 2012. "Comparison of *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica*." *FEMS Microbiol Lett*.

Hennessy, T. W., L. H. Cheng, et al. 2004. "Egg consumption is the principal risk factor for sporadic *Salmonella* serotype Heidelberg infections: a case-control study in FoodNet sites." *Clin Infect Dis* 38 Suppl 3: S237-243.

Hur, j., Jawale, C, Lee, J 2012. "Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review." *Food Research International* 45: 819-830.

Kim, M. S., T. H. Lim, et al. 2012. "Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* species isolated from chicken meats produced by different integrated broiler operations in Korea." *Poult Sci* 91(9): 2370-2375.

Levy, D. D., B. Sharma, et al. 2004. "Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a mutator phenotype." *Antimicrob Agents Chemother* 48(7): 2355-2363.

Liljebjelke, K. A., C. L. Hofacre, et al. 2005. "Vertical and horizontal transmission of salmonella within integrated broiler production system." *Foodborne Pathog Dis* 2(1): 90-102.

Mantilla, J. Pulido-Landínez, M. Jaime, J. 2010. "Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia." *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Rev. Med. Vet. Zoot.* 57: 168-177.

Mead, G., A. M. Lammerding, et al. 2010. "Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective." *J Food Prot* 73(8): 1566-1590.

Ministerio de Salud y Seguridad Social de Colombia. 2013. "Documento de experiencias exitosas de como se ha aplicado el análisis de riesgos en Colombia. Proyecto UTF/COL.

Miriagou, V., A. Carattoli, et al. 2006. "Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids." *Microbes Infect* 8(7): 1923-1930.

Morales, C. A., R. Gast, et al. 2006. "Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit *rrfH* of *Salmonella enterica*." *FEMS Microbiol Lett* 264(1): 48-58.

NARMS. 2012. "Strategic Plan 2012-2016." from <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM236283.pdf>.

NARMS. 2010. "Retail Meat Report 2010. National Antimicrobial Resistance Monitoring System.: 85pp.

<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM293581.pdf>

NARMS. 2011. "Retail Meat Report 2011. National Antimicrobial Resistance Monitoring System." Retail Meat Report, 82 pp.

<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM334834.pdf>

Pulido-Landínez, M. Sánchez-Ingunza, R., Guard, J., Nascimento, V. 2013. "Assignment of serotype to Salmonella enterica isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil." *Lett Appl Microbiol* 57(4): 288-294.

Pulido-Landínez, M. Sánchez-Ingunza, R., Guard, J., Nascimento, V. 2012. "Use of FTA Cards for the Transport of DNA Samples of Salmonella spp. from Poultry Products from Southern Brazil." *Acta Scientiae Veterinariae*, 2012. 40(4): 1073. 40(4): 1-7.

Scallan, E., R. M. Hoekstra, et al. 2011. "Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens." *Emerg Infect Dis* 17(1): 7-15.

Shivaprasad, H. L. 2008. Pullorum Disease and Fowl Typhoid. *Diseases of Poultry*. Y. M. Saif. Ames, IA: 568-582.

Su, L. H., C. H. Chiu, et al. 2002. "Molecular epidemiology of Salmonella enterica serovar Enteritidis isolated in Taiwan." *Microbiol Immunol* 46(12): 833-840.

WATT (2013). "Estadísticas de producción Avícola Latinoamericana." *Industria Avícola* 60(1): 12-34.

WHO.2009. "Annual report of the network for monitoring/surveillance of antibiotic resistance – 2008. informe anual de la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos." *Revista de Patología Tropical* 40 (suplemento 1)(jan./jun. 2011): 1-123.

WHO. 2011. "WHONET: Windows-based database software for Surveillance of Antimicrobial Resistance. Boston, MA."

7. CAPITULO V:



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Martha Pulido Landinez <mpulidola@unal.edu.co>

FW: Avian Diseases Decision for Manuscript #10636-081213-RegR

Michael Mauel <mmauel@mvrld.msstate.edu>
Para: Martha Pulido Landinez <mpulidola@unal.edu.co>
Cc: "Dr. Alejandro Banda" <abanda@mvrld.msstate.edu>

8 de octubre de 2013 10:20

The manuscript has been accepted by Avian Diseases. Yeah!

-----Original Message-----

From: avian.diseases@aaap.info [mailto:avian.diseases@aaap.info]
Sent: Tuesday, October 08, 2013 7:18 AM
To: Michael Mauel
Subject: Avian Diseases Decision for Manuscript #10636-081213-RegR

This message has been scanned by the InterScan for CSC SSM and found to be free of known security risks.

Dear Dr. Mauel,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in an early issue of AVIAN DISEASES. Congratulations.

Allen Press will contact you regarding galleys and other issues in processing your manuscript.

Very sincerely,

Y. M.Saif, DVM, PhD
Avian Diseases Editor
Email: m.saif@aaap.info

**Serotype and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* Isolates from
Commercial Birds and Poultry Environment in Mississippi.**

Martha Pulido-Landínez^{A,D}, Paul Washington^B, Jay Kay Thornton^B, Yi Zhang^B, Roxana Sánchez-Ingunza^C, Alejandro Banda^B, Jean Guard^C, Vladimir P. Nascimento^D, Danny L. Magee^B and Michael J. MaueI^{B,F}

^A Laboratory of Avian Pathology, College of Veterinary Medicine, National University of Colombia, Bogotá, Colombia

^B Mississippi Veterinary Research and Diagnostic Laboratory System, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Pearl, MS 39208

^C United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Egg Safety & Quality Research Unit, Athens, GA, 30605

^D Avian Diagnostic and Research Center, College of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Received _____

^F Corresponding author e-mail: mmauel@mvrld.msstate.edu

SUMMARY. To obtain information about *Salmonella* from commercial birds and poultry environments within Mississippi, 50 *Salmonella enterica* isolates were collected and characterized by Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) serotyping and by determining antimicrobial resistance. ISR assigned serotype to all 50 *Salmonella enterica* isolates, whereas the Kauffman-White-LeMinor antibody-based schema assigned serotype to 48. Agreement between both methods was K=89.58. Within the set, 12 serotypes were detected. The antimicrobial resistance patterns of 12 serotypes, namely Enteritidis, Typhimurium, Kentucky, Bredeney, Mbandaka, Saintpaul, Montevideo, Cubana, Lille, Senftenberg, Johannesburg and one serotype UN0094, were determined using minimum inhibitory concentration values. The antibiograms demonstrated differences between *Salmonella* serotypes and among isolates of the same serotype. All isolates were 100% susceptible to enrofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole. The number of antimicrobials to which the isolates

were resistant ranged from 2 to 9. Twenty-two (22) different ARPs were identified, and ARP1, with resistance to spectinomycin and sulfadimethoxine, was most frequently observed. Forty isolates (80%) were resistant to 3 or more antimicrobials, and were thus designated multidrug resistant. Detection of a unique serotype and variation in antibiograms within the set demonstrates that it is important to periodically survey isolates from a region to follow epidemiological trends.

RESUMEN. Para obtener información acerca de *Salmonella* aislada de aves comerciales y su ambiente en Mississippi, 50 aislados de *Salmonella enterica* fueron colectados y caracterizados asignando sus serotipos usando la técnica de Ribotipificación de Secuencias Intergénicas (ISR, por su sigla en Inglés) y determinando los patrones de resistencia a antimicrobianos. La ISR asignó serotipo a los 50 aislados de *Salmonella enterica*, mientras que mediante el esquema basado en determinación de anticuerpos se tenía serotipo reportado para 48 aislados. La concordancia entre los dos métodos fue $K=89.58$. También fueron establecidos los patrones de resistencia a los antimicrobianos (ARP) de los 12 serotipos de *S. enterica* identificados (Enteritidis, Typhimurium, Kentucky, Bredeney, Mbandaka, Saintpaul, Montevideo, Cubana, Lille, Senftenberg, Johannesburg y un serotipo denominado UN0094), mediante la determinación de los valores de concentración mínima inhibitoria para los antimicrobianos evaluados. Los antibiogramas mostraron diferencias entre serotipos de *Salmonella* así como entre aislados del mismo serotipo. Todos los aislados fueron 100% sensibles a enrofloxacin y sulfatrimetropim. El número de antimicrobianos a los cuales los aislados fueron resistentes varió de 2 a 9. Se identificaron un total de 22 ARPs diferentes, determinándose el ARP1 (resistencia a 2 antimicrobianos: espectinomicina y sulfadimetoxina), como el patrón más frecuentemente observado. Cuarenta aislados (80%) fueron denominados multiresistentes por mostrar resistencia a tres o más antimicrobianos. La detección de un serotipo único y la variación en los antibiogramas dentro del grupo de aislados analizados demuestra que es importante realizar evaluaciones periódicas a los aislados de *Salmonella* de una región para poder hacer seguimiento a las tendencias epidemiológicas.

Key words: *Salmonella* isolates, poultry, serotyping, intergenic sequence ribotyping, antimicrobial resistance, Mississippi.

Abbreviations: ISR= Intergenic sequence ribotyping. BHI= brain and hearth infusion, KWL= Kauffmann-White-Le Minor scheme. AOAC= Association of Official Analytical Chemists. ARP= Antimicrobial resistance pattern. MDR= multidrug resistant. CSLI= Clinical and Laboratory Standards Institute. NARMS= National Antimicrobial Resistance Monitoring System. NVSL= National Veterinary Services Laboratory. PRDL= Poultry Research and Diagnostic Lab. WHO= World Health Organization. AMX= amoxicillin. TIO= ceftiofur. CLI=clindamycin. ENR= enrofloxacin. ERI=erythromycin. FLR=florfenicol. GEN= gentamicin. NEO=neomycin. NOV= novobiocin. OXY= oxytetracycline. PEN= penicillin. SPT= spectinomycin. STR= streptomycin. SUD=sulfadimethoxine. SUT= sulfathiazole. TCY= tetracycline. SXT= trimethoprim/sulfamethoxazole.

Bacteria of the genus *Salmonella* play a predominant role in avian medicine and public health, especially those transmitted by eggs and other poultry products (11,14,17). In 2011, nontyphoidal *Salmonella* was identified as the second most common cause of foodborne illness acquired in United States of America, and the leading cause of hospitalization and death (25). Sometimes the diagnostic resources available for this condition are limited to the simple determination of the presence or absence of *Salmonella* spp. The lack of availability of diagnostic tests to characterize *Salmonella* isolates impedes effective treatment and control, because information is not obtained about changing patterns of distribution, characteristics, and potential sources. Furthermore, the high cost and the long turnaround time for the complete identification of *Salmonella* serotypes may interfere or delay control programs (12).

Currently, the classification of isolates within the *Salmonella* genus is based on the Kauffmann-White-Le Minor scheme (KWL). More than 2,600 serotypes have been described on the basis of the antigenic determinants of the cell surface lipopolysaccharide (O antigen) and the flagellar proteins (H antigen) (9,13). Serotyping of *Salmonella* is an important epidemiological tool that provides information on the prevalence and emergence of serotypes and their behavior in different regions, but sometimes variation in gene expression within a serotype alters antigen presentation on the cell surface, and thus makes identification of serotype impossible for some strains (12). When this happens, other methods of characterization must be pursued after costs have already accrued.

Intergenic sequence ribotyping (ISR) analyzes the region neighboring the gene *dkgB* (previously *yafB*) from the end of the 23S ribosomal gene, throughout the 5S gene and includes the last base pair preceding a tRNA *aspU* ribosomal gene. ISR is able to provide information about subtle genotypic variations, and it provides useful information for the characterization of *Salmonella* isolates according to serotype. ISR is a quick method of serotyping with low equipment and reagent costs. The technique has proven to be sensitive, specific, with high discriminatory power, and high reproducibility and repeatability in comparison to the KLV scheme (12,19,24). Another important aspect is its turnaround time that usually takes no more than three days.

ISR has been compared with an AOAC International certified DNA microarray hybridization method (DNA Hyb, Check & Trace by Checkpoints, Certificate 121001, Association of Official Analytical Chemists), which demonstrated that ISR and DNA Hyb gave essentially the same results with the additional advantages that ISR cost is substantially less. ISR identifies new genetic variants, which can then be related to named serotypes by a process of comparison to both DNA Hyb and the KLV scheme performed by a reference laboratory adhering to international standards (12).

In addition to obtaining information about serotype, surveys of circulating strains are an ideal time to acquire information about antimicrobial resistance in bacteria isolated from poultry that could impact public health. Monitoring of resistance is important information that facilitates judicious use of antimicrobial products in animals and to prevent the emergence of multidrug-resistant bacteria. In the United States, the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) has established *Salmonella* as one of its sentinel organisms (20); for this reason, the antimicrobial resistance patterns of selected *S. enterica* isolates were also determined in this research. One survey of a group this size provides a snapshot to which future information can be compared. These analyses will help provide a baseline for following epidemiological trends in Mississippi involving *Salmonella* in poultry and their environments.

The Mississippi poultry industry is the top agricultural commodity in the state, with a production that exceeded 2.5 billion dollars in 2012. Mississippi ranked fifth in the nation in 2012 based on the number of broilers produced. The poultry sector has a key role in the state's economy, because it employs a high number of direct (28,000) and indirect (27,000) employees; therefore, it has become one of the main pillars of the economy of Mississippi (18,26). This industry must respond to the increasingly strong demand for high nutritional quality and safe poultry products. The availability of new

diagnostic tools that facilitate rapid and reliable identification of pathogenic microorganisms supports the implementation of successful intervention strategies. However, very few state veterinary diagnostic laboratories have capabilities to serotype *Salmonella* by standard procedures such as Kauffmann-White-Le Minor scheme thus; these laboratories have to count on referral or reference labs. In the case of *Salmonella*, Poultry Research and Diagnostic Lab (PRDL) has experienced turnaround times of 30 days or more before obtaining reports on *Salmonella* serotype. For this reason, a new DNA-based approach to serotyping with a turnaround time of 3 days was tested on this group of isolates to compare results. Additionally, there is very few information about the situation of *Salmonella* from poultry in Mississippi, where poultry is the most important agricultural activity. Therefore, the purpose of this study was to characterize 50 poultry *Salmonella* isolates from Mississippi by ISR serotyping, and by the determination of their antimicrobial resistance patterns.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Fifty isolates were obtained from the bacterial collection of the PRDL of the Mississippi State University. These bacteria were isolated between 2008 and 2011, from organs of sick birds, poultry carcasses and hatchery facilities in Mississippi, (Table 1). *Salmonella* strains were cultured from frozen stocks; the cultures were streaked on xylose lisyne tergitol-4 (XLT4) and blood agar plates (Remel Microbiology Products, Lenexa, KS), and incubated for 24h at 37°C to obtain isolated colonies. Serotyping by KWL scheme (48 out to 50 isolates) was performed at the Diagnostic Bacteriology Laboratory, of the USDA, National Veterinary Services Laboratory (NVSL), Ames, IA.

DNA isolation from frozen cultures. To perform DNA isolation, one bacterial colony from XLT4 agar was transferred into Brain Heart Infusion (BHI) broth and incubated overnight at 37°C with shaking. The DNA was extracted from 1 ml of pelleted cells by using DNeasy® Blood & Tissue kit, following the manufacturer's directions (Qiagen, Valencia, CA).

ISR - PCR analysis. The ISR-PCR amplification was performed using 200 nM of primers ISR-F1 and ISR-R1 (Table 2). Three microliters of DNA were added to 47µl of GoTaq® Hot Start Green Master Mix M5122 (Promega Corporation, Madison, WI), in a final volume of 50µl. The PCR program developed by Guard *et al* (12) was adapted

Table 1: *Salmonella enterica* isolates from Mississippi commercial birds and poultry environment included in this study. Serotyping by KWL and ISR

KWL reported serotype	No. of samples	Source	ISR Serotype	ISR Size (BP)
4,5,12 i:-	5	Sick birds; Poultry carcass	Typhimurium 1,4,{5},12,i-	498
Typhimurium	2	Broiler hatchery	Typhimurium 5-DT1	498
Typhimurium (Copenhagen)	2	Poultry carcass	Typhimurium	498
Typhimurium var 5-	1	Broiler hatchery	Typhimurium	498
Enteritidis	10	Sick birds , broiler hatchery, poultry carcass	Enteritidis	499
	1	Poultry carcass	Senftenberg*	499
Bredeney	6	Poultry carcass	Bredeney	365
Kentucky	5	Poultry carcass	Kentucky 8,20,_z6	492
	1		Enteritidis*	499
	5		Mbandaka	499
Mbandaka	1	Poultry carcass	Typhimurium* 1,4,{5},12,i;	
	1		Enteritidis*	499
Saintpaul	2	Poultry carcass	Saintpaul	498
Montevideo	2	Poultry carcass	Montevideo	361

Lille	1	Poultry carcass	Lille	498
Salm sp	1	Sick birds	UN0094	498
Johannesburg	1	Sick birds	Johannesburg	258
Worthington	1	Poultry carcass	Saintpaul*	498
Cubana	1	Poultry carcass	Cubana	395
Multiple serotypes	1	Broiler hatchery	Enteritidis	499

*Variation between reported serotype and ISR serotype

to be carried out in a Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and included the following steps: 94°C for 5min, 30 cycles of 94°C for 1 min and 60°C for 1 min, 72°C for 2 min, final extension 72°C for 5 min. Amplified PCR products were resolved in 1% agarose gels with ethidium bromide. Expected PCR products were approximately 1400 bp in size (12). The PCR product was purified using the PureLink® PCR purification kit (Invitrogen, Carsbald, CA).

DNA sequencing procedures. Sequencing of PCR products was carried out by the dideoxy-nucleotide chain-termination method (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL), using the sequencing primers ISRs1_F8 and ISRs2_R42 (Table 2) (24).

Table 2: Primers used for PCR intergenic sequence ribotyping (ISR)

Primer Name	Orientation	Primer sequence (5' to 3')	Reference	Amplicon size (bp)
ISR-F1	Forward	GCCAATGGCACTGCCCGGTA	Guard <i>et al</i> , 2012	1464
ISR-R1	Reverse	TACCGTGCCTTTCGCCAG	Guard <i>et al</i> , 2012	
ISRs1_F8	Forward	AGGCCGGGTGTGTAAGCGCA	Pulido <i>et al.</i> , 2013	--
ISRs2_R42	Reverse	CGGAACGGACGGGACTCGA	Pulido <i>et al.</i> , 2013	

Construction of ISR sequences and data analysis. Forward and reverse sequencing data corresponding to each individual sample were analyzed using SeqMan Pro Lasergene v8.0 (DNASTAR, Madison, WI). Serotypes were assigned as previously described (12,24).

Antimicrobial susceptibility. The antibiotic susceptibilities of the 50 *Salmonella* ISR serotypes were determined by minimal inhibitory concentration (MIC) using the Sensititre® Microbiologic Systems (Trek Diagnostic Systems Inc., Westlake, OH), following the manufacturer's instructions. The bacterial susceptibility to 17 antimicrobials from 11 classes (table 3) was tested using a customized plate (Avian1F MIC Plate - Trek Diagnostic Systems Inc. Cleveland, OH). The Avian1F plate

determines the MIC for the following antibiotics: amoxicillin (AMX); ceftiofur (TIO); clindamycin (CLI); enrofloxacin (ENR); erythromycin (ERI); florfenicol (FLR); gentamicin (GEN); neomycin (NEO); novobiocin (NOV); oxytetracycline (OXY); penicillin (PEN); spectinomycin (SPT); streptomycin (STR); sulfadimethoxine (SUD); sulfathiazole (SUT); tetracycline (TCY), and trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT). Breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), and FDA-cleared antimicrobials/dilutions for clinical diagnostic use were followed (table 3). *Escherichia coli* (ATCC 25822) was used as a quality control strain.

The microtiter plate employed for this study is used for the routine evaluation of bacteria from poultry and includes antibiotics that are not indicated in the therapy of *Salmonella* infections. However, the results obtained for all antimicrobials evaluated are presented considering that this information may be used as epidemiological markers. In the determination of multidrug resistance and the antimicrobial resistant patterns only 13 out of 17 antimicrobials were used with clindamycin, erythromycin, novobiocin, and penicillin excluded.

Statistical analysis: The frequency of serotype identification was calculated by serotype and source category. Statistical agreement analyses between KWL and ISR serotyping was performed applying the Cohen's Kappa coefficient (2,6,27). The bacterial susceptibility results were analyzed using the software WHONET 5.6 (29). Using this software, the minimum inhibitory concentrations to inhibit the 50%, and 90% of the organisms (MIC₅₀, MIC₉₀), the MIC range for each antimicrobial, and the percentage of resistant, intermediate and susceptible isolates (%RIS multfile analyses), were calculated. WHO considers an intermediate isolate as non-susceptible (29). Thus, for the determination of the ARPs of each isolate, intermediate isolates were included in the resistant category.

RESULTS

Intergenic Sequence Ribotyping (ISR): Fifty *Salmonella enterica* isolates were serotyped with the ISR method by assaying one isolated colony. Turnaround time was 3 days. Twelve *Salmonella* serotypes were identified: Enteritidis, Typhimurium, Kentucky, Bredeney, Mbandaka, Saintpaul, Montevideo, Cubana, Lille, Senftenberg, Johannesburg and one serotype was identified as UN0094. The ISR product sizes ranged from 258 to 499 base pairs (bp). Five *Salmonella* serotype Enteritidis and two

Table 3: Percentages of susceptibility, resistance levels and MIC50 and MIC90 values of 50 ISR *Salmonella* serotypes to 17 antimicrobials

Antibiotic name	Antibiotic class (Subclass)	CLSI Breakpoints				MIC Range		
		($\mu\text{g/ml}$)	%R	%I	%S	MIC50	MIC90	($\mu\text{g/ml}$)
Amoxicillin ²	Penicillin (Aminopenicilins)	S \leq 3 - R \geq 16	16	6	78	1	32	1 – 32
Ceftiofur	Cephems (Cephalosporin III)	S \leq 2 - R \geq 8	14	2	84	1	8	1 – 8
Clindamycin ^{1,2}	Lincosamides	S \leq 0.5 - R \geq 4	100	0	0	8	8	8 – 8
Enrofloxacin ²	Quinolones (Fluoroquinolones)	S \leq 0.25 - R \geq 2	0	0	100	0.125	0.125	0.12 – 0.25
Erythromycin ¹	Macrolides	S \leq 0.5- R \geq 8	100	0	0	8	8	8 – 8
Florfenicol ²	Phenicols	S \leq 2 - R \geq 8	0	54	46	4	4	2 – 4
Gentamicin	Aminoglycosides	S \leq 4 - R \geq 16	8	2	90	0.5	1	0.5 – 16
Neomycin	Aminoglycosides	S \leq 7 - R \geq 32	0	2	98	2	2	2 – 8
Novobiocin ¹	Polypeptides (Coumarins)	S \leq 1 - R \geq 4	100	0	0	8	8	8 – 8
Oxytetracycline	Tetracyclines	S \leq 1 - R \geq 8	12	38	50	1	8	1 – 16
Penicillin G ¹	Penicillins (Penicilins)	S \leq 0.125 - R \geq 0.25	100	0	0	8	16	8 – 16

Spectinomycin	Aminocyclitols	S \leq 16 - R \geq 64	62	38	0	64	128	32 – 128
Streptomycin ¹	Aminoglycosides	S \leq 32 - R \geq 64	0	2	98	16	64	8 – 128
Sulfadimethoxine	Folate pathway inhibitors	S \leq 64 - R \geq 256	90	10	0	>256	>256	128 – 512
Sulfathiazole ²	Folate pathway inhibitors	S \leq 64 - R \geq 256	16	20	64	64	>256	32 – 512
Tetracycline	Tetracyclines	S \leq 4 - R \geq 16	2	2	96	1	4	0,5 – 16
Trimethoprim/sulfa ²	Folate pathway inhibitors	S \leq 2 - R \geq 4	0	0	100	2	2	2 – 2

MIC50-MIC90: minimum inhibitory concentrations for 50% and 90%, Resistance (**R**), Intermediate (**I**), Susceptibility (**S**).

¹No role in the therapy of *Salmonella* infection

² Currently no authorized to use in poultry

Typhimurium were isolated from broiler hatchery environment. The isolates from sick birds (4/50) were serotypes Enteritidis, Typhimurium, Johannesburg, and UN0094, respectively. The remaining 39 isolates were isolated from poultry carcasses and were serotyped as follows: Enteritidis (n=7), Typhimurium (n=8), Bredeney (n=6), Kentucky (n=5), Mbandaka (n=5), Saintpaul (n=3), Montevideo (n=2), Senftenberg (n=1), Lille(n=1), and Cubana (n=1) (Table 1).

Some variants within serotypes Typhimurium and Kentucky were detected by ISR. Three subtypes of *S. Typhimurium* (n=11) were detected, namely *S. Typhimurium* (n=4), *S. Typhimurium* D1 (n=1) and six monophasic *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:-. One variant of *S. Kentucky* (n=5) was detected, namely Kentucky 8,20,_z6. Agreement between KWL and ISR serotyping was observed in 43 out of 48 isolates with reported serotype, with K=89.58 (2,6,27). One isolate previously identified just as *Salmonella* spp. was classified as a unique serotype (UN0094), and one sample reported as “multiple serotypes” was identified as *S. Enteritidis* (Table 1).

Antimicrobial Resistances of *Salmonella* serotypes: All isolates used for this study were susceptible to enrofloxacin and trimethoprim/ sulfamethoxazole. In addition, 98% of the isolates were susceptible to neomycin and streptomycin and 96% were susceptible to tetracycline. As expected for gram-negative *Salmonella*, all isolates were 100% resistant to clindamycin, erythromycin, novobiocin, and penicillin and they had high resistance to spectinomycin and sulfadimethoxine (90.9% and 63.6% respectively). Intermediate susceptibilities were 9.1% and 36.4%, respectively. The minimum inhibitory concentrations (MIC) for 50% and 90% of *Salmonella* isolates included in this study are listed in table 3.

The number of antimicrobials to which the isolates were resistant ranged from 2 to 9 (representing 2 to 7 classes), and thus none were pansusceptible. Forty isolates (80%) were resistant to three or more antimicrobials, which met the criteria to be designated as multidrug resistant (MDR). Two isolates (4%) exhibited resistance to 9 antimicrobials (Table 4). Twenty-two (22) different ARPs were identified. All isolates exhibited resistance to at least two antimicrobials, namely SPT+SUD (ARP1). The second most common ARP observed was ARP4, with eight isolates (16%) having resistance to three antimicrobials. ARP10 was the third most observed, with five isolates (10%) resistant to 4 antimicrobials. Three isolates had ARP21 (n=1) and 22 (n=2) showing resistances to 8 and 9 antimicrobials, respectively (Table 4).

Table 4: Distribution of antimicrobial resistance patterns for 50 ISR *Salmonella enterica* isolates (13 antimicrobials)

Antimicrobial Resistance Pattern (ARP)	ARP N ^o	Number of classes nonsusceptible	Number of antimicrobials nonsusceptible		# Isolates by ARP	%
			antimicrobials	nonsusceptible		
SPT+SUD	1	2	2	2	10	20
ARP 1+SUT	2	2	3	3	1	2
ARP 1 +OXY	3	3	3	3	3	6
ARP1 +FLR	4	3	3	3	8	16
ARP 1 +AMX+OXY	5	4	4	4	1	2
ARP 1 + AMX+TIO	6	4	4	4	2	4
ARP 1+OXY+SUT	7	3	4	4	2	4
ARP 1 +NEO+OXY	8	4	4	4	1	2
ARP 1 + FLR+SUT	9	3	4	4	2	4
ARP 1 +FLR+OXY	10	4	4	4	5	10
ARP 1 +AMX+FLR+SUT	11	5	5	5	1	2

ARP 1+AMX+TIO+OXY	12	5	5	1	2
ARP 1+GEN+OXY+SUT	13	4	5	1	2
ARP 1+FLR+OXY+SUT	14	4	5	3	6
ARP1 +FLR+GEN+OXY	15	5	5	1	2
ARP 1 +AMX+FLR+OXY+SUT	16	6	6	1	2
ARP 1 +AMX+TIO+OXY+SUT	17	5	6	1	2
ARP 1+AMX+TIO+FLR+SUT	18	5	6	1	2
ARP1+TIO+FLR+OXY+SUT	19	5	6	1	2
ARP1+AMX+FLR+OXY+SUT+TCY	20	5	7	1	2
ARP1+ FLR+GEN+OXY+SUT+TCY +STR	21	5	8	1	4
ARP1+AMX+TIO+ FLR+GEN+OXY+ SUT+STR	22	7	9	2	2

Amoxicillin (AMX); ceftiofur (TIO); enrofloxacin (ENR); florfenicol (FLR); gentamicin (GEN); neomycin (NEO); oxytetracycline (OXY); spectinomycin (SPT); streptomycin (STR); sulphadimethoxine (SUD); sulphathiazole (SUT); tetracycline (TCY); trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT).

Relationships between *Salmonella* serotyping by ISR and ARP: There was considerable variety in the ARPs between *Salmonella* serotypes and among the isolates within the same serotype. The ISR *Salmonella* serotypes Enteritidis and Typhimurium displayed the highest variety of ARPs, with 8 and 9, respectively. *S. Kentucky* and *S. Mbandaka* had 4 ARPs each, and *S. Bredeney* and *S. Saintpaul* had 3 each. Both *S. Montevideo* isolates had ARP10. The serotypes that exhibited resistance to the greatest number of antimicrobials tested were *S. Mbandaka*, *S. Saintpaul*, and UN0094 showing resistance to 8 and 9 antimicrobials, respectively (Table 5).

Since *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* are the most common serotypes impacting public health included in this group of isolates, thus comment on how they vary in resistances is warranted. The different *S. Enteritidis* isolates showed resistance from two to seven antimicrobials, and they displayed eight different ARPs, with ARP1 being the most common (4/13). Isolates of *S. Typhimurium* were resistant to two to six different antimicrobials. The three different subtypes of *S. Typhimurium* identified displayed different ARPs (Table 5).

DISCUSSION

Six serotypes identified in the current study, namely Enteritidis, Typhimurium, Kentucky, Mbandaka, Montevideo, and Senftenberg, are within the top ten *Salmonella* serotypes isolated from chicken carcasses in Mississippi in 2009 (30). Seventy serotypes were identified in that study. The ten most common serotypes, comprising 89.5% of all isolates, included Kentucky, Typhimurium, Montevideo, Thompson, Hadar, Senftenberg, Heidelberg, Braenderup, Mbandaka, and Enteritidis. In regards to the feasibility of repeatedly sampling poultry environments on a frequent basis, processing a smaller number of isolates, namely 50 for this study versus 5,223 for the 2009 study, appears to be valid for providing current information on serotypes circulating on-farm when larger studies are not feasible. Reasons for disagreements between typing methods have been explained in detail (12,23), and differences were not frequent enough to impact the general descriptions of serotypes in this study.

NARMS reported that the most common serotypes identified in 2011 from poultry retail products were *S. Typhimurium* (41.8%), *S. Kentucky* (28.5%), and *S. Enteritidis* (13.3%). *S. Mbandaka* was identified in a lower proportion (1.9%). Some serotypes identified in the present study, namely Saintpaul, Senftenberg and Bredeney, were reported by NARMS as only found in ground turkey samples (22). Berrang *et al.* in

2009 also encountered serotypes detected here. They analyzed 20 slaughter plants in 13 states of the U.S. Southwest area, finding 33 *Salmonella* serotypes in carcass rinse samples. The four most prevalent serotypes in that study, representing 64% of the total, were Kentucky, Typhimurium, Heidelberg, and Typhimurium var 5; however, Enteritidis was ranked number 14. Other serotypes identified in lower proportion were Montevideo, Mbandaka, Senftenberg, and Johannesburg (1).

Table 5. Antimicrobial resistance pattern (ARP) distribution by ISR *Salmonella* serotypes

<i>Salmonella</i> ISR Serotype	ARP #	Antimicrobial Resistance Pattern (ARP)	Number of isolates	%
Enteritidis	1	ARP 1	4	30.77
	2	ARP 1 + SUT	1	7.69
	4	ARP 1 + FLR	2	15.38
	7	ARP 1+OXY+SUT	1	7.69
	9	ARP 1 + FLR+SUT	1	7.69
	10	ARP 1 + FLR + OXY	2	15.38
	14	ARP 1+FLR+OXY+SUT	1	7.69
20	ARP1+AMX+FLR+OXY+SUT+TCY	1	7.69	
Total ARPs by serotype	8		Isolates by serotype 13	100
Typhimurium				
Typhimurium	1	ARP 1	1	9.09
Typhimurium5-DT1	1	ARP 1	1	18.18
Typhimurium	3	ARP 1 + OXY	1	9.09
Typhimurium 1,4,{5},12,i-	5	ARP 1 + AMX + OXY	1	9.09
Typhimurium 1,4,{5},12,i-	6	ARP 1 + AMX + TIO	2	18.18
Typhimurium 1,4,{5},12,i-	7	ARP 1+OXY+SUT	1	9.09
Typhimurium	10	ARP 1 + FLR + OXY	1	9.09
Typhimurium 1,4,{5},12,i-	11	ARP 1 +AMX+FLR+SUT	1	9.09
Typhimurium 1,4,{5},12,i-	12	ARP 1 + AMX + OXY + TIO	1	9.09
Typhimurium	17	ARP 1 +AMX+TIO+OXY+SUT	1	9.09
Total ARPs by serotype	9		Isolates by serotype 11	100

	1	ARP 1	1	16.67
Bredene y	3	ARP 1 + OXY	1	16.67
	4	ARP 1 + FLR	4	66.67
Total ARPs by serotype	3		Isolates by serotype	6
				100
Kentucky				
	1	ARP 1	2	40
	3	ARP 1 + OXY	1	20
Kentucky 8,20,_z6	4	ARP 1 + FLR	1	20
	8	ARP 1 + NEO + OXY	1	20
Total ARPs by serotype	4		Isolates by serotype	5
				100
	9	ARP 1 + FLR+SUT	1	20
	14	ARP 1+FLR+OXY+SUT	2	40
Mbandaka	18	ARP 1+AMX+TIO+FLR+SUT	1	20
	22	ARP1+AMX+TIO+ FLR+GEN+OXY+ SUT+STR	1	20
Total ARPs by serotype	4		Isolates by serotype	5
				100
	4	ARP 1 + FLR	1	33.33
Saintpaul	13	ARP 1+GEN+OXY+SUT	1	33.33
	22	ARP1+AMX+TIO+ FLR+GEN+OXY+ SUT+STR	1	33.33
Total ARPs by serotype	3		Isolates by serotype	3
				100
Montevideo	10	ARP 1 + FLR + OXY	2	100
Total ARPs by serotype	1		Isolates by serotype	2
				100
Serotypes with one isolate				
Senftenberg	1	ARP 1	1	
Johanesburg	15	ARP 1 + FLR + GEN + OXY	1	
Lille	16	ARP 1 +AMX+FLR+OXY+SUT	1	
Cubana	19	ARP1+TIO+FLR+OXY+SUT	1	
UN0094	21	ARP1+ FLR+GEN+OXY+SUT+TCY +STR	1	

ARP 1: SPT+SUD: spectinomycin, sulphadimethoxine. Amoxicillin (AMX); ceftiofur (TIO); enrofloxacin (ENR); florfenicol (FLR); gentamicin (GEN); neomycin (NEO); oxytetracycline (OXY); spectinomycin (SPT); streptomycin (STR); sulfadimethoxine (SUD); sulfathiazole (SUT); tetracycline (TCY); trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT).

Trends in antibiotic resistances among bacteria that cause foodborne illness require constant evaluation, in part because fluoroquinolones are important drugs for the treatment of salmonellosis in humans (8,21,22). Similar to previous reports, the 50 isolates in this study were 100% susceptible to quinolones and SXT (1,21,22). The NARMS 2010 Report showed low-level resistance to quinolones in *Salmonella* isolated from turkeys, but a report from 2011 did not observe this resistance in any of meat types analyzed. In the U.S., quinolones are not currently approved for use in poultry (5,8). In countries that still allow the use of these products for treatment of animals, it is common to find resistance to quinolones (3,16,28).

Other findings in this study were that (i) no isolates were pansusceptible, (ii) susceptibilities were higher than 96% to neomycin and tetracycline, and (iii) higher than 80% to streptomycin. In past studies, others identified pansusceptibility in 2009 for more than 50% of serotypes Kentucky, Heidelberg, and Typhimurium (1), and resistances to streptomycin and tetracycline were reported as above 30% and 60%, respectively (1,22). Streptomycin is not a therapeutic antibiotic but it is used frequently for epidemiological analysis associated with penta-antibiotic resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulphonamides and tetracyclines (ACSSuT) (4). Overall, 80% of the isolates tested in this study were classified as multidrug resistant. Recent NARMS reports showed that 44.9% of *Salmonella* isolates from retail chicken breast had resistance to more than three classes of antimicrobials, while 27% showed resistance to more than five classes (20,21). Similarly, *Salmonella* isolates from hen feces showed resistance at least to six antimicrobial products (15). Frequently, serotype Mbandaka has been identified as MDR (21,22). It is important to highlight that 7 out of the 50 isolates (14%) from this study were resistant to ceftiofur, which is only used in veterinary medicine (7, 22).

No one study can define the ecology of *Salmonella enterica* conclusively, but accumulation of information from different researchers using different methods at different times improves understanding of trends present in the on-farm environment of poultry. This study included 50 *Salmonella* poultry isolates from Mississippi, a variety of serotypes with wide differences in their ARPs were observed. Although the conclusions drawn in this study pertain to these isolates, this information reveals the importance of more studies focused on the characterization of *Salmonella* serotypes and their susceptibility to antimicrobials. As more refined methods of assigning serotype by DNA analysis are applied, which are less susceptible to variation in gene expression,

datasets will be more complete and unique serotypes can be more easily detected. In this set of 50 isolates, we detected UN0094 and it had multi-drug resistance. We suggest it is just as important to note findings from small sample sets, because they too increase the density of coverage of a fluctuating ecology. Moreover, continuous efforts on the study of the susceptibility to antimicrobials are needed to identify the evolution and trends of antimicrobial resistance, and also to provide useful information to the poultry industry on developing and instrumenting better strategies of treatment and control.

In regards to small sample sets, individual diagnostic research centers and public health facilities can pool and share information to remain current on which serotypes are in circulation and what antibiotic resistances are common to encounter. In this study, we provide information about serotypes of *Salmonella enterica* commonly encountered in the environment of chickens within Mississippi and note that results compare favorably to previous reports from larger studies in regards to detecting serotypes commonly involved in causing food borne disease. Finally, this study emphasizes the need to develop and evaluate diagnostic tools that are sensitive and specific to identify the variety of *Salmonella* serotypes, and that can be accessible to state veterinary diagnostic laboratories.

REFERENCES

1. Berrang, M. E., J. S. Bailey, S. F. Altekruze, W. K. Shaw, Jr., B. L. Patel, R. J. Meinersmann, and P. J. Fedorka-Cray. Prevalence, serotype, and antimicrobial resistance of *Salmonella* on broiler carcasses postpick and postchill in 20 U.S. processing plants. *J. Food. Prot.* 72:1610-1615. 2009.
2. Cohen, J. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol. Bull.* 70:213-220. 1968.
3. Donado- Godoy, P., I. Gardner, B.A. Byrne, M. Leon, E. Perez-Gutierrez, M.V. Ovalle, M.A. Tafur, and W. Miller. Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* from commercial broiler farms in two important poultry-producing regions of Colombia. *J. Food Prot.* 75(5):874–883. 2012.
4. Doran, G., M. NiChulain, N. DeLappe, C. O'Hare, G. Corbett-Feeney, and M. Cormican. Interpreting streptomycin susceptibility test results for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:538-540. 2006.

5. FDA- U.S. Food and Drugs Administration. Subject: Enrofloxacin for poultry. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/RecallsWithdrawals/ucm042004.htm>. Accessed May 2013. 2005.
6. FDA- U.S. Food and Drugs Administration. Subject: Guidance for Industry and FDA Staff Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests. <http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071287.pdf>. Accessed September 2013. 2007.
7. Frye, J. G., and P. J. Fedorka-Cray. Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30:134-142. 2007.
8. Goetting, V., K. A. Lee, and L. A. Tell. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 34:521-556. 2011.
9. Grimont, P. and Weil, F. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In *WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella* eds. Grimont, P. and Weil, F. Paris, France: Institut Pasteur. 2007.
10. Guard-Bouldin, J., C. A. Morales, J. G. Frye, R. K. Gast, and M. Musgrove. Detection of *Salmonella enterica* subpopulations by phenotype microarray antibiotic resistance patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7753-6. 2007.
11. Guard, J., R. K. Gast, and R. Guraya. Colonization of avian reproductive-tract tissues by variant subpopulations of *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* 54:857-61. 2010.
12. Guard, J., R. Sanchez-Ingunza, C. Morales, T. Stewart, K. Liljebjelke, J. Van Kessel, K. Ingram, D. Jones, C. Jackson, P. Fedorka-Cray, J. Frye, R. Gast, and A. Hinton, Jr. Comparison of dkgB-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett.* 337:61-72. 2012.
13. Guibourdenche, M., P. Rogentin, M. Mikoleit, P. Fields, J. Bockemühl, P. Grimont, F. Weill, Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 161:26-29. 2010.
14. Humphrey, T. and F. Jorgensen. Pathogens on meat and infection in animals - Establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* as examples. *Meat Sci.* 74:89-97. 2006.

15. Li, X., J. B. Payne, F. B. Santos, J. F. Levine, K. E. Anderson, and B. W. Sheldon. *Salmonella* populations and prevalence in layer feces from commercial high-rise houses and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping, antibiotic resistance analysis, and pulsed field gel electrophoresis. *Poult. Sci.* 86:591-57. 2007.
16. Mantilla, J. M. Pulido-Landínez, Jaime, J. Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Rev. Med. Vet. Zoot.* 57:168-177. 2010.
17. Mead, G., A. M. Lammerding, N. Cox, M. P. Doyle, F. Humbert, A. Kulikovskiy, A. Panin, V. P. do Nascimento, and M. Wierup. 2010. Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective. *J. Food Prot.* 73:1566-90. 2010.
18. Mississippi State University Extension Service. History of Mississippi Poultry Industry. <http://msucares.com/poultry/commercial/history.html>. Accessed May 2013. 2010.
19. Morales, C. A., R. Gast, and J. Guard-Bouldin. Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit rrfH of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett* 264:48-58. 2006.
20. NARMS – National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Strategic Plan 2012-2016. Department of Health & Human Services. USA. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm305710.htm>. Accessed May 2013. 2012.
21. NARMS – National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Retail Meat Report 2010. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM312360.pdf>. Accessed Jun 2013. 2012.
22. NARMS – National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Retail Meat Report 2011. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM334834.pdf>. Accessed Jun 2013. 2013.

23. Parker, C. T., E. Liebana, D. J. Henzler, and J. Guard-Petter. Lipopolysaccharide O-chain microheterogeneity of *Salmonella* serotypes Enteritidis and Typhimurium. *Environ. Microbiol.* 3:332-342. 2001.
24. Pulido-Landinez, M., R. Sanchez-Ingunza, J. Guard, and V. P. do Nascimento. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in Southern Brazil. *Lett Appl Microbiol.* Accepted Article, doi: 10.1111/lam.12110. 2013.
25. Scallan, E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, M. A. Widdowson, S. L. Roy, J. L. Jones, and P. M. Griffin. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17:7-15. 2011.
26. Hood, K., A. Myles, D. Peebles, D. Thornton. The Poultry Industry And Its Economic Impact. pp1-8. 2012.
27. Viera, A. J. and J. M. Garrett. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam.Med.* 37:360-363. 2005.
28. WHO – World Health Organization. Annual report of the network for monitoring/surveillance of antibiotic resistance – 2008. <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/viewFile/17413/10419> *Rev. de Patol.Trop.* 40 (1):1-123. 2011.
29. WHO – World Health Organization. WHONET: Windows-based database software for Surveillance of Antimicrobial Resistance. Boston, MA. <http://www.who.int/drugresistance/whonetsoftware/en/>. Accessed Jan. 2013. 2011.
30. Wills, R. W., R. H. Bailey, S. Zhang, V. V. Volkova, S. A. Hubbard, D.L. Magee, J. A. Byrd. Distribution of *Salmonella* Serotypes in Broilers from Day of Hatch through Immersion Chill Tank. Proceedings of the 113 th Annual Meeting of the United States Animal Health Association. San Diego, CA. October 2009. 2010.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by: Mississippi Veterinary Research and Diagnostic Laboratory and Poultry Research and Diagnostic Laboratory of Mississippi State University. Authors have no conflict of interest to declare, financial or otherwise.

8. CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES FINAIS

O objetivo desta tese foi analisar isolados de *Salmonellas* provenientes de amostras de aves e seu ambiente do Brasil (n=155) e da Colômbia (n=141). Além disso, e aproveitando a possibilidade oferecida pela realização de um estágio no Laboratório de Diagnóstico e Pesquisa em Avicultura da Universidade Estadual de Mississippi, foram analisados isolados dos Estados Unidos (n=50). Assim, mediante o uso da técnica de Ribotipificação de Sequências Intergênicas (ISR) foi determinado o sorovar para 343 de 346 isolados de *Salmonella enterica* analisados, além de ter sido verificada a resposta ante os antimicrobianos de 73 amostras da Colômbia e 50 dos Estados Unidos; usando nas primeiras o método de difusão em disco e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) nas últimas.

O DNA dos isolados do Brasil e da Colômbia foi enviado em cartões FTA para análise nos Estados Unidos. Os cartões não apresentaram nenhum crescimento bacteriano. Além disso, 98,99% do DNA dos isolados puderam ser analisados, obtendo-se o sorovar para cada um deles usando a ISR ou a hibridização do DNA no caso dos sorovares denominados “Unique” por não ter uma sequência na base de dados do USDA. Assim, os cartões não constituíram risco biológico nenhum ao serem transportados e ofereceram um meio seguro e efetivo de inativação de bactérias, conservando o DNA em ótimas condições para a posterior análise molecular. Já no caso dos isolados do Mississippi, foram usadas as bactérias puras, obtendo-se 100% dos sorovares das 50 amostras analisadas mediante o uso da ISR. O tempo máximo para obter o sorovar de cada isolado foi de três dias.

A análise dos isolados através da ISR permitiu estabelecer os sorovares de *Salmonella* presentes nas amostras para cada país. No Brasil, foram identificados os sorovares Heidelberg, Enteritidis, Hadar, Typhimurium, Gallinarum, Agona, Cerro, Livingstone, Infantis, Isangi, Mbandaka, Montevideo e Senftenberg; além de três sorovares Unique (UN0041, UN0042, UN0043). Já nas amostras da Colômbia foram identificados os sorovares Enteritidis, Gallinarum, Heidelberg, Paratyphi B var. Java, Tennessee, Saintpaul, Agona, Isangi, Mbandaka, Urbana, Albany, Javiana, Fresno, Miami, Muenster, Rissen Braenderup, Yoruba e um sorovar Unique (UN0048). Nos isolados do Mississippi foram identificados os sorovares: Enteritidis, Typhimurium, Kentucky, Bredeney, Mbandaka, Saintpaul, Montevideo, Cubana, Lille, Senftenberg, Johannesburg e um sorovar Unique (UN0094). Apesar de ter sido identificada uma grande diversidade de sorovares, é importante destacar que para os três países foram

identificados os sorovares Enteritidis e Mbandaka, e que alguns sorovares como Typhimurium, Gallinarum, Isangi, Senftenberg, Agona e Saintpaul estiveram presentes nas amostras de pelo menos dois países. Assim, esses resultados demonstraram a repetibilidade da ISR.

Os resultados dos testes de resistência antimicrobiana mostraram uma grande diversidade entre os sorovares analisados do Mississippi e da Colômbia. Todos os isolados analisados foram classificados como multirresistentes. O aspecto mais importante destas análises é que os isolados do Mississippi foram 100% susceptíveis à enrofloxacin e SXT enquanto os isolados da Colômbia foram resistentes 62% a enrofloxacin e 39% a SXT. Um aspecto importante a considerar é que na Colômbia atualmente está permitido o uso desses antimicrobianos para o tratamento de aves, enquanto nos EUA esses agentes antimicrobianos estão proibidos para serem usados na indústria avícola.

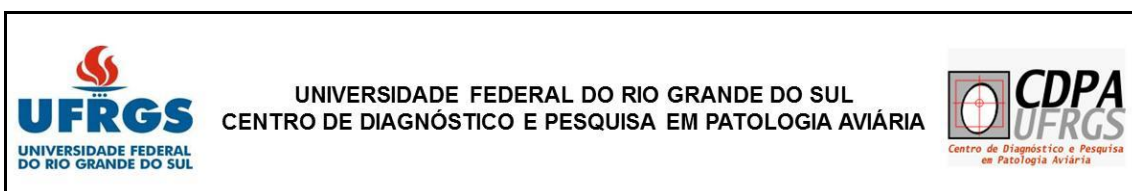
A caracterização de isolados do Brasil, Colômbia e EUA ajudarão para a compreensão da ecologia dessa bactéria nestes países, e fornecerá informações importantes para a formulação de futuros estudos epidemiológicos que procurem identificar os sorovares presentes numa região ou país. O conhecimento dos resultados desta pesquisa trará benefícios para a indústria avícola do sul do Brasil, da Colômbia e do estado do Mississippi, pois a caracterização das cepas isoladas de aves poderá ser utilizada no futuro para o desenvolvimento e adaptação dos programas de controle.

CONCLUSÕES FINAIS:

- O uso dos cartões FTA para futuras pesquisas é viável já que eles não constituem risco biológico nenhum e oferecem um meio seguro para o transporte de DNA.
- A Ribotipificação de Ribotipificação de Sequências Intergênicas permitiu a determinação do sorovar de 343 isolados de *Salmonella enterica* provenientes de aves e seu ambiente de Brasil, Colômbia e os EUA. A ISR demonstrou ser específica, sensível, de alto poder discriminatório e de alta repetitividade. Além disso, foi possível obter o sorovar de cada amostra no máximo três dias.
- Foi possível identificar a diversidade dos sorovares de *Salmonella* circulantes em cada país. Embora estivessem presentes os de maior frequência de isolamento no mundo, também foram identificadas diferenças nos sorovares com baixa frequência de isolamento de aves.

- Foi identificada uma grande diversidade da *Salmonella* na resistência aos antimicrobianos. Todos os isolados analisados foram classificados como multirresistentes.
- Foram identificadas diferenças na resistência aos agentes antimicrobianos entre os isolados da Colômbia e os EUA, possivelmente devidas às diferenças na permissão do uso desses produtos em cada país.

APENDICE A:



**PROPOSTA PARA A PRESERVAÇÃO DA COLEÇÃO DE
BACTÉRIAS DO CDPA:**

BACTERIOTECA-SALMONELLA

**Martha Pulido Landínez
Doutoranda PPGCV – UFRGS
Porto Alegre, Maio - 2012**

SUMÁRIO

- Antecedentes
1. Porque é importante preservar de forma adequada os microrganismos?
 2. Escolha do método de preservação, forma de estocagem e quantidade de alíquotas a conservar.
 - 2.1. Escolha do método de preservação
 - 2.2. Métodos de preservação.
 3. Administração da coleção de bactérias do CDPA
 4. Recomendações para o armazenamento em congelamento de culturas de *Salmonella* usando glicerol
 5. Recuperação de amostras congeladas
 6. Controle de qualidade da preservação
 7. Descrição da Coleção de bactérias do CDPA – *Salmonella*
 - 7.1. Amostras de *Salmonella* estocadas no CDPA selecionadas e organizadas para a pesquisa da doutoranda Martha Pulido- Landínez
 - 7.2. Base de dados da Coleção de Bactérias do CDPA – *Salmonella*: Anexo #1
- Referências 11

LISTA DE TABELAS E ANEXOS

- Tabela 1. Coleção de bactérias do CDPA – *Salmonella*: distribuição das amostras nas criocaixas.
- ANEXO 1 Base de Dados da Coleção de Bactérias do CDPA – Bacterioteca *Salmonella*
- ANEXO 2 Formulário para controle e registro do uso da coleção de bactérias do CDPA - *Salmonella*
- ANEXO 3 Formulário para registro de ingresso de novas cepas à coleção de Bactérias do CDPA - *Salmonella*
- ANEXO 4 Localização das amostras nas criocaixas

Antecedentes

O Centro de Diagnóstico em Pesquisa Aviária (CDPA) tem uma longa trajetória na pesquisa de Salmonelose Aviária, com mais de 20 trabalhos de Mestrado e Doutorado realizados nessa área. Ao longo dos anos, a coleção de Salmonelas trabalhadas em teses e dissertações foi aumentando, mas desafortunadamente não foi criado um sistema efetivo para sua preservação e estocagem.

No ano 2010, começou-se a verificação das amostras de *Salmonella* armazenadas no CDPA visando coletar um número adequado para o desenvolvimento do projeto de tese da Doutoranda Martha Pulido - Landínez (*Ribotipificação de Sequências Intergênicas de cepas de Salmonella enterica subespécie enterica provenientes de produtos avícolas do Brasil e da Colômbia*), assim foi feito um levantamento do material estocado. Foram encontradas várias caixas de isopor contendo mais de 2000 frascos com amostras estocadas em vidros e tubos eppendorf que, segundo informações conhecidas nesse momento, continham as salmonelas em ágar nutriente ou ágar estoque.

Verificados cada um dos frascos foram encontrados os seguintes problemas:

1. Rotulação inadequada, sem seguir um padrão específico.
2. Marcação dupla ou total inexistência de marcação.
3. Ausência de uma base de dados com as informações das cepas estocadas.
4. Características do conteúdo dos frascos: muitos estavam contaminados ou desidratados.

Posteriormente foram pesquisadas informações das bactérias estocadas como procedência, origem do isolamento (órgãos, suabes, carcaça, etc), sorovar, ano de isolamento e constatou-se que menos de 1% das amostras estocadas tinham os dados pesquisados e por isso a maioria das amostras não puderam ser utilizadas para este projeto de tese. Logo, apenas 256 amostras puras de *Salmonella* spp. rotuladas, organizadas em caixas de criopreservação e devidamente identificadas foram separadas para iniciar uma nova Bacterioteca de *Salmonella* em novembro de 2010.

Infelizmente em 2012, talvez como consequência das reformas do CDPA, foram encontrados novamente problemas similares na organização da nova coleção de *Salmonella* e hoje (maio de 2012) só contamos com 234 cepas estocadas, a maior parte delas com duplicata ou triplicata (Anexo N°. 1: **Base de Dados da Coleção de Bactérias do CDPA – Bacterioteca Salmonella**).

O acervo de microrganismos de um laboratório de pesquisa como o CDPA, deve ser considerado como **Patrimônio Institucional** (Kury A. *et al*, 2006). O presente documento visa dar algumas recomendações básicas para a preservação da **Coleção de Bactérias do CDPA**, não pretende ser um documento final para o manejo definitivo desta, mas sim procura deixar um modelo base para o sistema de preservação de microrganismos (inicialmente *Salmonella*) do CDPA. Este documento no futuro poderá

ser modificado a fim de atender as necessidades do laboratório e os requerimentos nacionais e internacionais para a criação de um banco de isolados.

1. Porque é importante preservar de forma adequada os microrganismos?

O CDPA como laboratório de pesquisa em avicultura recebe anualmente alunos de mestrado, doutorado e estagiários, que desenvolvem diferentes experimentos para suas teses, dissertações e pesquisas de iniciação científica. Além disso, muitas vezes a indústria avícola solicita a realização de estudos que respondam a necessidades específicas desse setor. Por isso, é imprescindível a utilização frequente de microrganismos para pesquisa ou ensaios. Respondendo a essas necessidades precisa-se do armazenamento de culturas por longos períodos, originando-se a coleção ou acervo de microrganismos.

No Brasil, o Instituto Fio Cruz é um modelo a ser seguido no conceito sobre a importância dos acervos biológicos, considerando que eles são fundamentais para a geração de conhecimento científico e desempenham um papel estratégico na pesquisa básica, experimentação biológica, prospecção biotecnológica, produção de insumos e bioprodutos em saúde (Pinheiro M., *et al* 2009). No mundo o registro ou patente de produtos baseados em microrganismos gera ingressos importantes para os laboratórios de pesquisa.

O Programa de Pesquisa em Biodiversidade do Ministério de Ciência e Tecnologia brasileiro formulou, no ano 2006, as “**Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade**”. Esse documento considera que os componentes de acervos biológicos, uma vez deteriorados, são de difícil recuperação, pois os ambientes nos quais os espécimes foram obtidos no passado quase sempre se encontram alterados. Essa característica particular das coleções biológicas implica uma maior responsabilidade em sua manutenção. (Kury A. *et al*, 2006). No caso da nossa pesquisa em avicultura, se as amostras de um caso específico se perdem nunca podem ser recuperadas.

O armazenamento de culturas por longos períodos e sua utilização periódica para pesquisa resultam muitas vezes em contaminação, perda da viabilidade e perda das características fisiológicas dos microrganismos. Por isso precisa-se de uma metodologia de preservação de longa duração, para diminuir o crescimento e as atividades metabólicas destes microrganismos. Considerando que os produtos dessas atividades (resíduos metabólicos) podem comprometer a viabilidade das culturas estocadas (Filippis I. 2009).

A preservação em longo prazo, evita problemas com novos isolamentos e economiza tempo, mão-de-obra e custos com material de consumo. Uma coleção de culturas organizada diminui os problemas causados pela falta de experiência dos pesquisadores e pela falta de equipamentos custosos para preservação, além de que pode garantir a sobrevivência, estabilidade e pureza do material experimental (Kury A. 2006, Filippis I. 2009).

2. Escolha do método de preservação, forma de estocagem e quantidade de alíquotas a conservar.

Quando preservamos microrganismos muitos são os aspectos a serem considerados. O primeiro é a estocagem, que deve manter a viabilidade celular que muitas vezes, durante o processo de armazenamento e manipulação, ou é perdida ou diminuída. Um segundo aspecto é a manutenção das propriedades originais das bactérias estocadas, quando se apresentam perdas dessas características o material perde o interesse, logo não justifica a sua conservação. Outro problema inerente à preservação é a possibilidade de que a cultura fique contaminada, nesse caso o método a escolher deve diminuir as chances de contaminação da cultura (Filippis I. 2009)

Os custos de preservação e manutenção vão depender do método escolhido, dos equipamentos disponíveis e sem dúvida do tamanho da coleção. Quando planejamos o número de alíquotas a serem conservadas, devemos sempre pensar em ter réplicas em quantidades adequadas, considerar os custos de manutenção, qual é a nossa capacidade de armazenamento em condições adequadas (freezers disponíveis), tempo necessário para iniciar a coleção e mantê-la (ex. repiques anuais). Sendo também importante diferenciar entre a **coleção para preservação** e as **alíquotas geradas de essas amostras a serem utilizadas nas pesquisas**.

Quando um pesquisador manipula uma amostra do banco só deverá fazer o repique da mesma e retorná-la ao congelador no menor tempo possível (Helms C. 1990, Haldernan D. *et al*, 1995). Uma amostra que pertence ao acervo do laboratório nunca deve ser descongelada, não pode fazer-se outra marcação sobre o frasco original e deve ter informações completas na base de dados.

É importante sempre considerar a coleção como um patrimônio do laboratório, ou seja, é um **Patrimônio Institucional** que tem um valor incalculável e que, sem dúvida, a eventual perda de uma ou várias amostras significa a perda de culturas com potencial biológico importantíssimo para pesquisa e desenvolvimento de novos produtos.

2.1. Escolha do método de preservação:

Na escolha do método de preservação é preciso considerar aspectos como manutenção da viabilidade, frequência de mutações, pureza, custo de manutenção, número de culturas e alíquotas/espaco disponível, valor das culturas, fornecimento e transporte, frequência de uso e disponibilidade de recursos (Filippis I. 2009).

2.2. Métodos de preservação.

Os métodos de preservação a curto e médio prazo exigem um repique contínuo. Amostras estocadas de 4 a 7 °C precisam de repiques cada 4-6 meses. Estes métodos seriam inconvenientes para o CDPA já que exigiria muito trabalho, espaço relativamente grande para armazenamento e pessoal quase exclusivamente dedicado a essa atividade. Além disso, é necessário minimizar o número de repiques para assim evitar a seleção de mutantes, a contaminação das culturas e possível perda da linhagem, características morfológicas, fisiológicas ou patogenicidade. (Filippis I. 2009).

Considerando as características atuais do CDPA, recomenda-se armazenar as amostras usando métodos para preservação a longo prazo, entre eles liofilização e congelamento preferivelmente a -70 ou -80°C . Levando a conta as características do laboratório a criopreservação em nitrogênio líquido não é recomendada.

A **liofilização** teria como vantagens a produção, distribuição e armazenamento de lotes, alta viabilidade durante a estocagem (50 anos), produção de grande número de ampolas/lote, armazenamento simples/pouco espaço. Mas como desvantagens, importantes neste momento, são seu alto custo inicial (O CDPA não tem o equipamento para liofilização) e o uso de diversos reagentes e materiais de laboratório (Filippis I. 2009).

Atualmente o método mais indicado para o CDPA seria o **congelamento de amostras**. A estocagem pode ser feita com congelamento a -20°C ou a $-70 - 80^{\circ}\text{C}$.

- A estocagem a -20°C é um método barato, que requer equipamentos simples, apresenta contaminação reduzida e tem necessidade de pouco espaço. Como desvantagens estão que precisa de monitoração constante dos equipamentos e manutenção frequente dos microrganismos, pois nessa temperatura as estruturas biológicas são instáveis.
- Com armazenamento a -70 ou -80°C as vantagens são estabilidade e armazenamento por longos períodos, mas precisa-se de equipamentos caros (ultrafreezer) com manutenção constante.

3. Administração da coleção de bactérias do CDPA:

Para a preservação adequada da coleção de bactérias de um laboratório de pesquisa deve designar-se uma pessoa que agirá como o administrador do acervo. Essa será a pessoa autorizada para controlar e manter em condições viáveis as amostras. Os pesquisadores que precisarem amostras da coleção terão que solicitar alíquotas ao administrador, que as entregará com prévia solicitação e registro (ver anexo N°. 2: **Formulário para controle e registro do uso da coleção de bactérias do CDPA - Salmonella**).

Ingresso (depósito) de novas cepas: A coleção de bactérias do CDPA vai ser acrescentada à medida que sejam feitas novas pesquisas ou como produto do serviço de diagnóstico realizado pelo laboratório. Cada vez que uma nova cepa ingresse à coleção terá que ser feito seu registro cuidadoso, seguindo o **Formulário para registro de ingresso de novas cepas à coleção de Bactérias do CDPA - Salmonella** (ver anexo N°. 3).

Atualmente, as coleções biológicas estão sendo consideradas de vital importância para a conservação da biodiversidade em países em desenvolvimento, por isso as informações associadas aos acervos, organizadas em bases de dados como procedência, ano de isolamento, origem, características especiais das origens, dados meteorológicos, edáficos etc. são parte essencial para a manutenção da coleção (Kury A. *et al*, 2006).

4. Recomendações para o armazenamento em congelamento de culturas de *Salmonella* usando glicerol

- 4.1. Preparar os rótulos com o nome da bacterioteca e o número de identificação da cepa. Recomenda-se usar etiquetas adesivas (ink jet +laser - *Pimaco A4229 (15 mmx26 mm)*).

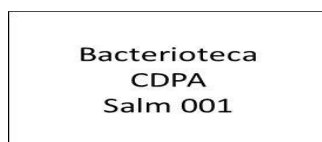


Figura 1. Etiqueta adesiva usada para as bactérias da Coleção de Bactérias do CDPA- Salmonella.

- 4.2. Usar eppendorfs ou criotubos. Colar a etiqueta nos tubos e passar fita durex acima do rótulo para conservá-lo. A melhor opção seria o criotubo, pois a sua vedação e disposição dentro da caixa de criopreservação são melhores que os eppendorfs, por estes possuírem abas em sua tampa.

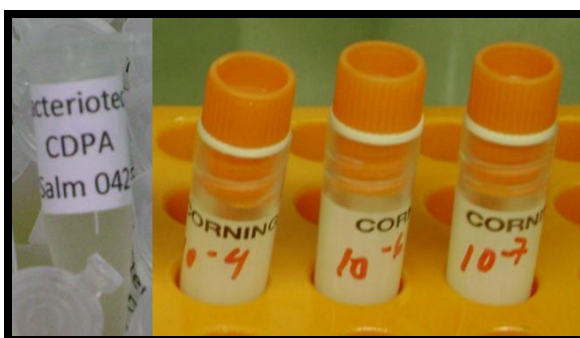


Figura 2. Exemplos de eppendorfs (usados na coleção do CDPA) e criotubos.

- 4.3. Iniciar as culturas de sementes de uma única colônia. Fazer crescer uma cultura fresca durante a noite em caldo BHI, ou no mínimo durante 6 horas (Helms C., 1990; Pulido-Landínez, M. *et al*, 2012).
- 4.4. Para 0,85 ml de cultura bacteriana, adicionar 0,15 ml de glicerol estéril (esterilizado por autoclave). A concentração final de glicerol deve ser 15%, máximo 20% v / v. Misturar a cultura com vortex para assegurar que o glicerol seja uniformemente disperso. Lacrar a tampa do tubo usando parafilme.

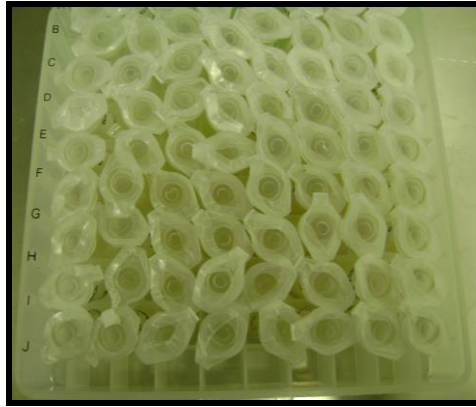


Figura 3. Todas as amostras de Salmonella da Coleção de Bactérias do CDPA foram lacradas usando parafilme. Esse lacre ajuda a preservar a amostra sem contaminação.

- 4.5.** Para organizar os tubos devem usar-se caixas de criopreservação. Nunca usar caixas de isopor, pois esse material produz uma temperatura no seu interior diferente á temperatura do freezer. As crio caixas possuem diferentes modelos e matérias. Abaixo seguem alguns exemplos onde podem observar-se criocaixas com códigos de cores, caixas de papelão e a caixa usada atualmente no CDPA.



Figura 4. Modelos de criocaixas disponíveis no mercado. Para as amostras da coleção do CDPA foram usadas as caixas no quadro superior direito.

- 4.6.** O número de alíquotas a conservar, como descrito acima, dependerá de diversos fatores. E necessário destacar que alíquotas de uma mesma amostra, **devem ser conservadas em caixas diferentes**, assim se ocorrer algum problema com uma caixa causando a perda das amostras se terão as duplicatas em caixas diferentes. Evitando a eventual perda total da amostra.

- 4.7. Congelar em forma gradual, primeiro a -30°C e posteriormente transferir as caixas a $-70/80^{\circ}\text{C}$ para armazenamento a longo prazo. Atualmente, o CDPA não possui um freezer adequado para a preservação de suas coleções (*Salmonella*, *E. coli*, *Arcobacter*, *Campylobacter*). Lembrando que no freezer que é utilizado atualmente são armazenados diversos tipos de materiais (amostras virais, soros, amostras bacterianas, etc) e não somente para a sua coleção bacteriológica. Outro problema que oferece esse tipo de freezer é que não tem um arranjo vertical, isso dificulta a visualização dos materiais estocados.

O ideal seria adquirir um ultrafreezer com arranjo vertical, onde as caixas possam ser armazenadas de uma forma que permita uma fácil manipulação. Na figura a continuação pode observar-se um ultrafreezer onde as amostras são armazenadas em caixas marcadas incluídas em um suporte metálico que também está marcado. Além disso, esse equipamento tem varias divisões o níveis, o que facilita a manipulação e preservação das amostras.



Figura 5. Modelo do Ultrafreezer que poderia ser usado no CDPA (<http://www.thermoscientific.com/ecom/servlet>). Na parte inferior pode observar-se a forma como eram organizadas as bactérias da coleção do USDA-ARS-ESQRU.

5. Recuperação de amostras congeladas:

Para recuperar uma bactéria que está congelada, esta deve ser retirada do freezer em um recipiente que mantenha a temperatura o mais perto possível da temperatura de congelamento. Recomenda-se que este recipiente fique sempre no freezer, assim manterá a mesma temperatura para o transporte da amostra até o lugar de trabalho (fluxo ou bancada). Posteriormente, ao trabalhar no fluxo ou bico de bunsen, usar uma alça estéril (preferivelmente descartável) para raspar a amostra congelada e imediatamente transferir a amostra para o meio (BHI, água peptonada etc.). Devendo-se evitar o descongelamento das bactérias, porque a cada ciclo de congelamento –

descongelamento produz a perda de 50% da viabilidade celular (Helms C. 1990, Haldernan D. *et al*, 1995, Pulido- Landínez, M. *et al*, 2012).

6. Controle de qualidade da preservação

No futuro o CDPA terá que decidir seu sistema de controle de qualidade dos microrganismos estocados. Organizando processos de contagem de população viável antes e após preservação, assim poderá garantir a preservação a longo prazo e a pureza do acervo. Recomenda-se que as culturas armazenadas sejam testadas um mês após o processamento para verificar a viabilidade. O controle de qualidade da preservação pode realizar-se anualmente.

7. Descrição da Coleção de bactérias do CDPA - Salmonella

7.1. Amostras de *Salmonella* estocadas no CDPA selecionadas e organizadas para a pesquisa da doutoranda Martha Pulido- Landínez:

Em total são 234 amostras de *Salmonella enterica*, subespécie *enterica* com sorotipos reportados inicialmente como Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, Hadar, Gallinarum, Pullorum e Agona; embora com a pesquisa de doutorado de Martha Pulido-Landínez foram identificados outros sorotipos e não foram confirmados os sorovares identificados como *S. Pullorum* (ver Anexo 1, coluna ISR sorotipo).

As amostras estão organizadas em 11 criocaixas cada uma delas marcada com seu conteúdo e acrescentando as informações das amostras faltantes como o comentado acima. A distribuição das amostras nas caixas pode observar-se na tabela 1.

7.2. Base de dados da Coleção de Bactérias do CDPA – Salmonella

A base de dados foi organizada em um arquivo do programa Excel, inclui as seguintes informações: # amostra, # cartão FTA, identificação antiga (se tiver), sorotipo reportado CDPA (com base nas informações encontradas durante o levantamento do inventário), sorotipo ISR (essa é a identificação do sorotipo feita na tese da doutoranda M. Pulido- Landínez usando a técnica: “Ribotipificação de Sequencias Intergênicas (ISR)”, (Pulido-Landínez, M. *et al*, 2012, outros artigos em processo de publicação), ano reportado de isolamento, fonte (essa informação faz referencia a pesquisas feitas com essas cepas e ano da pesquisa (Ribeiro, 2007; Borsoi, 2009; Cesco, 2010, Borges, 2011; Perdoncini, 2011) ou se eram das caixas marcadas como lab. Garibaldi), origem (se foi encontrada informação do material usado para isolamento: carcaça, órgãos, suaves etc.). No anexo 4 (**Localização nas criocaixas**) estão registradas as informações de # da amostra, # de duplicatas e localização (criocaixa onde está estocada).

É importante destacar que com a pesquisa usando ISR foram determinados os sorotipos de um total de 158 amostras. As bactérias não incluídas nessa pesquisa tem a sigla NIMP (não incluída na pesquisa de M. Pulido - Landínez) na coluna de sorotipo ISR. As bactérias sem informações aparecem como NI (não informado).

Tabela 1: Coleção de bactérias do CDPA – Salmonella: distribuição das amostras nas criocaixas.

# Crio caixa	Amostras	Faltantes	Imagem
1	001 – 072 Amostra 1	0	
2	001-072 duplicata 1	0	
3	001-072 duplicata 2	0	
4	001-072 duplicata 3	13,22,26,29,69,70,71,72	
5	073-144 Amostra 1	126,127,128,129,130,131, 132	
6	073-144 Duplicata 1	126,127,128,129,130,131, 132	
7	073-144 Duplicata 3	103,125,126,128,129, 130,131,132,144	
8	145-216 Amostra 1	0	
9	145-216 Duplicata 1	182	
10	217-254 Amostra 1	0	
11	217-254 Duplicata 1	254	

Referências

- Borges, K, 2011.** Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* enteritidis através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias, UFRGS.
- Borsoi A., Santin S., Santos L.,Salle T., Moraes H., Nascimento V. 2009.** Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. 2009 Poultry Science 88 :750–758.

3. **Cesco, M; 2010.** Pesquisa de fatores associados a virulência de *Salmonella* Hadar através da reação em cadeia da polimerase (PCR), Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias, UFRGS
4. **Filippis I. 2009.** Palestra: Preservação de Micro – organismos. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS.
5. **Haldernan D., Amy P., Ringelberg D., White D., Garen R., Ghiorse W. 1995.** Microbial growth and resuscitation alter community structure after perturbation FEMS Microbiology Ecology 17: 27-38
6. **Helms C. 1990.** Method: Long Term Storage of Bacterial Strains. On line Protocol. (http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/plasmid/plsmid02.html)
7. **Kury A. et al 2006.** Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade – Brasília : Centro de Gestão e Estudos Estratégicos : Ministério da Ciência e Tecnologia.
8. **Pinheiro M., Santos P., Coelho C. 2009.** Complexo de Preservação e Difusão de Acervos Científicos da Saúde. Casa de Oswaldo Cruz /Fiocruz. Conference on Technology, culture and memory. CTCM. Estrategies for preservation and information access.
9. **Perdoncini G. 2011.** *Salmonella* spp. Em granjas de postura em processo de certificação para produção orgânica em Rio Grande do Sul. Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias, UFRGS.
10. **Pulido M., Laviniki, V., Sánchez R., Guard, J., Nascimento, V. 2012.** Uso dos cartões FTA para o transporte de amostras de DNA de *Salmonella* spp. isoladas de produtos avícolas do Sul do Brasil. Acta Scientiae Veterinariae, 2012. 40(4): IN PRESS.
11. **Pulido M. 2012.** Ribotipificação de Sequências Intergênicas de cepas de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* provenientes de produtos avícolas do Brasil e da Colômbia. Tese Doutorado em Ciências Veterinárias, UFRGS.
12. **Ribeiro, A, 2007.** *Salmonella* Enteritidis de origem aviária: determinação de padrões de resistência antimicrobiana, detecção de mutação no gene *gyrA* de cepas resistentes ao ácido nalidixico, fagotipagem e ribotipagem. Tese doutorado em Ciências Veterinárias, UFRGS.

Anexo 1: Base de Dados da Coleção de Bactérias do CDPA – Bacterioteca *Salmonella*

**CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO**

# BACTE SALM	# CARTÃO FTA	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	ANO	FONTE	GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO (PT) - VER REFERÊNCIAS TRABALHOS NO DOCUMENTO PROPOSTA
1	NIMP	678-138D GIS	Enteritidis	NIMP	1997	T.Ribeiro, 2007	NI
2	NIMP	798	Heidelberg	NIMP	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
3	1	SE 606 G - 05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
4	2	SE1139 G- 05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
5	NIMP	604 G- 05	S.ssp	NIMP	2005	Lab. Garibaldi	NI
6	3	SE 696 G- 05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
7	NIMP	452 G- 05	S.ssp	NIMP	2005	Lab. Garibaldi	NI
8	NIMP	1465 G -04	S.ssp	NIMP	2004	Lab. Garibaldi	NI
9	NIMP	480 G- 05	S.ssp	NIMP	2005	Lab. Garibaldi	NI
10	NIMP	232G- 05	S.ssp	NIMP	2005	Lab. Garibaldi	NI
11	4	SE 699 G -05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
12	NIMP	919 360-02	Heidelberg	NIMP	1998	T.Ribeiro, 2007	NI
13	142	1227 G-04	Pullorum	UN0041	2004	Lab. Garibaldi	NI
14	135	SG 1109 G -07	Gallinarum	Gallinarum	2007	Lab. Garibaldi	NI
15	NIMP	724 G -99	Enteritidis	NIMP	1999	Lab. Garibaldi	NI
16	5	SE 1040 G- 03	Enteritidis	UN0040	2003	Lab. Garibaldi	NI
17	NIMP	02/02/2000	S.ssp	NIMP	2000	Lab. Garibaldi	NI
18	NIMP	713 168-98-GR-18 A	Enteritidis	NIMP	1998	Lab. Garibaldi	NI
19	NIMP	946	Typhimurium	NIMP	NI	Lab. Garibaldi	NI
20	NIMP	697 - 337/97	Enteritidis	NIMP	1997	Lab. Garibaldi	NI
21	NIMP	1098 G 03	S.ssp	NIMP	2003	Lab. Garibaldi	NI
22	143	SP 27-01-2003	Pullorum	Enteritidis	2003	Lab. Garibaldi	NI
23	NIMP	709 98 021 FF1 30-0	Enteritidis	NIMP	1998	Lab. Garibaldi	NI
24	NIMP	28-09006/99	Enteritidis	NIMP	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
25	NIMP	714-168-98 GR 19	Enteritidis	NIMP	1998	Lab. Garibaldi	NI
26	144	SG 104 G -03	Gallinarum	Gallinarum	2003	Lab. Garibaldi	NI
27	NIMP	006 OF-99 166	S.ssp	NIMP	1999	Lab. Garibaldi	NI
28	147	28 17-08-99	Typhimurium	Typhimurium	1999	Lab. Garibaldi	NI

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO

# BACTERIOTECA	# CARTÃO FTA	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	ANO	FONTE	GENES PESQUISADOS - FAGOTIPO
29	NIMP	38 17-08-99	Enteritidis	NIMP	1999	Lab. Garibaldi	NI
30	NIMP	744-006FDF9957F	Enteritidis	NIMP	1999	Lab. Garibaldi	NI
31	NIMP	367-99 23-02-99	Enteritidis	NIMP	1999	Lab. Garibaldi	NI
32	NIMP	346	Heidelberg	NIMP	1998	T.Ribeiro, 2007	NI
33	NIMP	1458 G-04	<i>S. enterica</i>	NIMP	2004	Lab. Garibaldi	NI
34	NIMP	617 G-06	<i>S. enterica</i>	NIMP	2006	Lab. Garibaldi	NI
35	6	731 G-06	Enteritidis	Enteritidis	2006	Lab. Garibaldi	NI
36	7	994 G- 06	Enteritidis	Enteritidis	2006	Lab. Garibaldi	NI
37	8	896 G-05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
38	9	263 G-05	Enteritidis	UN0045	2005	Lab. Garibaldi	NI
39	10	218 G-05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
40	11	621 G-05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
41	12	1708 G-05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
42	13	088 G-06	Enteritidis	UN0044	2006	Lab. Garibaldi	NI
43	14	1165 G-05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
44	15	281 G-06	Enteritidis	UN0030	2006	Lab. Garibaldi	NI
45	16	455G-05	Enteritidis	Enteritidis	2005	Lab. Garibaldi	NI
46	17	67 G-06	Enteritidis	UN0045	2006	Lab. Garibaldi	NI
47	55	216 G-05	Heidelberg	Heidelberg	2005	Lab. Garibaldi	NI
48	56	1496 G-05	Heidelberg	Heidelberg	2005	Lab. Garibaldi	NI
49	57	1012 G-05	Heidelberg	Heidelberg	2005	Lab. Garibaldi	NI
50	58	1012 G-05	Heidelberg	Heidelberg	2005	Lab. Garibaldi	NI
51	59	901 G-05	Heidelberg	Heidelberg	2005	Lab. Garibaldi	NI
52	139	1599 G-05	Gallinarum	UN0033	2005	Lab. Garibaldi	NI
53	140	1993 G-05	Gallinarum	Senftenberg	2005	Lab. Garibaldi	NI
54	NIMP	547-665 23-07-97	Enteritidis	NIMP	1997	Lab. Garibaldi	NI
55	141	1805 G-05	Gallinarum	UN0040	2005	Lab. Garibaldi	NI
56	146	251-00	Typhimurium	Heidelberg	2000	Lab. Garibaldi	NI

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO

# BACTER IOTECA	# CARTÃO FTA	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	ANO	FONTE	GENES PESQUISADOS - FAGOTIPO
57	NIMP	946	Typhimurium	NIMP	NI	Lab. Garibaldi	NI
58	18	2002/014/09	Enteritidis	Heidelberg	2002	T.Ribeiro, 2007	NI
59	60	2	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	NI
60	NIMP	3619-6	Heidelberg	NIMP	NI	T.Ribeiro, 2007	NI
61	133	1	Agona	Agona	2010	T. Perdoncini, 2011	NI
62	134	2	Agona	Agona	2010	T. Perdoncini, 2011	NI
63	131	5	Typhimurium	Typhimurium	2010	T. Perdoncini, 2011	NI
64	148	991	Typhimurium	Typhimurium	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
65	61	C,4-1	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
66	62	C,09-5	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
67	63	C,11-11	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
68	64	C,13-10	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
69	65	C,17-4	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
70	66	C,22-12	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
71	67	C,33-3	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
72	68	C,35-14	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
73	69	C,36-6	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
74	70	C,39-2	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
75	71	C,43-9	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
76	72	C,47-8	Heidelberg	Heidelberg	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
77	73	SH02-2006-16	Heidelberg	Heidelberg	1995	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
78	74	SH05-2006-19	Heidelberg	Heidelberg	1995	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
79	75	C,21-7	Heidelberg	Enteritidis	2003	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
80	76	149-2004-25	Heidelberg	Heidelberg	2004	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
81	77	SH2-MARITA-28	Heidelberg	Heidelberg	2005	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
82	78	148 - 2004-26	Heidelberg	Heidelberg	2004	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
83	79	SH04-2006-18	Heidelberg	Heidelberg	1995	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
84	80	SH09-2006-23	Heidelberg	Heidelberg	1996	T.Borsoi, 2009	<i>invA, lpfA</i>

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO

#	#	IDENTIFICAÇÃO	SOROTIPO	SOROTIPO	ANO	FONTE	GENES PESQUISADOS - FAGOTIPO
BACTERIOTECA	CARTÃO FTA	ANTIGA	REPORTADO CDPA	ISR			
85	81	SH10-2006-24	Heidelberg	Heidelberg	1995	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
86	82	SH06-2006-20	Heidelberg	Heidelberg	1995	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
87	83	072-00-23-02-00	Heidelberg	UN0039	2000	T.Borsoi, 2009	NI
87	83	072-00-23-02-00	Heidelberg	Enteritidis	2000	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
88	84	SH07-2006-21	Heidelberg	Heidelberg	1995	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
89	85	SH01-2006-15	Heidelberg	Heidelberg	1995	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
90	86	SH03-2006-17	Heidelberg	Heidelberg	1995	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
91	87	SH1 MARITA-27	Heidelberg	Heidelberg	2005	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
92	NIMP	754-18-06-99	Enteritidis	NIMP	1999	T.Borsoi, 2009	NI
93	NIMP	223- 36315	Enteritidis	NIMP	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
94	NIMP	757	Enteritidis	NIMP	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
95	NIMP	702 - 500 -97	Enteritidis	NIMP	1997	T.Ribeiro, 2007	NI
96	NIMP	190	Enteritidis	NIMP	1999	T.Ribeiro, 2007	<i>invA, agfA, lpfA</i>
97	149	950	Typhimurium	Heidelberg	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
98	NIMP	753 - 36329	Enteritidis	NIMP	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
99	NIMP	320 - 36319	Enteritidis	NIMP	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
100	88	SH08-2006-22	Heidelberg	Heidelberg	1995	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
101	150	777	Gallinarum	Gallinarum	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
102	NIMP	Padrão	Gallinarum	NIMP	NI	T.Ribeiro, 2007	NI
103	19	CDPA 100	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
104	89	1-IOC-2910-2006-38	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
105	137	2-IOC-4072-2006-39	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
106	90	3-IOC-2361-2006-40	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
107	91	4-IOC-963-2006-41	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, lpfA</i>
108	92	5-IOC-2340-2006-42	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
109	93	6-IOC-534-2006-43	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
110	94	7-IOC-965-2006-44	Heidelberg	UN0042	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
111	95	8-IOC-2362-2006-45	Heidelberg	UN0042	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO

# BACTER IOTECA	# CARTÃO FTA	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	ANO	FONTE	GENES PESQUISADOS - FAGOTIPO
112	96	9-IOC-4078-2006-46	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
113	97	10-IOC-4065-2006-4	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
114	98	11-IOC-4073-2006-4	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
115	99	12-IOC-964-2006-49	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
116	100	13-IOC-967-2006-50	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
117	101	14-IOC-4054-2006-5	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
118	102	15-10C-1839-2006-5	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
119	103	16-IOC-382-2006-53	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
120	104	17-IOC-966-2006-54	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
121	105	18-IOC-1838-2006-5	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
122	106	19-IOC-968-2006-56	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
123	107	20-IOC-1832-2006-5	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
124	108	21-10C-969-2006-58	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
125	109	22-IOC-2372-2006-5	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
126	110	23-IOC-959-2006-60	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
127	111	24-IOC-1831-2006-6	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
128	112	25-IOC-962-2006-62	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
129	113	26-IOC-3819-2006-6	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
130	114	27-IOC-982-2006-64	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
131	115	28-IOC-2364-2006-6	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
132	116	29-IOC-961-2006-66	Heidelberg	Heidelberg	2006	T.Borsoi, 2009	<i>invA, agfA, lpfA</i>
133	NIMP	HE1-1	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
134	117	HE2-2	Hadar	Hadar	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
135	156	HE3-5	Hadar	S.Agona	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
136	NIMP	HE4-8	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 39
137	NIMP	HE5-10	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	UT
138	NIMP	HE6-12	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
139	NIMP	HE7-15	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO

# BACTER IOTECA	# CARTÃO FTA	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	ANO	T. Cesco, 2010	GENES PESQUISADOS - FAGOTIPO
140	NIMP	HE8-16	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 16
141	NIMP	HE9-17	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
142	NIMP	HE10-20	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
143	157	HE11-33	Hadar	S.Hadar	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
144	118	HE12-928	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
145	158	HE13-42	Hadar	S.Hadar	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
146	NIMP	HE14-45	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
147	119	HE15-323	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
148	120	HE16-338	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
149	121	HE17-340	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
150	122	HE18-356	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
151	123	HE19-368	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
152	NIMP	HE20-792	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
153	NIMP	HE21-799	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
154	NIMP	HE22-803	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
155	NIMP	HE23-807	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
156	NIMP	HE24-825	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
157	NIMP	HE25-829	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
158	NIMP	HE26-884	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
159	NIMP	HE27-889	Hadar	NIMP	1995	T. Cesco, 2010	PT 37
160	124	HE28-906	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 1
161	125	HE29-908	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
162	126	HE30-909	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 38
163	127	HE31-910	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
164	128	HE32-913	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
165	129	HE33-914	Hadar	Hadar	1996	T. Cesco, 2010	PT 37
166	NIMP	212-95 04-06-99	Enteritidis	NIMP	1999	T.Ribeiro, 2007	NI
167	NIMP	1CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO

# BACTER IOTECA	# CARTÃO FTA	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	ANO	FONTE	GENES PESQUISADOS - FAGOTIPO
168	NIMP	2CDPA-	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
169	NIMP	3CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
170	NIMP	7CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
171	NIMP	4CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	Não incluída T. final Borges, 2011 (contaminada)
172	NIMP	5CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
173	NIMP	6CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
174	NIMP	8CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
175	NIMP	9CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
176	NIMP	10CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
177	NIMP	11CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
178	NIMP	12CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH</i>
179	NIMP	13CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
180	NIMP	15CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
181	NIMP	14CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH</i>
182	NIMP	27CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
183	NIMP	17CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
184	NIMP	19CDPA	Enteritidis	NIMP	1996	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
185	NIMP	22CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
186	NIMP	23CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
187	NIMP	25CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
188	NIMP	26CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
189	NIMP	28CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH</i>
190	NIMP	31CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
191	NIMP	29CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
192	NIMP	37CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
193	NIMP	33CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
194	NIMP	34CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
195	NIMP	35CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO

#	#						
BACTERIOTECA	CARTÃO FTA	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	ANO	FONTE	GENES PESQUISADOS - FAGOTIPO
196	NIMP	36CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
197	NIMP	38CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
198	NIMP	39CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
199	NIMP	40CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH</i>
200	NIMP	45CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
201	NIMP	42CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
202	NIMP	46CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
203	NIMP	47CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sivH</i>
204	NIMP	48CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
205	NIMP	50CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
206	NIMP	51CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
207	20	56CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
208	NIMP	53CDPA	Enteritidis	NIMP	1999	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH</i>
209	21	54CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
210	22	55CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
211	23	57CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
212	24	58CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
213	25	64CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH</i>
214	26	59CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
215	27	61CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
216	28	63CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
217	29	65CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
218	30	66CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
219	31	74CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
220	32	69CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
221	33	70CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
222	34	73CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
223	35	75CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO

# BACTER IOTECA	# CARTÃO FTA	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	ANO	FONTE	GENES PESQUISADOS - FAGOTIPO
224	36	80CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
225	37	76CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
226	38	78CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
227	39	79CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH</i>
228	40	82CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
229	41	81CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2000	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
230	42	84CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
231	43	83CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
232	44	88CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
233	45	85CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
234	46	86CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
235	47	89CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
236	48	90CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
237	49	91CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
238	50	94CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
239	51	92CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
240	52	97CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
241	53	98CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
242	54	99CDPA	Enteritidis	Enteritidis	2001	T. Borges, 2011	<i>lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH, spvC</i>
243	NIMP	932 - 3709-15-9	Enteritidis	NIMP	1996	T. Ribeiro, 2007	NI
244	145	11/06/2003	Pullorum	Enteritidis	2002	Lab. Garibaldi	NI
245	130	337-96	Hadar	Heidelberg	1997	T. Ribeiro, 2007	NI
246	NIMP	711-98	Heidelberg	NIMP	1998	T. Ribeiro, 2007	NI
247	151	246-9-26-10-98	Gallinarum	Gallinarum	1998	T. Borsoi, 2009	NI
248	152	992	Typhimurium	Typhimurium	1996	CDPA	NI
249	153	990	Typhimurium	Typhimurium	1996	CDPA	NI
250	154	3	Agona	UN0043	2010	T. Perdoncini, 2011	NI
251	155	4	Agona	UN0038	2010	T. Perdoncini, 2011	NI

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

**CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA: GENES PESQUISADOS OU FAGOTIPO**

# BACTERIOTECA	# CARTÃO FTA	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	ANO	FONTE	GENES PESQUISADOS - FAGOTIPO
252	NIMP	SG PADRÃO	Gallinarum	NIMP		Lab. Garibaldi	NI
253	136	ATCC THYP	Typhimurium	Typhimurium	2006	T.Borsoi, 2009	NI
254	132	6	Gallinarum	Gallinarum	2010	T. Perdoncini, 2011	NI

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

Anexo 3: Formulário para registro de ingresso de novas cepas à coleção de Bactérias do CDPA - *Salmonella*

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA	
--	--	--

**FORMULÁRIO PARA REGISTRO DE INGRESSO DE NOVAS CEPAS À
COLEÇÃO DE BACTERIAS DO CDPA**

Parte 1: Informações científicas do microrganismo:

1. Nome científico	
2. Coleção de origem - fonte (indicar nome da pesquisa, autor, ano). <input type="checkbox"/> Tese <input type="checkbox"/> Dissertação <input type="checkbox"/> Outra pesquisa do CDPA <input type="checkbox"/> Pesquisa outras instituições	
3. Número o designação na coleção de origem	
4. Outros números o designações	
5. Localização geográfica do lugar de isolamento (cidade, município, região, etc.). Indicar estado do Brasil.	
6. Origem (material de isolamento: órgãos, suaves, carcaça, etc.)	
7. Data de coleta (dia/mês/ano)	
8. Isolado por (nome da pessoa ou instituição):	
9. Identificado por (nome da pessoa ou instituição):	
10. Métodos de identificação utilizados	
11. Dados adicionais (indicar qualquer informação que possa ser considerada importante).	
12. Método de preservação da coleção de origem: <input type="checkbox"/> Congelamento -20 °C <input type="checkbox"/> Congelamento -70-80 °C <input type="checkbox"/> Liofilização <input type="checkbox"/> Outro (qual?)	13. Método de preservação no CDPA <input type="checkbox"/> Congelamento -20 °C <input type="checkbox"/> Congelamento -70-80 °C <input type="checkbox"/> Liofilização <input type="checkbox"/> Outro (qual?)

Parte 2: Informações do depositante

1. Nome do depositante	
2. Instituição	
3. Dados de contato	Endereço:
	Telefone:
	e-mail:

Anexo 4: Localização das amostras nas criocaixas

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA BACTERIOTECA- SALMONELA - LOCALIZAÇÃO NAS CRIOCAIXAS

# BACTERIOTECA SALM	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	# CRIOCAIXA	# AMOSTRAS NA COLEÇÃO
1	678-138DGIS	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
2	798	S.Heidelberg	NIMP	1,2,3,4	4
3	SE 606 G - 05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
4	SE1139 G- 05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
5	604 G- 05	S.ssp	NIMP	1,2,3,4	4
6	SE 696 G- 05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
7	452 G- 05	S.ssp	NIMP	1,2,3,4	4
8	1465 G -04	S.ssp	NIMP	1,2,3,4	4
9	480 G- 05	S.ssp	NIMP	1,2,3,4	4
10	232G- 05	S.ssp	NIMP	1,2,3,4	4
11	SE 699 G -05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
12	919 360-02	S.Heidelberg	NIMP	1,2,3,4	4
13	1227 G-04	S.Pullorum	UN0041	1,2,3	3
14	SG 1109 G -07	S.Gallinarum	Gallinarum	1,2,3,4	4
15	724 G -99	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
16	SE 1040 G- 03	S.Enteritidis	UN0040	1,2,3,4	4
17	02/02/2000	S.ssp	NIMP	1,2,3,4	4
18	713 168-98-GR-18 A	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
19	946	S. Typhimurium	NIMP	1,2,3,4	4
20	697 - 337/97	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
21	1098 G 03	S.ssp	NIMP	1,2,3,4	4
22	SP 27-01-2003	S.Pullorum	Enteritidis	1,2,3	3
23	709 98 021 FF1 30-0	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
24	28-09006/99	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
25	714-168-98 GR 19	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
26	SG 104 G -03	S.Gallinarum	Gallinarum	1,2,3	3
27	006 OF-99 166	S.ssp	NIMP	1,2,3,4	4
28	28 17-08-99	S. Typhimurium	Typhimurium	1,2,3,4	4
29	38 17-08-99	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3	3
30	744-006FDF9957F	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
31	367-99 23-02-99	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
32	346	S.Heidelberg	NIMP	1,2,3,4	4
33	1458 G-04	S. Enterica	NIMP	1,2,3,4	4
34	617 G-06	S. Enterica	NIMP	1,2,3,4	4
35	731 G-06	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
36	994 G- 06	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
37	896 G-05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
38	263 G-05	S.Enteritidis	UN0045	1,2,3,4	4
39	218 G-05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
40	621 G-05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
41	1708 G-05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
42	088 G-06	S.Enteritidis	UN0044	1,2,3,4	4

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

**CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA - LOCALIZAÇÃO NAS CRIOCAIXAS**

# BACTERIOTECA SALM	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	# CRIOCAIXA	# AMOSTRAS NA COLEÇÃO
43	1165 G-05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
44	281 G-06	S.Enteritidis	UN0030	1,2,3,4	4
45	455G-05	S.Enteritidis	Enteritidis	1,2,3,4	4
46	67 G-06	S.Enteritidis	UN0045	1,2,3,4	4
47	216 G-05	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
48	1496 G-05	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
49	1012 G-05	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
50	1012 G-05	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
51	901 G-05	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
52	1599 G-05	S.Gallinarum	UN0033	1,2,3,4	4
53	1993 G-05	S.Gallinarum	Senftenberg	1,2,3,4	4
54	547-665 23-07-97	S.Enteritidis	NIMP	1,2,3,4	4
55	1805 G-05	S.Gallinarum	UN0040	1,2,3,4	4
56	251-00	S. Typhimurium	Heidelberg	1,2,3,4	4
57	946	S. Typhimurium	NIMP	1,2,3,4	4
58	2002/014/09	S.Enteritidis	Heidelberg	1,2,3,4	4
59	2	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
60	3619-6	S.Heidelberg	NIMP	1,2,3,4	4
61	1	S. Agona	Agona	1,2,3,4	4
62	2	S. Agona	Agona	1,2,3,4	4
63	5	S. Typhimurium	Typhimurium	1,2,3,4	4
64	991	S. Typhimurium	Typhimurium	1,2,3,4	4
65	C ₁ 4-1	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
66	C ₁ 09-5	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
67	C ₁ 11-11	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
68	C ₁ 13-10	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3,4	4
69	C ₁ 17-4	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3	3
70	C ₁ 22-12	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3	3
71	C ₁ 33-3	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3	3
72	C ₁ 35-14	S.Heidelberg	Heidelberg	1,2,3	3
73	C ₁ 36-6	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
74	C ₁ 39-2	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
75	C ₁ 43-9	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
76	C ₁ 47-8	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
77	SH02-2006-16	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
78	SH05-2006-19	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
79	C ₁ 21-7	S.Heidelberg	Enteritidis	5,6,7	3
80	149-2004-25	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
81	SH2-MARITA-28	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
82	148 - 2004-26	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
83	SH04-2006-18	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
84	SH09-2006-23	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3

Ni: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

**CENTRO DE DIAGNOSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIARIA
BACTERIOTECA- SALMONELA - LOCALIZAÇÃO NAS CRIOCAIXAS**

# BACTERIOTECA SALM	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	# CRIOCAIXA	# AMOSTRAS NA COLEÇÃO
85	SH10-2006-24	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
86	SH06-2006-20	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
87	072-00-23-02-00	S.Heidelberg	UN0039	5,6,7	3
87	072-00-23-02-00	S.Heidelberg	Enteritidis	5,6,7	3
88	SH07-2006-21	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
89	SH01-2006-15	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
90	SH03-2006-17	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
91	SH1 MARITA-27	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
92	754-18-06-99	S.Enteritidis	NIMP	5,6,7	3
93	223- 36315	S.Enteritidis	NIMP	5,6,7	3
94	757	S.Enteritidis	NIMP	5,6,7	3
95	702 - 500 -97	S.Enteritidis	NIMP	5,6,7	3
96	190	S.Enteritidis	NIMP	5,6,7	3
97	950	S. Typhimurium	Heidelberg	5,6,7	3
98	753 - 36329	S.Enteritidis	NIMP	5,6,7	3
99	320 - 36319	S.Enteritidis	NIMP	5,6,7	3
100	SH08-2006-22	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
101	777	S.Gallinarum	Gallinarum	5,6,7	3
102	Padrão	S.Gallinarum	NIMP	5,6,7	3
103	CDPA 100	S.Enteritidis	Enteritidis	5	1
104	1-IOC-2910-2006-38	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
105	2-IOC-4072-2006-39	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
106	3-IOC-2361-2006-40	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
107	4-IOC-963-2006-41	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
108	5-IOC-2340-2006-42	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
109	6-IOC-534-2006-43	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
110	7-IOC-965-2006-44	S.Heidelberg	UN0042	5,6,7	3
111	8-IOC-2362-2006-45	S.Heidelberg	UN0042	5,6,7	3
112	9-IOC-4078-2006-46	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
113	10-IOC-4065-2006-47	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
114	11-IOC-4073-2006-48	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
115	12-IOC-964-2006-49	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
116	13-IOC-967-2006-50	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
117	14-IOC-4054-2006-51	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
118	15-IOC-1839-2006-52	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
119	16-IOC-382-2006-53	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
120	17-IOC-966-2006-54	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
121	18-IOC-1838-2006-55	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
122	19-IOC-968-2006-56	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
123	20-IOC-1832-2006-57	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
124	21-IOC-969-2006-58	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6,7	3
125	22-IOC-2372-2006-59	S.Heidelberg	Heidelberg	5,6	2

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

**CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA - LOCALIZAÇÃO NAS CRIOCAIXAS**

# BACTERIOTECA SALM	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	# CRIOCAIXA	# AMOSTRAS NA COLEÇÃO
126	23-IOC-959-2006-60	S.Heidelberg	Heidelberg	0	0
127	24-IOC-1831-2006-6	S.Heidelberg	Heidelberg	0	0
128	25-IOC-962-2006-62	S.Heidelberg	Heidelberg	0	0
129	26-IOC-3819-2006-63	S.Heidelberg	Heidelberg	0	0
130	27-IOC-982-2006-64	S.Heidelberg	Heidelberg	0	0
131	28-IOC-2364-2006-64	S.Heidelberg	Heidelberg	0	0
132	29-IOC-961-2006-66	S.Heidelberg	Heidelberg	0	0
133	HE1-1	S.Hadar	NIMP	5,6,7	3
134	HE2-2	S.Hadar	Hadar	5,6,7	3
135	HE3-5	S.Hadar	S.Agona	5,6,7	3
136	HE4-8	S.Hadar	NIMP	5,6,7	3
137	HE5-10	S.Hadar	NIMP	5,6,7	3
138	HE6-12	S.Hadar	NIMP	5,6,7	3
139	HE7-15	S.Hadar	NIMP	5,6,7	3
140	HE8-16	S.Hadar	NIMP	5,6,7	3
141	HE9-17	S.Hadar	NIMP	5,6,7	3
142	HE10-20	S.Hadar	NIMP	5,6,7	3
143	HE11-33	S.Hadar	S.Hadar	5,6,7	3
144	HE12-928	S.Hadar	Hadar	5	1
145	HE13-42	S.Hadar	S.Hadar	8,9	2
146	HE14-45	S.Hadar	NIMP	8,9	2
147	HE15-323	S.Hadar	Hadar	8,9	2
148	HE16-338	S.Hadar	Hadar	8,9	2
149	HE17-340	S.Hadar	Hadar	8,9	2
150	HE18-356	S.Hadar	Hadar	8,9	2
151	HE19-368	S.Hadar	Hadar	8,9	2
152	HE20-792	S.Hadar	NIMP	8,9	2
153	HE21-799	S.Hadar	NIMP	8,9	2
154	HE22-803	S.Hadar	NIMP	8,9	2
155	HE23-807	S.Hadar	NIMP	8,9	2
156	HE24-825	S.Hadar	NIMP	8,9	2
157	HE25-829	S.Hadar	NIMP	8,9	2
158	HE26-884	S.Hadar	NIMP	8,9	2
159	HE27-889	S.Hadar	NIMP	8,9	2
160	HE28-906	S.Hadar	Hadar	8,9	2
161	HE29-908	S.Hadar	Hadar	8,9	2
162	HE30-909	S.Hadar	Hadar	8,9	2
163	HE31-910	S.Hadar	Hadar	8,9	2
164	HE32-913	S.Hadar	Hadar	8,9	2
165	HE33-914	S.Hadar	Hadar	8,9	2
166	212-95 04-06-99	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
167	1CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2

Ni: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

**CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA - LOCALIZAÇÃO NAS CRIOCAIXAS**

# BACTERIOTECA SALM	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	# CRIOCAIXA	# AMOSTRAS NA COLEÇÃO
168	2CDPA-	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
169	3CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
170	7CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
171	4CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
172	5CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
173	6CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
174	8CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
175	9CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
176	10CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
177	11CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
178	12CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
179	13CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
180	15CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
181	14CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
182	27CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8	1
183	17CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
184	19CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
185	22CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
186	23CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
187	25CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
188	26CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
189	28CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
190	31CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
191	29CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
192	37CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
193	33CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
194	34CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
195	35CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
196	36CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
197	38CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
198	39CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
199	40CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
200	45CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
201	42CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
202	46CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
203	47CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
204	48CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
205	50CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
206	51CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
207	56CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	8,9	2
208	53CDPA	S.Enteritidis	NIMP	8,9	2
209	54CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	8,9	2

Ni: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

**CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA - LOCALIZAÇÃO NAS CRIOCAIXAS**

# BACTERIOTECA SALM	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	# CRIOCAIXA	# AMOSTRAS NA COLEÇÃO
210	55CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	8,9	2
211	57CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	8,9	2
212	58CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	8,9	2
213	64CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	8,9	2
214	59CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	8,9	2
215	61CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	8,9	2
216	63CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	8,9	2
217	65CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
218	66CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
219	74CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
220	69CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
221	70CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
222	73CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
223	75CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
224	80CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
225	76CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
226	78CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
227	79CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
228	82CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
229	81CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
230	84CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
231	83CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
232	88CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
233	85CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
234	86CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
235	89CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
236	90CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
237	91CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
238	94CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
239	92CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
240	97CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
241	98CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
242	99CDPA	S.Enteritidis	Enteritidis	10,11	2
243	932 - 3709-15-9	S.Enteritidis	NIMP	10,11	2
244	11/06/2003	S.Pullorum	Enteritidis	10,11	2
245	337-96	S.Hadar	Heidelberg	10,11	2
246	711-98	S.Heidelberg	NI	10,11	2
247	246-9-26-10-98	S.Gallinarum	Gallinarum	10,11	2
248	992	S. Typhimurium	Typhimurium	10,11	2
249	990	S. Typhimurium	Typhimurium	10,11	2
250	3	S.Agona	UN0043	10,11	2
251	4	S.Agona	UN0038	10,11	2

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA EM PATOLOGIA AVIÁRIA
BACTERIOTECA- SALMONELA - LOCALIZAÇÃO NAS CRIOCAIXAS

# BACTERIOTECA SALM	IDENTIFICAÇÃO ANTIGA	SOROTIPO REPORTADO CDPA	SOROTIPO ISR	# CRIOCAIXA	# AMOSTRAS NA COLEÇÃO
252	SG PADRÃO	S.Gallinarum	NI	10,11	2
253	ATCC THYP	S. Typhimurium	Typhimurium	10,11	2
254	6	S.Gallinarum	Gallinarum	10	1

NI: não informado

NIMP: não incluída na tese de M. Pulido

MARTHA PULIDO-LANDINEZ 2012

APENDICE B:

2012 AAAP/AVMA Annual Meeting - San Diego – California – USA ORAL Section

Use of Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) for serotyping Salmonella obtained from poultry and their environment

Martha Pulido-Landinez Roxana Sanchez-Ingunza Jean Guard Vladimir Pinheiro do Nascimento

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

BACKGROUND: The *dkgB*-linked ribosomal region of *Salmonella enterica* flanking a 5S gene shows genetic heterogeneity that distinguishes closely related serovars such as Enteritidis, Dublin, Gallinarum and Pullorum (Morales et al, 2006). We wanted to know how sequence-based ISR compared to the traditional Kauffman-White (KW) scheme for characterizing serotype of 155 isolates collected from poultry and their environment in the south of Brazil.

APPROACH: To conduct *Intergenic Sequence Ribotyping (ISR)*, the region neighboring the gene *dkgB* was sequenced from the end of the 23S gene to the start of the tRNA *aspU*. Fast PCR (Veriti) and F/R primers were used to generate product for sequencing, which ranged in size from approximately 250 to 550bp. Isolates cost approximately \$12 per sample to process.

RESULTS: Of the 155 isolates processed, 11 (7.1%) may have been mixed, because KW and ISR results were different. Of 144 isolates, 13 (9.0%) had unique ISR sequences that were not reported in databases for reference strains. Of the remaining 131 cultures, serotypes that were identified similarly by both methods were Enteritidis, Heidelberg, Hadar, Typhimurium, Gallinarum and Agona.

SUMMARY: ISR is a sensitive molecular method that can be used to identify serotypes of *Salmonella enterica* that are circulating in the environment of poultry. ISR uses both forward and reverse sequencing reactions, which facilitates detection of mixed serotypes. ISR may be a more stringent method than KW for classification of serotype, thus it is not unexpected that new genetic variants were found that are not yet in the reference databases.

APENDICE C:

**INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM
Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia**

January 28 - 29, 2013

Reference Number: 0225-000064

Presentation Title: Characterization of Salmonella isolates from commercial layers of Colombia using an Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) method.

Presentation Type: Oral

Presenter Status: Graduate Student IN Competition

Martha Pulido-Landínez*^{1,3}, Roxana Sánchez-Ingunza², Jean Guard² & Vladimir Pinheiro do Nascimento³

1. Laboratory of Avian Pathology, College of Veterinary Medicine, National University of Colombia, Bogotá – Colombia
2. ARS, USDA, Athens, GA, USA.
3. Avian Diagnostic and Research Center, College of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Abstract

A severe outbreak of salmonellosis in commercial brown table egg layers occurred in Colombia in 2006. Affected flocks had severely depressed birds with moderate to severe diarrhea, severe drops in egg production and increased mortality. A preliminary diagnosis by the Laboratory of Avian Pathology of the National University of Colombia reported the isolation of *Salmonella* spp, group D (motile and non-motile bacteria). Between the years 2008 and 2012, 140 samples from commercial poultry farms were collected in order to assay for *Salmonella*. Thirty five *Salmonella* spp. (25%) were isolated from commercial layers farms. Bacteria were isolated mainly from samples of liver and spleen (71.42%), pools of organs (liver, spleen and ovarian follicles (25.71%) and a lower proportion (2.85%) from drag swabs. Serotype was assigned using Intergenic Sequence Ribotyping (ISR). Sixteen *Salmonella* Enteritidis (SE), thirteen *Salmonella* Gallinarum (SG), and seven unique strains were found. Five unique strains were designated as UN0038, and the other two were designated as UN0052 and UN0054. DNA hybridization microarray assigned serovars Isangi, Branderup and Yoruba to the unique ISR sequences, respectively. This is the first report on the characterization of different serotypes of *Salmonella* present in commercial layer farms in Colombia. The discovery that SE and SG could be isolated in the same time period, in similar commercial brown layer hens, and in different regions indicates it is important to investigate the dynamics of infection associated with the co-existence of zoonotic serotypes, such as SE, and species specific serotypes, such as SG, circulating within the same ecological niche. Programs that aim to monitor and control infectious disease affecting people and the foods they consume will benefit from this information.

APENDICE D:

**2013 AAAP/AVMA Annual Meeting – Chicago – USA
ORAL Section**

**USE OF INTERGENIC SEQUENCE RIBOTYPING (ISR) FOR SEROTYPING
Salmonella OBTAINED FROM COMMERCIAL BIRDS AND POULTRY
ENVIRONMENT IN MISSISSIPPI AND DETERMINATION OF THEIR
ANTIBIOTIC RESISTANCE PATTERNS.**

Martha Pulido-Landínez, Paul Washington, Jay Kay Thornton, Roxana Sánchez-
Ingunza, Alejandro Banda, Jean Guard, Vladimir P. Nascimento, Danny L. Magee and
Michael Mael

The PCR method called Intergenic Sequence Ribotyping (ISR) uses sequence data from the ribosomal region neighboring the gene *dkgB* from the end of the 23S rRNA to the start of tRNA *aspU* to assign serotype to *Salmonella enterica*. The purpose of this research was to compare the results obtained by ISR with those obtained with the traditional Kauffman-White-Le Minor (KWL) scheme (Performed by NVSL, Ames, IA) for the characterization and serotyping of *Salmonella* isolates from commercial birds and their environment included in the bacterial collection of the Poultry Research and Diagnostic Lab in Mississippi. Antimicrobial resistance of *Salmonella* from poultry was also evaluated, because resistance is a serious public health issue. In this study the Antibiotic Resistance Patterns (ARP) of selected *S. enterica* isolates (Enteritidis, Kentucky, Typhimurium, Montevideo, Mbandaka, 4,5,12 i:–, Bredeney and Saintpaul) were determined by Minimum Inhibitory Concentration (Sensititre Microbiologic Systems).ISR assigned serotype to 50 *Salmonella enterica* isolates and results were in agreement with KWL in more than 89% of the cases. Mixtures of serotypes were also identified. The antibiotic susceptibility test showed differences between *Salmonella* serotypes and within isolates of the same serotype. Results may be updated to include additional data prior to presentation.