

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA DE PROGRAMAS VACINAIS CONTRA O TIFO
AVIÁRIO EM POEDEIRAS COMERCIAIS (*Gallus gallus*)
UTILIZANDO A ESTIRPE ATENUADA *Salmonella*
GALLINARUM *cobS⁻cblA⁻***

Fábio Tavares Zancan

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

- 2013 -

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA DE PROGRAMAS VACINAIS CONTRA O TIFO
AVIÁRIO EM POEDEIRAS COMERCIAIS (*Gallus gallus*)
UTILIZANDO A ESTIRPE ATENUADA *Salmonella*
GALLINARUM *cobS⁻cbiA⁻***

Fábio Tavares Zancan

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Co-orientador: Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

– 2013 –

Zancan, Fábio Tavares.
Z27e Eficácia de programas vacinais contra o tifo aviário em poedeiras comerciais (*Gallus gallus*) utilizando a estirpe atenuada *Salmonella Gallinarum cobS⁻cbiA⁻* / Fábio Tavares Zancan. – – Jaboticabal, 2013
xix, 56 p.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Angelo Berchieri Júnior

Banca examinadora: Nilce Maria Soares, Ricardo de Albuquerque, Oliveira Caetano de Freitas Neto, Silvana Martinez Baraldi Artoni

Bibliografia

1. Galinhas. 2. Tifo aviário. 3. *Salmonella* Gallinarum. 4. Vacina.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.981.49:636.5



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: EFICÁCIA DE PROGRAMAS VACINAIS CONTRA O TIPO AVIÁRIO EM POEDEIRAS COMERCIAIS (*Gallus gallus*) UTILIZANDO A ESTIRPE ATENUADA *Salmonella GALLINARUM cobs⁻cbia⁻*


AUTOR: FÁBIO TAVARES ZANCAN

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANGELO BERCHIERI JUNIOR

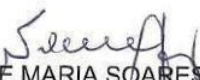
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO

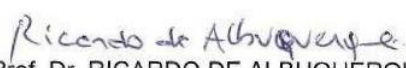
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANGELO BERCHIERI JUNIOR
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO
Pós-Doutorando / Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. SILVANA MARTINEZ BARALDI ARTONI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. NILCE MARIA SOARES
Instituto Biológico / Bastos/SP


Prof. Dr. RICARDO DE ALBUQUERQUE
Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Data da realização: 13 de dezembro de 2013.



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 008971/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação da eficácia de programas vacinais com uma estirpe viva de *Salmonella Enterica* sorotipo *Gallinarum* – em aves de postura comercial desafiadas experimentalmente com uma estirpe de *Salmonella Enterica* sorotipo *Gallinarum***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011.

Jaboticabal, 13 de Junho de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

	Comissão Interna de Biossegurança	
	Ofício CIBio 013/13	
	Ref.: Certificado de Aprovação de Projeto de Pesquisa	

CERTIFICADO

Certificamos, a quem possa interessar, que o trabalho de pesquisa intitulado “Avaliação da eficácia de programas vacinais com uma estirpe viva de *Salmonella enterica* sorotipo *Gallinarum* – em aves de postura comercial desafiadas experimentalmente com uma estirpe de *Salmonella Enterica* sorotipo *Gallinarum*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior, foi aprovado pela CIBio da FCAV-UNESP em reunião de 10/05/2011 e pela CTNBio em reunião de 11/08/2011 através do Extrato de parecer 2982/2011 (em anexo), publicado no DOU de 15/11/2011, Seção 1, p.74.

Jaboticabal, 12 de novembro de 2013.


Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro
- Presidente da CIBio -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FÁBIO TAVARES ZANCAN – Nascido em 06 de dezembro de 1959, natural de Campinas, Estado de São Paulo, graduado em Medicina Veterinária em dezembro do ano de 1985, pela Universidade Estadual de Londrina – UEL. Durante a graduação fez vários estágios no Laboratório de Microbiologia da UEL nos anos de 1982 e 1983, e também no Laboratório JF Laboratório de Patologia Animal de 1981 a 1983. Trabalhou na Empresa COAVI Comercial Avícola Viracopos LTDA como Veterinário na área de Produção de Matrizes e Incubatório de 1986 a Junho de 1996. Fez Vários cursos dentro da área da Avicultura entre 1983 a 2013. Fez curso de especialização na USP de São Paulo 1987 a 1988 na área de Patologia Aviária. Ingressou no mestrado em Agosto de 1996, na FCAV/UNESP/ Jaboticabal no programa de Medicina Veterinária na área da Medicina Veterinária Preventiva. Trabalhou na Empresa Luis Basetto e Cia LTDA de Agosto de 1999 a Junho de 2000, e trabalhou como professor na PUC/MG Campus Poços de Caldas de 2001 a 2010 onde ministrou aulas e trabalhos em Avicultura e Ornitopatologia.

**EFICÁCIA DE PROGRAMAS VACINAIS CONTRA O TIFO AVIÁRIO EM
POEDEIRAS COMERCIAIS (*Gallus gallus*) UTILIZANDO A ESTIRPE ATENUADA
Salmonella GALLINARUM *cobS⁻cbiA⁻***

RESUMO - *Salmonella* constitui-se em um gênero de bactérias amplamente distribuídas na natureza que podem infectar seres humanos, aves, peixes, répteis e mamíferos, e causam doenças em animais e seres humanos. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) é o agente etiológico do tifo aviário (TA). Este biovar é hospedeiro-específico de aves e se diferencia de outros sorovares por ser imóvel, causando uma doença septicêmica aguda, com alta taxa de morbidade e mortalidade, que afeta animais adultos, mas é muito patogênico para aves de qualquer idade e também um motivo de preocupação para a avicultura industrial, causando mortalidade que pode chegar a 80%. Programas de monitoramento baseado em testes sorológicos e bacteriológicos para controlar a disseminação desta bactéria e medidas de biossegurança são importantes, para o controle do tifo aviário. A vacinação é uma importante medida que pode ser aplicada como parte de um programa de biossegurança. Neste trabalho, as aves para postura comercial dos grupos A, B e C foram vacinadas com duas doses da estirpe atenuada de *Salmonella* Gallinarum *cobS⁻cbiA⁻* (SG*cobS⁻cbiA⁻*) e desafiadas na 16^a semana de vida com uma estirpe patogênica de SG (SG287/91). As aves dos grupos E e F foram vacinadas com três doses da estirpe SG*cobS⁻cbiA⁻* e desafiadas na 20^a semana de vida com a estirpe patogênica SG287/91. A mortalidade das aves vacinadas e de aves não-vacinadas foi observada após o desafio. Notou-se redução significativa nas taxas de mortalidade em todos os grupos de aves vacinadas com duas ou três doses da vacina viva, em relação às aves não vacinadas. Foi demonstrado uma forte proteção vacinal contra o tifo aviário em um modelo experimental que pode ser aplicado em aves comerciais à campo, complementando estudos prévios com a estirpe vacinal SG*cobS⁻cbiA⁻*.

Palavras-chave: proteção, mortalidade, tifo aviário, *Salmonella* Gallinarum, vacinas.

EFFICACY OF VACCINE PROGRAMS AGAINST FOWL TYPHOID IN COMMERCIAL LAYERS HENS (*Gallus gallus*) USING THE ATTENUATED STRAIN *Salmonella* GALLINARUM *cobS⁻cbiA⁻*

ABSTRACT – *Salmonella* is a genus of bacteria widely distributed in nature that can infect poultry, humans, fishes, reptiles and mammals in general and often causes diseases in animals and humans. Fowl typhoid (FT) is the etiologic agent of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG). This non-motile biovar is host-specific and highly adapted to infect birds, causing an acute septicemic disease with high morbidity and mortality, which is very pathogenic to birds of any age, including adult birds and also a cause of concern for the poultry industry, causing mortality that can reach 80%. Monitoring program based on serological and bacteriological tests to prevent infection or to control the spread of the agent and biosecurity measures are important for the control of fowl typhoid. Vaccination is an important measure, which can be used as part of a global biosecurity. In the present work, commercial brown layer-hens in groups A, B, C and D were vaccinated twice with strain *Salmonella* Gallinarum $\Delta cobS\Delta cbiA$ (SG*cobS⁻cbiA⁻*) and challenged at 16th week of life with a pathogenic strain of SG (SG297/91). Layers in groups E, F and G were vaccinated with three doses of SG*cobS⁻cbiA⁻* and challenged at 20th week of life with a pathogenic strain SG287/91. The mortality rate was observed after challenge in all groups. It was observed the significant reduction of the mortality rate in all groups of vaccinated layer-hens with two and three doses of SG*cobS⁻cbiA⁻*, complementing previous studies.

Keywords: protection, mortality, fowl typhoid, *Salmonella* Gallinarum, vaccines.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Taxonomia do Gênero <i>Salmonella</i> spp.....	3
2.2. Importância econômica das salmoneloses aviárias	3
2.3. Tifo aviário.....	4
2.4. Epidemiologia do tifo aviário.....	6
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo Geral	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Ensaio <i>in vivo</i>	13
4.2. Estirpes bacterianas e vacinas	13
4.3. Preparo dos inóculos.....	13
4.4. Avaliação da proteção de aves vacinadas com SG Δ cobS Δ cbiA utilizando diferentes esquemas de vacinação para o controle do tifo aviário	14
4.4.1. Delineamento experimental.....	14
4.4.2. Experimento 01: Utilização de duas doses vacinais	15
4.4.3. Experimento 02: Utilização de três doses vacinais.....	17
4.6. Análise estatística	17
5. RESULTADOS	18
5.1. Experimento 1: Avaliação da eficácia de programas vacinais com a utilização de duas doses vacinais.....	18
5.2. Experimento 2. Avaliação da eficácia de programas vacinais com a utilização de três doses vacinais.....	20
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS	31

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Programas de vacinação utilizando duas e três doses vacinais para proteção contra o desafio por estirpe selvagem de SG287/91	15
Tabela 2. Mortalidade de aves de linhagem de postura de ovos de mesa, variedade vermelha, vacinadas com a estirpe $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ (Grupos A, B e C) e não vacinadas (Grupo D) e desafiadas experimentalmente com a estirpe SG287/91.	18
Tabela 3. Resultados da análise bacteriológica do plaqueamento de suabes de fígado/baço em número absoluto e porcentagem de isolamentos positivos da estirpe desafio SG287/91, em aves remanescentes dos grupos A, B, C e D.	19
Tabela 4. Mortalidade de aves de linhagem de postura de ovos de mesa, variedade vermelha, vacinadas com a estirpe $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ (Grupos E e F) e não vacinadas (Grupo G) e desafiadas experimentalmente com a estirpe SG287/91.	20
Tabela 5. Resultados da análise bacteriológica do suabes de fígado/baço em número absoluto e porcentagem de isolamentos positivos da estirpe desafio SG287/91, em aves remanescentes dos grupos E, F e G.	21
Tabela 6. Resultados da postura de ovos de aves vacinadas com a estirpe mutante $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ (Grupos E e F) e em aves não vacinadas (Grupo G).	22

LISTA DE ABREVIATURAS

CD4⁺ - Grupo de diferenciação 4

CD8⁺ - Grupo de diferenciação 8

DPI - Dias após a infecção

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IM - Intramuscular

LB - Agar Luria Bertani

LPS - Lipopolissacarídeo

MC – Ágar MacConkey

µg - micrograma

mL – mililitro

† - Mortalidade ou morte

Nal - ácido nalidíxico

Nov - novobiocina

PBS - Tampão fosfato salina

SE - *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis

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

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

STM - *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium

SC - Subcutâneo

SG9R - Vacina viva de *Salmonella* Gallinarum, estirpe 9R

SG287/91 - Estirpe selvagem de *Salmonella* Gallinarum 287/91

SG *cobS*⁻*cbiA*⁻ / SGΔ*cobS*Δ*cbiA* - *Salmonella* Gallinarum com deleção em parte dos genes *cobS* e *cbiA*

SN - Caldo Selenito Novobiocina

Subesp. – subespécie

UFC - Unidade Formadora de Colônia

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* compreende bactérias amplamente distribuídas na natureza, capazes de infectar seres humanos, aves, peixes, répteis e mamíferos. A infecção de aves, por esses micro-organismos pode levar ao desenvolvimento de um quadro clínico ou subclínico. Algumas aves convalescentes podem permanecer como portadoras e fontes de infecção para seres humanos. São micro-organismos capazes de sobreviver no ambiente e no organismo de aves por longos períodos, tornando difícil a erradicação em estabelecimentos avícolas.

As salmoneloses aviárias são divididas entre o paratifo, o tifo e a pulorose, de acordo com o sorotipo infectante e as manifestações clínicas desenvolvidas. Entre as salmoneloses, o tifo aviário, cujo agente etiológico é *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Gallinarum biovar Gallinarum (SG), é uma doença de grande importância econômica para a avicultura industrial. Este biovar é hospedeiro-específico, altamente adaptado às aves e se diferencia dos demais por ser imóvel (sem flagelo). Assim como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Gallinarum biovar Pullorum (SP), causa infecção sistêmica com alta mortalidade e grandes prejuízos. A infecção por SG causa uma doença aguda com septicemia e toxemia, que afeta as aves jovens e adultas, diminuindo a produtividade dos lotes e elevando a mortalidade. Dessa forma, o tifo aviário é uma doença que demanda constante vigilância pela indústria avícola, sendo necessária a realização de testes bacteriológicos e sorológicos para o monitoramento de infecções. Medidas de controle, tais como limpeza, higiene e desinfecção de instalações, cuidados com o descarte de animais mortos, desinfecção de veículos, controle de roedores, pássaros, moscas, outras espécies de aves e outros animais são as principais ações para a prevenção do tifo aviário. No entanto, as vacinas vivas têm sido adotadas com maior frequência para a prevenção desta doença e fazem parte dos programas de biossegurança implantado na indústria avícola moderna.

A utilização de vacinas para o controle de *Salmonella* spp. em aves, é adotada em diversos países onde a avicultura industrial está presente, incluindo o Brasil. Para a prevenção do tifo aviário, podem ser utilizadas vacinas vivas preparadas a partir de estirpes atenuadas e de baixa patogenicidade, como a vacina viva avaliada no presente trabalho. Além disso, a eliminação de lotes positivos e a

utilização de “vazio sanitário” são medidas importantes para o controle desta doença.

SGΔcobSΔcbiA foi preparada com uma estirpe que se tornou atenuada após a deleção dos genes metabólicos *cobS* e *cbiA*. Ensaios anteriores demonstraram que a estirpe *SGΔcobSΔcbiA* apresenta características favoráveis à sua utilização em programas vacinais contra a infecção de aves por SG. Tendo em vista que *SGΔcobSΔcbiA* pode ser identificada por meio de testes moleculares e demonstrou ter capacidade de imunizar e promover resposta imune protetora contra SG, a mesma pode ser utilizada como estirpe vacinal. Assim, o presente estudo avaliou a eficácia de programas vacinais que podem ser utilizados em condições de campo em granjas avícolas comerciais, para o controle do tifo aviário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia do Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* spp. faz parte da família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes gram-negativos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos e oxidase negativos. Este gênero consiste de duas espécies: *Salmonella enterica* e *S. bongori*. *Salmonella enterica* se divide em seis subespécies: *S. enterica* subesp. *enterica*, *S. enterica* subesp. *salamae*, *S. enterica* subesp. *arizonae*, *S. enterica* subesp. *diarizonae*, *S. enterica* subesp. *houtenae* e *S. enterica* subesp. *indica*. (QUINN et al., 2005; FORSHELL; WIERUP, 2006; WAN NORHANA et al., 2010).

A classificação dos sorotipos de *Salmonella* spp. é realizada seguindo o esquema de Kauffmann-White, baseado na composição de seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K) (BRENNER et al., 2000; TINDAL, et al., 2005). Existem mais de 2.610 sorotipos identificados, porém cerca de 90 sorotipos são isolados com maior frequência em infecções de seres humanos e animais (FREITAS NETO et al. 2010; GUIBOURDENCHE et al. 2010).

2.2. Importância econômica das salmoneloses aviárias

A avicultura industrial investe em equipamentos, tecnologias e inovação, para melhorar o manejo e a saúde das aves (PENHA, et al., 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). Neste contexto, a troca de informações entre os diversos elos da cadeia produtiva é fundamental para a criação e a manutenção de um programa de biossegurança dentro de criações comerciais. As salmoneloses estão entre as principais causas de prejuízo para o setor avícola e por isso devem ser constantemente monitoradas e controladas (SILVA: DUARTE, 2002; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Salmonella spp. são micro-organismos capazes de infectar diversas espécies animais e seres humanos. Os animais utilizados na produção de alimentos, principalmente aves, bovinos e suínos são as principais fontes de infecção para os seres humanos, principalmente em casos de infecções por *Salmonella enterica*

subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (SE) e *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorotipo Typhimurium (STM) (SHINOHARA et al., 2008; EFSA, 2011; EFSA, 2012). Na avicultura, as salmoneloses são responsáveis por perdas diretas e indiretas, além de ser uma grande preocupação em saúde pública, por ser uma das principais causas de diarreia de origem zoonótica (BUCHALA et al., 2006).

SG é altamente invasiva e não permanece no trato intestinal após a infecção. Devido à sua capacidade de sobreviver e se multiplicar dentro de macrófagos, esta bactéria infecta células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro, principalmente os macrófagos e dentro dessas células é transportada para os órgãos internos, provocando enfermidade sistêmica, com alta taxa de mortalidade em aves de qualquer idade (BARROW et al., 1994; FREITAS NETO et al., 2013).

O tifo aviário permanece como um grande problema em países com produção avícola intensiva e de larga escala, principalmente onde existe dificuldade na aplicação de práticas adequadas de manejo sanitário (LEE et al., 2003). No Brasil, o tifo aviário foi diagnosticado principalmente em granjas comerciais de aves de postura de ovos, mas também pode ocorrer em aves reprodutoras de linhagens de corte e de postura (BERCHIERI JÚNIOR, 2000; OIE, 2012). A indústria avícola brasileira possui um dos melhores índices de qualidade e de produção. No entanto, o clima tropical e o sistema de galpões abertos, favorecem a disseminação deste patógeno. De acordo com dados do Instituto Adolfo Lutz entre os anos de 1991 e 1995, foram identificadas 372 amostras de *Salmonella* procedentes de criações avícolas, das quais 21 eram de SP e 35 amostras eram de SG (TAVECHIO et al., 1996).

2.3. Tifo aviário

SG é um biovar hospedeiro-específico e causa uma grave infecção sistêmica nas aves, o tifo aviário (FREITAS et al., 2007; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). São raros os relatos de infecções por este biovar em seres humanos (CDC 2007). A enfermidade foi descrita na Inglaterra, no final do século XIX, acometendo 400 aves e provocando alta mortalidade (KLEIN, 1889). Por meio dos genes presentes na Ilha de Patogenicidade 1 e do Sistema de Secreção do Tipo Três (SSTT), SG liberam proteínas responsáveis pela invasão da barreira epitelial do

trato intestinal e consequente disseminação para órgãos internos (JONES et al., 2001). A infecção por SG leva ao desenvolvimento de um quadro severo com sintomatologia aparente. As aves tornam-se apáticas e enfraquecidas, as fezes possuem cor amarelo-esverdeadas e a multiplicação da bactéria nos órgãos internos causam esplenomegalia e hepatomegalia. As taxas de morbidade e mortalidade são altas, podendo acometer 80% das aves em lotes positivos (BERCHIERI JÚNIOR et al., 2000; SHIVAPRASAD, 2000; OLIVEIRA; BECHIERI JÚNIOR; FERNANDES, 2005). A redução na produção de ovos, fertilidade e eclodibilidade em matrizes também fazem parte dos prejuízos causados por esta doença (CHRISTENSEN et al., 1993; SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD; BARROW, 2008; EZEMA et al., 2009; MAMTA et al., 2010; JEON; NANDRE; LEE, 2013; KUMARI et al., 2013).

Alterações como orquite, epididimite, e epidídimo-orquite em reprodutores machos, foram atribuídas à infecção por SG. Este biovar foi isolado destes órgãos em galos aos 2 anos de vida e em aves com 45 dias de vida infectadas experimentalmente. Foram descritas lesões degenerativas nas células epiteliais dos túbulos seminíferos, bem como perturbações no processo de espermiogênese, diminuindo a taxa de produção de ovos férteis em incubatórios (KOKOSHAROV et al., 1984; SHIVAPRASAD, 2000; MONLEON; MARTIN; BARNES, 2008).

A doença foi observada em vários países da Europa, Ásia, América e África. Os Estados Unidos da América (EUA) são considerados livres de tifo aviário devido ao sucesso do plano nacional de prevenção e controle de enfermidades avícolas que inclui as salmoneloses. Fazem parte deste plano, medidas como a eliminação de aves infectadas, a realização de provas sorológicas, a pesquisa e a identificação do sorotipo de *Salmonella* spp. por meio de exames bacteriológicos junto com medidas de limpeza, desinfecção e higiene (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

O tifo aviário foi considerado uma doença de países “em desenvolvimento” por muito tempo, no entanto em 2012, novos surtos voltaram a ocorrer em países da Europa, como a Irlanda do Norte (WORLD POULTRY, 2012). No Brasil, os primeiros registros de tifo aviário ocorreram em 1919 em Minas Gerais. Casos desta doença foram frequentes durante as décadas de 80 e no início da década de 90 do século passado (HOFER et al., 1997; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009) e,

atualmente, surtos de tifo aviário estão sendo relatados em todo o território Brasileiro (OIE, 2012).

2.4. Epidemiologia do tifo aviário

Surtos de tifo aviário já foram descritos em diversos países da América do Sul. No Brasil, o controle desta doença em lotes de aves comerciais inclui a vacinação no programa de biossegurança. Os relatos mais frequentes referem-se a granjas de postura comercial e (OLIVEIRA; BECHIERI JÚNIOR; FERNANDES, 2005) de aves reprodutoras para corte e postura comercial, infecta também perus, codornas, gansos e faisões adultos (KINDE et al., 2004; BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006), provocando alta morbidade e mortalidade, queda na produção de ovos e na qualidade dos pintainhos recém nascidos em reprodutoras leves e pesadas (BERCHIERI JÚNIOR, et al., 2001).

As linhagens de aves leves são mais resistentes, à doença clínica enquanto as aves semipesadas e pesadas são mais suscetíveis à doença (FREITAS NETO et al., 2007). O tifo aviário é relatado em aves adultas com maior frequência, porém esta enfermidade pode acometer aves em qualquer idade. A alta mortalidade em lotes de aves jovens, causada por SG, pode se assemelhar aos quadros da pulorose causada por SP. Embora SG tenha sido isolada em outros animais, como roedores, galinhas d'Angola, faisões, pardais e papagaios, não há relato sobre o desenvolvimento da doença nesses animais ou de infecção em seres humanos (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JÚNIOR et al., 2001a; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A transmissão de SG ocorre primeiramente por via horizontal. No entanto, alguns pesquisadores consideram a possibilidade de transmissão pela via vertical (POMEROY; NAGARAJA, 1991). As infecções por SG não causam comprometimento intestinal como notado em quadros de infecção de *Salmonellas* paratíficas (WYANT et al., 1999).

O contato de aves sadias com aves doentes, carcaças de aves mortas por SG e o canibalismo estão entre os principais facilitadores de disseminação do agente

etiológico do tifo aviário em granjas (OLIVEIRA; BERCHIERI JÚNIOR; FERNANDES, 2005). Oliveira et al. (2005) demonstraram que a presença de aves mortas na gaiola por SG, em 48 horas após a morte, aumentaram significativamente as taxas de mortalidade de aves sadias que tiveram contato com as carcaças. Entretanto, nas gaiolas em que as carcaças foram retiradas rapidamente após a morte, a taxa de mortalidade foi significativamente menor.

Falhas no manejo sanitário, envolvendo a falta de limpeza, a presença de moscas, pássaros silvestres, urubus e roedores são fatores de risco importantes para a disseminação horizontal do agente do tifo aviário (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

2.5. Vacinas utilizadas no controle e profilaxia de salmoneloses aviárias

O controle de SG em criações avícolas é realizado com a adoção de um programa de biossegurança, no qual está incluído um programa vacinal contra estas infecções. A imunização é importante para a proteção das aves em qualquer fase do ciclo de produção (PENHA FILHO et al., 2010). Atualmente, estão disponíveis vacinas preparadas com estirpes vivas e inativadas (bacterinas) para controle de SG. As vacinas vivas são preparadas com estirpes atenuadas de SG, como SG9R, e a estirpe $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ utilizada neste trabalho. As vacinas inativadas, também conhecidas como bacterinas comerciais, são preparadas com células mortas inativadas ou subunidades imunogênicas da bactéria (BARROW, 2007).

As vacinas inativadas são utilizadas no Brasil desde 2002 em aves reprodutoras e aves de postura comercial para a produção de ovos de mesa visando o controle de SE (BRASIL, 2003). A vacinação é realizada com o objetivo de diminuir a presença desta bactéria em granjas, e conseqüentemente, diminuir o risco de contaminação de produtos alimentícios de origem avícola (DAVIES; BRESLIN, 2003). As bacterinas preparadas com antígenos de SG para prevenir o tifo aviário são pouco utilizadas no Brasil. Estas vacinas induzem uma elevada produção de anticorpos, mas a imunidade celular é pouco estimulada (TIMMS et al., 1994). A proteção conferida por vacinas inativadas é menor e a aplicação é realizada de

forma individual na musculatura peitoral da ave, acarretando em aumento do custo com mão-de-obra e equipamentos de vacinação. Além disso, os adjuvantes utilizados podem provocar forte reação inflamatória no local quando aplicados em condições inadequadas (CARDOSO; ROCHA, 2006). As vacinas vivas são melhores imunógenos, pois estas estirpes vacinais possuem muitos antígenos similares aos epítomos presentes em estirpes patogênicas. Além disso, este tipo de vacina é mais eficiente uma vez que induz o desenvolvimento da resposta imune celular (BARROW; WALLIS, 2000; FEBERWEE et al., 2001b). Contudo, antes da utilização de estirpes atenuadas de SG a campo, são necessários estudos para avaliar a possibilidade da reversão de virulência (DE BUCK et al., 2004).

O uso de vacinas para proteger as aves contra salmoneloses aviárias, contendo estirpes atenuadas de SG é mais interessante sob o ponto de vista de saúde pública. Este sorotipo não é patogênico para os seres humanos e sendo atenuado, provoca uma infecção sistêmica branda capaz de induzir resposta imune desejável (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009; ANDREATTI FILHO, R. F.; SAVANO E. N.; SESTI, L., 2010; PENHA FILHO et al., 2010; PAIVA et al., 2012; PENHA FILHO et al., 2012). É amplamente conhecido o fato de que a resposta imune mediada por células é mais eficaz para a proteção contra *Salmonella* spp., especialmente em infecções causadas por sorotipos hospedeiro-específicos e invasivos (BARROW, 2007). Smith (1956) isolou ao acaso uma estirpe de SG rugosa (SG9R), sem capacidade de provocar o tifo aviário devido à reduzida patogenicidade. Desde então sua utilização como estirpe vacinal tem sido estudada. Diversos trabalhos são favoráveis à sua utilização para o controle do tifo aviário (WILSON, 1956; GORDON; LUKE, 1959; HARBOURNE et al., 1963; SILVA et al., 1981; BOUZOUBAA et al., 1989; FEBERWEE et al., 2001b; LEE et al. 2005; WIGLEY et al. 2005). Em estudos de campo, para avaliar a possível disseminação da estirpe vacinal de lotes vacinados de lotes não vacinados, não foram relatados indicativos de excreção fecal da estirpe vacinal SG9R (FEBERWEE et al. 2001b). Lee et al. (2007) demonstraram que esta estirpe foi capaz de controlar a infecção sistêmica por SG reduzindo significativamente a morbidade e mortalidade entre as aves vacinadas. Wigley et al. (2005) observaram que a atenuação resultou na diminuição da persistência da bactéria no fígado e no baço das aves. Barrow et al. (1991),

verificaram que a administração oral de SG9R diminuiu a excreção fecal de uma estirpe de SE, utilizada para desafiar as aves. Segundo Bouzoubaa et al. (1989), esta estirpe vacinal protegeu aves contra o desafio experimental com uma estirpe selvagem de SG, enquanto que a mortalidade em aves não vacinadas foi de 60%. No entanto, os autores observaram que a estirpe vacinal SG9R provocou lesões necróticas focais no fígado em 55% das aves vacinadas.

A utilização de vacinas, com o objetivo de controlar *Salmonella* spp. em aves, tem sido adotada em diversos países onde há avicultura industrial, incluindo o Brasil. Avanços na área da genômica permitiram o desenvolvimento de estirpes de *Salmonella* spp. atenuadas e com potencial vacinal. Algumas com deleção única e outras com deleções duplas ou múltiplas no cromossomo. Os estudos realizados nos últimos anos estão sumarizados nas publicações de BARROW; WALLIS (2000) e MASTROENI et al. (2000). Segundo Barrow e Wallis (2000) as vacinas vivas são alternativas mais apropriadas, porque podem ser administradas oralmente e são mais efetivas em prevenir a infecção por *Salmonella* spp., por induzir forte resposta imune celular e humoral (sistêmica e local).

Vacinas vivas e inativadas contra SG já foram utilizadas em programas de controle do tifo aviário em alguns países (LEE et al., 2005). Segundo Nassar et al. (1994) a administração de vacina viva de SG no início da vida das aves comerciais, seguida de uma dose de bacterina comercial auxilia no controle de infecções por *Salmonella* spp. durante a criação. Outros experimentos também demonstraram que a combinação de vacinas vivas (incluindo a estirpe SG9R) com a vacina inativada em um mesmo programa vacinal pode aumentar a eficácia da resposta imune contra infecções por *Salmonella* spp. em galinhas poedeiras (SCHALLER, 1996).

Algumas vacinas vivas atenuadas disponíveis atualmente e em uso no Brasil e outros países, são capazes de proteger eficazmente contra o desafio por sorotipos que têm antígenos em comum, mas não conseguem inibir consistentemente a colonização intestinal por sorotipos flagelados, agentes do paratifo. Para garantir que uma vacina promova o efeito desejado, várias propriedades devem ser avaliadas, entre estas, a possibilidade de diferenciação entre a estirpe vacinal e estirpe patogênica. Como demonstrado em trabalhos anteriores, a estirpe $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ gera proteção eficaz contra o sorotipo

homólogo SE pode ser diferenciada por métodos de biologia molecular (PAIVA et al., 2009).

Uma característica que deve obrigatoriamente, estar presente em vacinas contra *Salmonella* spp. é a ausência de riscos de reversão à virulência. Essa característica é mais facilmente estabelecida em bacterinas comerciais, no entanto, estas vacinas em sua maioria estimulam apenas a resposta imune humoral, o que afeta a eficácia da vacinação (GAST et al., 1992). Outro inconveniente no uso de vacinas inativadas contra *Salmonella* spp. atualmente disponíveis no comércio é que elas podem estimular uma limitada proteção cruzada contra outros sorotipos antigenicamente relacionados, talvez porque a resposta humoral produzida seja altamente específica ao sorotipo SE. Bacterinas multivalentes, contendo uma mistura de antígenos de diferentes sorotipos, podem fornecer uma resposta de amplo espectro, porém a eficácia também é menor. Outras preocupações com o uso das bacterinas incluem o risco de reações vacinais exacerbadas no local de aplicação, comumente por injeção intramuscular, devido aos constituintes tóxicos da célula bacteriana, especialmente o LPS e adjuvantes de emulsão oleosa (CHARLES et al., 1994). Utilizando abordagens tecnológicas mais recentes para o desenvolvimento de vacinas que contêm antígenos precisamente definidos, algumas vacinas de subunidade, compostas por proteínas de *Salmonella* spp. administradas com adjuvantes, ofereceram proteção contra a infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos e perus (GAST, 2007). Da mesma forma, a imunização com fimbria purificada de *Salmonella* Enteritidis mostrou boa proteção contra invasão de órgãos reprodutores e a contaminação de ovos de galinhas poedeiras vacinadas (DE BUCK et al., 2005).

Estudos realizados por Penha Filho et al. (2009) demonstraram que a vacinação com uma vacina inativada em conjunto com uma vacina viva pode auxiliar na prevenção e controle de SE em galinhas para postura de ovos comerciais. A vacina SG9R tem sido amplamente utilizada (LEE et al, 2007), mas demonstrou virulência residual para aves jovens (LEE et al, 2005). Além disso, a estirpe SG9R persiste nos órgãos internos, principalmente no fígado e baço durante várias semanas (GORDON; LUKE, 1959; SMITH, 1969; SILVA et al, 1981; BARROW et al, 1991). Diversas vacinas contendo estirpes de *Salmonella* spp. atenuadas foram

produzidas com base em alterações genéticas. Nos últimos anos, o aprimoramento de técnicas de biologia molecular tem levado ao desenvolvimento de vacinas mais sofisticadas, sendo as de DNA recombinantes uma das mais promissoras (LIU et al., 2008; CERAGIOLI et al., 2009; DEGUCHI et al., 2009; CHAUDHARI, et al., 2012).

Paiva et al. (2009) produziram um mutante de SG com genes defectivos no operon *cob*. Esta estirpe, denominada $SG\Delta cobS\Delta cbiA$, possui falhas na biossíntese de vitamina B₁₂ devido à dupla mutação produzida, tornando-se atenuada e incapaz de provocar mortalidade em aves infectadas experimentalmente.

Penha Filho et al. (2010) demonstraram que $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ foi capaz de proteger aves contra o desafio por SG selvagem, caracterizando o seu potencial vacinal. Esta estirpe promoveu proteção cruzada contra SE, reduzindo a infecção em aves vacinadas com duas doses. Paiva et al. (2012) demonstraram que $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ não possui riscos de reversão da virulência após ser inoculada em poedeiras, caracterizando-a como candidata para vacina viva para utilização no campo com segurança para o controle do tifo aviário e de infecções por SE.

$SG\Delta cobS\Delta cbiA$ apresenta características que poderiam justificar seu emprego em programas vacinais contra a infecção de aves por SG, considerando-se que pode ser identificada por meio de testes moleculares, possui baixo risco de reversão à virulência e é capaz de proteger as aves contra o tifo aviário. Com o objetivo de explorar o potencial vacinal da estirpe $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ em condições de campo, o presente estudo foi realizado para avaliar cinco programas vacinais contra SG que poderão ser utilizados em granjas comerciais de postura, para o controle do tifo aviário.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliação da utilização de *SGΔcobSΔcbiA* como estirpe vacinal para prevenir a infecção de aves por SG, empregando-se cinco diferentes programas vacinais.

3.2. Objetivos específicos

Avaliação da mortalidade e morbidade em grupos de aves vacinadas com *SGΔcobSΔcbiA* e desafiadas com estirpe selvagem de SG.

Avaliação da eficácia de diferentes programas vacinais, aplicáveis às condições de campo em produções comerciais, utilizando-se duas ou três doses de *SGΔcobSΔcbiA*, administrada por diferentes vias ou em combinação com uma bacterina comercial contra SE para o controle da mortalidade pelo tifo aviário.

Avaliação da interferência de diferentes programas contra SG na postura de ovos por aves vacinadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Ensaio *in vivo*

Foram utilizadas 210 aves de linhagem comercial, variedade vermelha, para produção de ovos de mesa, susceptíveis ao tifo aviário (BERCHIERI et al., 2000; OLIVEIRA; BERCHIERI JÚNIOR; FERNANDES, 2005). As aves foram criadas, o primeiro de vida, em bateria com água e ração *ad libitum* desde. No momento da chegada foram colhidas amostras de sangue para testes sorológicos visando à detecção de anticorpos anti-*Salmonella* e suabes de fundo de caixa, conforme Zancan et al. (2000) para pesquisa de *Salmonella* spp. Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011, protocolo n. 008971/11.

4.2. Estirpes bacterianas e vacinas

Para o desafio, nos experimentos de avaliação da mortalidade, da infecção sistêmica e prevenção do tifo aviário foi utilizada uma estirpe selvagem de SG 287/91 resistente ao ácido nalidíxico (SG287/91) (THOMSON et al., 2008). Como vacina viva foi utilizada uma estirpe de SG, resistente ao ácido nalidíxico (Nal^r), com mutação dupla, contendo parte dos genes *cobS* e *cbiA* deletados de seu cromossomo (SG Δ *cobS* Δ *cbiA*) (PAIVA et al., 2009). A vacina inativada consistiu de uma bacterina comercial contra SE, aplicada conforme recomendações do fabricante (0,3mL/via IM). As bactérias são mantidas pela bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da FCAV-Unesp de Jaboticabal, SP.

4.3. Preparo dos inóculos

As culturas, para cada inóculo, foram preparadas a partir de suas respectivas estirpes (SG287/91 e SG Δ *cobS* Δ *cbiA*), que foram semeadas em caldo Luria-Bertani (LB) (Invitrogen 12780-052) e incubadas por 24 horas a 37°C, em agitação (100rpm).

Para estimativa da quantidade de células bacterianas nos inóculos, uma amostra de cada cultura foi diluída decimalmente em 0,9 mL solução salina, pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10. De cada diluição foi retirado 0,1 mL, que era despejado em placas contendo ágar verde brilhante (Oxoid CM0263) contendo novobiocina (1 µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VB Nal/Nov), que foram incubadas a 37°C/24h. O número de colônias por mL de caldo LB foi transformado em log₁₀ para apresentação dos resultados. As culturas continham aproximadamente 10⁸ UFC/mL.

4.4. Avaliação da proteção de aves vacinadas com SGΔcobSΔcbiA utilizando diferentes esquemas de vacinação para o controle do tifo aviário

Os experimentos foram iniciados após os testes realizados no momento da chegada das aves de um dia, que se apresentaram negativos para a pesquisa de *Salmonella* spp. e anticorpos anti-*Salmonella*, respectivamente.

4.4.1. Tratamento experimental

O experimento será realizado no setor de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV - Unesp, Jaboticabal-SP.

Foram utilizadas aves de variedade vermelha de linhagem comercial para postura de ovos de mesa divididas em grupos de 30 animais. Para isso foram realizados dois experimentos que se encontra na Tabela 1.

Tabela 1 – Programas de vacinação utilizando duas e três doses vacinais para proteção contra o desafio por estirpe selvagem de SG287/91

Grupos	Nº Aves	Idade das aves (semanas)			Desafio	
		4 sem	8 sem	12 sem		
Experimento 01	A	30	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/oral	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/oral	-	10 ⁸ UFC/mL 16 ^a sem.
	B	30	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/SC	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/oral	-	10 ⁸ UFC/mL 16 ^a sem.
	C	30	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/oral	bacterina comercial (IM)	-	10 ⁸ UFC/mL 16 ^a sem.
	D (controle)	30	-	-	-	10 ⁸ UFC/mL 16 ^a sem.
Experimento 02	E	30	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/oral	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/oral	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/oral	10 ⁸ UFC/mL 20 ^a sem.
	F	30	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/SC	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/oral	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> 10 ⁸ UFC/oral	10 ⁸ UFC/mL 20 ^a sem.
	G (controle)	30	-	-	-	10 ⁸ UFC/mL 20 ^a sem.

4.4.2. Experimento 01: Utilização de duas doses vacinais

Os inóculos da estirpe vacinal de SGΔ*cobS*Δ*cbiA* e da estirpe desafio de SG287/91 foram preparados conforme o procedimento descrito anteriormente no item 4.3.

Foram formados quatro grupos contendo 30 aves cada. As aves dos grupos A e B foram vacinadas com uma dose da estirpe vacinal SGΔ*cobS*Δ*cbiA* na 4^a semana de vida e outra dose na 8^a semana de vida, administradas pelas vias oral ou subcutânea (SC). As aves do grupo C foram vacinadas com vacina viva na 4^a semana de vida e com a bacterina comercial na 8^a semana de vida. A dose vacinal consistia de um mL de PBS contendo 10⁸ UFC de SGΔ*cobS*Δ*cbiA*, utilizando diferentes vias de inoculação de acordo com a descrição apresentada na Tabela 1. As aves do grupo D não receberam a vacina e foram mantidas como controle negativo. Todas as aves foram desafiadas na 16^a semana de vida com 1,0 mL de inóculo, contendo 10⁸ UFC da estirpe selvagem de SG287/91.

As aves foram examinadas durante 20 dias, registrando-se a mortalidade e os sinais clínicos. No 20º dia pós-infecção, as aves remanescentes foram eutanasiadas para a realização de exame bacteriológico de fígado, utilizando-se suabes estéreis de algodão. As amostras foram colocadas em tubos contendo 2 mL de caldo selenito novobiocina (SN) e incubadas a 37º/24h. Após o enriquecimento, as amostras foram semeadas em ágar VB Nal/Nov. A seguir, as placas foram incubadas a 37ºC durante 24 horas. Decorrido este período, procedeu-se à leitura das placas quanto à presença ou ausência da estirpe SG287/91.

4.4.3. Experimento 02: Utilização de três doses vacinais

Os inóculos da estirpe vacinal de *SG Δ cobS Δ cbiA* e da estirpe desafio de SG287/91 foram preparados conforme o procedimento descrito anteriormente no item 4.3.

Foram formados três grupos contendo 30 aves cada. As aves dos grupos E e F foram vacinadas com a primeira dose da estirpe vacinal *SG Δ cobS Δ cbiA* na 4ª semana de vida, a segunda dose na 8ª semana de vida e a última dose na 12ª semana de vida. A dose vacinal consistia de 2 mL de PBS contendo 10^8 UFC de *SG Δ cobS Δ cbiA*, esta dose é maior, e foi usada para aumentar o desafio das aves, utilizando diferentes vias de inoculação de acordo com a descrição no Tabela 1. As aves do grupo G não receberam a vacina e foram mantidas como controle negativo. Todas as aves foram desafiadas na 20ª semana de vida com 2,0 mL de inóculo, contendo 10^8 UFC da estirpe selvagem de SG287/91.

As aves foram examinadas durante 28 dias, registrando-se a mortalidade e os sinais clínicos apresentados. No 28º dia pós-desafio, as aves remanescentes foram eutanasiadas para a realização de exame bacteriológico de fígado, utilizando-se suabes estéreis de algodão. As amostras foram colocadas em tubos contendo 2 mL de caldo SN e incubadas a 37º/24h. Após o enriquecimento, as amostras foram semeadas em ágar VB Nal/Nov. A seguir, as placas foram incubadas a 37ºC durante 24 horas. Decorrido este período, procedeu-se à leitura das placas quanto à presença ou ausência de SG287/91.

4.6. Análise estatística

Os dados relativos à mortalidade foram analisados pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$) (GREENWOOD; NIKULIN, 1996).

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Avaliação da eficácia de programas vacinais com a utilização de duas doses vacinais

Na Tabela 2 estão apresentados os dados referentes à mortalidade das aves dos grupos A, B e C que receberam a estirpe vacinal mutante SG Δ cobS Δ cbiA. Estes resultados revelam que a estirpe vacinal SG Δ cobS Δ cbiA conferiu proteção contra a estirpe selvagem SG287/91, reduzindo a mortalidade entre as aves vacinadas. Durante os 20 dias de observação, a mortalidade entre as aves que receberam a vacina, atingiu 3,33% dos grupos A, B e C. No grupo controle, em que as aves não foram vacinadas, a estirpe selvagem de SG287/91 causou mortalidade em 33,33% das aves desafiadas. No 20º DPI, as aves remanescentes foram eutanasiadas, para a realização do exame bacteriológico de fígado e baço, e os resultados referentes à recuperação de SG 287/91 estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Mortalidade de aves de linhagem de postura de ovos de mesa, variedade vermelha, vacinadas com a estirpe SG Δ cobS Δ cbiA (Grupos A, B e C) e não vacinadas (Grupo D) e desafiadas experimentalmente com a estirpe selvagem de SG 287/91.

Grupos	Mortalidade em grupo de 30 aves, dias após a inoculação (DPI)											Total	%
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	20		
A	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	3,3a
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	3,3a
C	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	3,3a
D	-	1	1	1	-	4	1	1	1	-	-	10	33,3 b

Letras na mesma coluna diferentes em nível de significância de 5% ($P < 0,05$)

Legenda: G = grupo; (DPI) = dias pós-inoculação; % = porcentagem mortalidade.

As aves do Grupo A que foram vacinadas com duas doses de SG Δ cobS Δ cbiA, na 4^a semana e na 8^a semana por via oral, tiveram 48,28% de aves positivas após o desafio. As aves do Grupo B que foram vacinadas por via SC e por via oral demonstraram uma porcentagem de 68,87% de aves positivas. No Grupo C em que as aves foram vacinadas com SG Δ cobS Δ cbiA pela via oral e com a bacterina comercial via IM, foi notado a menor recuperação bacteriana se comparado aos grupos A, B e D (controle), com 34,48% das aves positivas para SG287/91. O Grupo D em que as aves foram apenas desafiadas, além da alta mortalidade, ao 20^o DPI, 40% (8/20) das aves remanescentes que eram positivas para a estirpe desafio, e também as aves deste grupo apresentaram apatia, desnutrição, diarreia amarelo-esverdeada, menor consumo de água e ração, e estes sinais estão compatíveis ao Tifo aviário.

Tabela 3. Resultados da análise bacteriológica do plaqueamento de suabes de fígado e baço em número absoluto e porcentagem de isolamentos positivos da estirpe desafio SG287/91, em aves remanescentes dos grupos A, B, C e D.

Plaqueamento	Grupos			
	A	B	C	D
Nº aves pos./ total	14/29	20/29	10/29	8/20
Aves positivas (%)	(48,28)a	(68,97)b	(34,48)c	(40,0)d

Letras na mesma coluna diferentes em nível de significância de 5% ($P < 0,05$)

Experimento 2. Avaliação da eficácia de programas vacinais com a utilização de três doses vacinais

Na Tabela 4 estão presentes os dados referentes à mortalidade de aves que foram vacinadas com uma estirpe mutante $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ dos grupos E e F e no grupo G (controle negativo) em que as aves foram apenas desafiadas. Todas as aves dos grupos E, F e G, foram desafiadas com o inóculo da estirpe SG287/91 na concentração contendo 10^8 UFC/mL. Neste experimento, a mortalidade das aves foi avaliada durante 28 DPI. Nos grupos de aves que receberam três doses de vacina viva, a mortalidade após o desafio foi de 20,0% no Grupo E e de 16,7% no Grupo F. No entanto, notou-se que no grupo E a mortalidade se iniciou ao 6º DPI e terminou no 12º DPI, no grupo F a mortalidade das aves desafiadas iniciou-se com 8 DPI e persistiu até 12º DPI. No grupo G (controle negativo), a mortalidade iniciou-se no 5º DPI e foi ocorreu até o 14º DPI atingindo 50% das aves desafiadas.

No 28º DPI, as aves remanescentes foram eutanasiadas. O exame bacteriológico foi realizado nestas aves por meio de suabes de fígado e baço para reisolar a estirpe desafio, SG287/91, caso estivesse presente nestes órgãos. Os resultados destes exames encontram-se na Tabela 5.

Tabela 4. Mortalidade de aves de linhagem de postura de ovos de mesa, variedade vermelha, vacinadas com a estirpe $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ (Grupos E e F) e não vacinadas (Grupo G) e desafiadas experimentalmente com a estirpe SG287/91.

Grupos	Mortalidade em grupo de 30 aves, dias após a inoculação (DPI)												Total	%
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	20	28		
E	-	2	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-	6	20,0a
F	-	-	-	1	1	1	1	1	-	-	-	-	5	16,7a
G	1	2	5	1	-	2	1	1	1	1	-	-	15	50,0b

Letras na mesma coluna diferentes em nível de significância de 5% ($P < 0,05$)

Legenda: DPI = dias pós-inoculação; % = porcentagem de mortalidade.

A Tabela 5 mostra os resultados dos plaqueamentos dos suabes de fígado e baço das aves remanescentes. O resultado do grupo F mostra um percentual de 64,0% de isolamento, superior ao reisolamento da estirpe desafio no grupo E (54,2%) e no grupo G (40,0%). A menor recuperação ocorreu no grupo G (aves não vacinadas), onde o número de aves remanescentes e de postura de ovos foi menor, devido à maior mortalidade.

Tabela 5. Resultados da análise bacteriológica do suabes de fígado/baço em número absoluto e porcentagem de isolamentos positivos da estirpe desafio SG287/91, em aves remanescentes dos grupos E, F e G.

Plaqueamento	Grupos		
	E	F	G
Nº aves pos./ total	13/24	16/25	6/15
% de aves positivas	(54,2%) ^a	(64,0%) ^c	(40,0%) ^b

Letras na mesma coluna diferentes em nível de significância de 5% ($P < 0,05$)

A Tabela 6 contém os resultados de postura de ovos, acompanhados durante todo o experimento. Em todos os grupos (E, F e G), as aves pararam de se alimentar ao 5º DPI, diminuindo a postura ao 6º DPI, mostrando uma recuperação da alimentação ao 12º DPI. As aves do grupo E demonstraram uma recuperação da postura ao 13º DPI, no grupo F a recuperação da postura foi notada no 16º DPI e no grupo G (controle negativo) a postura de ovos por aves remanescentes ocorreu apenas no 24º DPI, e também as aves deste grupo apresentaram apatia, desnutrição, diarreia amarelo-esverdeada, menor consumo de água e ração, e estes sinais estão compatíveis ao Tifo aviário.

Tabela 6. Resultados da postura de ovos de aves vacinadas com a estirpe mutante $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ (Grupos E e F) e em aves não vacinadas (Grupo G).

Postura	Grupos					
	E		F		G	
	nº ovos	†	nº ovos	†	nº ovos	†
Antes do desafio	13	0	8	0	6	0
Após o desafio	114	6	109	5	33	15
Total	127	6	117	5	39	15

Legenda: nº = números de ovos; dpi = dias pós-infecção, † = mortalidade.

6. DISCUSSÃO

SG é uma bactéria Gram-negativa, invasiva, anaeróbico facultativo que provoca uma enfermidade sistêmica em aves, o tifo aviário. Este biovar está fortemente associado ao sistema mononuclear fagocitário e o desencadeamento da doença depende da capacidade bacteriana de sobreviver e replicar-se dentro de macrófagos do fígado e do baço (BARROW et al., 1994; WIGLEY et al., 2002; CHADFIELD, et al., 2003). *Salmonella* spp. utiliza vários fatores de virulência para superar as condições adversas encontradas no ambiente, seja no interior de células infectadas após a invasão ou internalização da bactéria pelos macrófagos ou no espaço extracelular, como no lúmen intestinal (FIELDS et al., 1986; RICHTER-DAHLFORS et al., 1997; VAN IMMERSEEL et al., 2004).

Após a invasão das células fagocitárias da ave, SG causa doença severa, caracterizada por alta morbidade e mortalidade (SHIVAPRASAD, 2000). Este comportamento não foi observado com a estirpe mutante $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ que tornou-se atenuada e não causou a doença, além de persistir por menor tempo no organismo hospedeiro, sendo isolada do fígado de aves até 14 DPI (PENHA FILHO et al., 2010). Uma das hipóteses para tal comportamento se baseia no fato de que a deleção dos genes *cobS* e *cbiA* trouxe à estirpe mutante transtornos metabólicos que alteram o seu comportamento *in vivo*, com relação ao crescimento e à virulência no organismo hospedeiro. Wigley et al. (2005) observaram que após a inoculação por via oral de 10^8 UFC/mL da estirpe vacinal SG9R em aves de três semanas de idade, a mesma foi encontrada no fígado e no baço das aves por período reduzido, mas foi capaz de induzir as respostas imune celular e humoral e de proteger contra a infecção pela estirpe homóloga selvagem de SG. Shah et al. (2007) verificaram situação similar quando tornaram o gene *metC* inoperante em uma estirpe de SG, uma vez que a incapacidade da bactéria para sintetizar metionina interferiu no seu crescimento nos órgãos invadidos (fígado e baço), diminuindo de forma significativa a sua virulência. No entanto, a importância de cada gene metabólico e dos substratos encontrados no ambiente e nos tecidos infectados pode variar para os diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. A exemplo disso, em um trabalho desenvolvido por Björkman et al. (1996), uma estirpe de *Salmonella* Typhimurium

com alteração de genes envolvidos na biossíntese de cobalamina continuou expressando a mesma virulência.

Smith (1956) verificou que uma estirpe rugosa de SG (SG9R) havia perdido a capacidade de provocar o tifo aviário em aves e que poderia ser empregada como vacina. O estudo da atenuação de SG9R sugere que esta estirpe está ligada a diminuição do período de vida da bactéria no fígado e no baço das aves, e atenuações pontuais no genoma desta bactéria em relação à estirpe selvagem (WIGLEY et al., 2005; KANG et al. 2012). Embora por processos distintos, mas em virtude de comportamento semelhante, o uso da estirpe *SGΔcobSΔcbiA* como candidata a estirpe vacinal para o controle da infecção de aves por SG e SE vem sendo estudado por esse grupo de pesquisa há alguns anos (PAIVA et al., 2009; PENHA FILHO et al., 2010; PAIVA et al., 2012; PENHA FILHO et al., 2012).

Atualmente, as vacinas vivas contra *Salmonella* spp. são preparadas à partir de estirpes atenuadas do mesmo gênero ou outras bactérias e até mesmo vírus que expressam proteínas imunogênicas de *Salmonella* spp. Estas vacinas vivas tem melhor eficácia quando são capazes de estimular uma forte resposta imune celular. Embora algumas sejam capazes também de estimular a resposta imune humoral, a proteção conferida pelas imunoglobulinas contra os diversos sorotipos de *Salmonella* spp. é limitada (MASTROENI et al., 2000).

A vacinação com duas doses de *SGΔcobSΔcbiA*, tanto pela via oral como subcutânea, protegeu as aves contra o desafio com a estirpe selvagem de SG. No grupo C, em que as aves receberam vacinação mista, com uma dose de *SGΔcobSΔcbiA* e uma dose de bacterina comercial via IM a proteção foi a mesma notada nos grupos A e B, que receberam duas doses da vacina viva. Em grupos de 30 aves vacinadas, sobreviveram 29 aves, enquanto que no grupo não vacinado, restaram apenas 15 aves vivas após o desafio pela estirpe selvagem de SG, diferindo dos grupos vacinados ($P < 0,05$). Esses resultados demonstram que *SGΔcobSΔcbiA* é capaz de proteger as aves por meio da inoculação oral, subcutânea ou IM, protegendo-as e diminuindo a incidência de tifo aviário. Alguns resultados semelhantes foram relatados anteriormente com a utilização da estirpe SG9R. Segundo Bouzoubaa et al. (1989), uma estirpe selvagem de SG que causou a mortalidade em 60% de aves do grupo controle, não causou mortalidade no grupo

de aves vacinadas com SG9R, embora tenha provocado lesões necróticas focais no fígado em até 55% das aves, à semelhança de relato anterior por Silva et al. (1981). Em experimento descrito por Lee et al. (2005), após o desafio com uma estirpe patogênica de SG a mortalidade variou de 95 a 100% nos grupos controles, enquanto que nos grupos vacinados com SG9R essa variação foi de 0 a 5%. Assim como SG9R, a estirpe $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ demonstrou um bom desempenho e potencial vacinal contra SG, com algumas vantagens como a ausência de lesões severas em órgãos (GARCIA et al., 2013).

Levando em consideração a aplicação a campo deste projeto, foi realizado um segundo experimento para avaliar programas vacinais com três doses de vacina, utilizando diferentes rotas e, portanto, estudar a proteção e influências sobre a postura de ovos, em um período de vida mais avançado, onde as aves passam pelo início da produção de ovo e sofrem maiores riscos de infecção devido ao estresse fisiológico deste período. As aves do grupo E e F foram vacinadas com a estirpe viva atenuada $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ na 4^a, 8^a e 12^a semana de vida e desafiadas com a estirpe selvagem de SG na 20^a semana de vida, durante o período inicial da produção de ovos.

Neste experimento, algumas aves já haviam iniciado o período de postura antes da realização do desafio (20^a semana de vida) e por isso, foi possível avaliar a influência da vacinação e do desafio na produção de ovos, um dado de grande relevância para a utilização a campo desta estirpe vacinal. O número de ovos produzidos em cada grupo foi acompanhado durante o período do experimento e os resultados que estão na Tabela 5. No grupo G (sem vacinação), foi notado uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na produção de ovos, devido à maior morbidade e mortalidade neste grupo, após uma grave infecção. Assim, as aves que sobreviveram à infecção também tiveram grande redução na produção de ovos, devido à dificuldade de se recuperar da infecção e dessa forma o organismo das aves, naturalmente interrompe a produção de ovos e utiliza suas fontes de energia para a formação de uma resposta imune na tentativa de combater o patógeno. Além disso, a grave infecção sistêmica pode causar sérios danos aos tecidos infectados. Assim, mesmo aves recuperadas da infecção, sofrem lesões irreversíveis nos tecidos internos, como fígado, baço e órgãos reprodutores, incluindo o ovário, e

diminuem seu escore corporal, podendo tornar-se improdutivas e ser descartadas do lote remanescente. As aves que receberam a vacina apresentaram maior estabilidade durante o processo infeccioso, e a resposta imune e combate ao patógeno não influenciou na postura de ovos, de forma que nestes grupos, o número de ovos foi estatisticamente maior que o grupo não vacinado (Grupo D e F) ($P < 0,05$).

Muitos trabalhos testando a vacinação com estirpes atenuadas de SG relatam a redução da excreção de SE e outros sorotipos causadores do paratifo. Silva et al. (1981) relataram a redução de 20% na excreção fecal de STM em aves vacinadas por via oral ou subcutânea com a estirpe SG9R. Barrow et al. (1991), notaram que não ocorreu redução da excreção fecal de uma estirpe de SE, utilizada para desafiar as aves após a vacinação com vacina heteróloga, preparada com estirpe atenuada de SG. No entanto há pouca informação na literatura científica a respeito do controle de SG com a utilização de vacinas vivas. Este trabalho apresenta resultados originais e por ser desenvolvido em condições aplicáveis a campo, estes dados devem contribuir para o melhor conhecimento do uso desta estirpe em lotes de aves comerciais.

Segundo Penha Filho et al. (2010) a estirpe atenuada $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ consegue invadir pelo intestino e colonizar os órgãos internos, no entanto permanece por um período menor do que a estirpe selvagem nestes órgãos. Assim, provoca uma infecção moderada e leva à formação de uma reposta imune capaz de proteger as aves contra SE e SG.

Cerquetti e Gherardi (2000) utilizaram uma estirpe atenuada de SE para vacinar aves nos primeiros dias de vida. A estirpe vacinal conferiu boa proteção contra SG, quando o desafio foi realizado 14 dias após a aplicação da última dose imunizadora, mas não foi capaz de proteger contra o desafio por STM. Esta estirpe apresentou algumas características que podem desfavorecer a sua utilização à campo. Após a última vacinação, as aves liberaram a estirpe vacinal no ambiente por até 14 dias. A estirpe $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ possui algumas características vantajosas quando se considera seu uso como vacina. As inoculações por via oral ou por via subcutânea demonstraram a mesma eficácia contra o desafio por SG. Além disso, a excreção fecal e a consequente contaminação do ambiente pela estirpe

SG Δ cobS Δ cbiA são inexpressivas, mesmo após a inoculação oral (PENHA FILHO et al., 2010).

Em um estudo a campo, Feberwee et al. (2001a) relacionaram a redução de infecções por *Salmonella* spp. em lotes de aves poedeiras comerciais à utilização de vacina viva atenuada de SG, em conjunto com a aplicação de um programa de biossegurança. No presente trabalho, os inóculos utilizados para desafiar as aves continham 10⁸ UFC/mL, o que pode ter influenciado na mortalidade que ocorreu nos grupos vacinados. O uso da estirpe SG Δ cobS Δ cbiA em granjas avícolas ainda não foi testado, mas o planejamento dos programas vacinais testados e os resultados dos ensaios realizados indicam que SG Δ cobS Δ cbiA poderá ser uma importante ferramenta para combater infecções por SG a campo.

Em um estudo para avaliar a eficácia da vacina SG9R contra o desafio por uma estirpe selvagem de SG, isolada de um caso de campo, Lee et al. (2007) demonstraram que não houve diferença significativa na mortalidade entre os grupos de aves vacinadas e o grupo controle, indicando que a proteção de aves vacinadas com a estirpe SG9R pode ser limitada. Barrow (2007) observou que a estirpe SG9R é uma vacina segura para utilização a campo e apresenta eficácia razoável para ser utilizada como uma das ferramentas de um programa de biossegurança para o controle de SG em granjas avícolas comerciais. Entretanto, quando se trata de programas de vacinação para prevenir a infecção de aves contra sorotipos de *Salmonella* spp. que acometem diversos hospedeiros, os resultados são variáveis. Okamoto et al. (2010) observaram que quando aves poedeiras vermelhas foram vacinadas com a estirpe viva SG9R e desafiadas por SG selvagem isolada de aves, nenhuma ave apresentou quaisquer sintomas clínicos ou morreram durante os experimentos, e não foram observadas lesões macroscópicas nos exames *post-mortem*.

Matsuda et al. (2010) demonstraram que a deleção dos genes *lon* e *cpxR* de uma estirpe de SG (estirpe mutante JOL916) diminuiu a patogenicidade desta estirpe e causou atenuação satisfatória para ser utilizada como vacina. Esta estirpe foi capaz de estimular a resposta imune celular e de proteger aves contra um desafio pela estirpe selvagem de SG. Chaudhari et al. (2011; 2012) demonstraram que esta mesma estirpe (SG JOL916), induziu uma forte resposta imune humoral,

representados por altos níveis de IgG no soro e de IgA no lúmen intestinal de aves vacinadas e considerou esta estirpe segura para a prevenção do tifo aviário por não ser capaz de causar sintomas clínicos.

As vacinas inativadas (bacterinas) que estão disponíveis no mercado atualmente, não promovem resposta imune completa (PENHA FILHO et al, 2009), devido à grande deficiência para estimular a resposta imune celular e induzir a ativação de macrófagos, imprescindível para a proteção contra patógenos intracelulares, como *Salmonella* spp. (RANA; KULSHESHTHA, 2006; PAIVA et al., 2009; PENHA FILHO et al., 2010). Apesar deste fato, são vacinas mais seguras, visto que não há risco de reversão de virulência ou de induzirem sintomas adversos em aves com imunossupressão. De acordo com Gast (2007), as bacterinas induzem a formação de uma resposta imune humoral de longa duração e reduzem a duração e a severidade da infecção além de auxiliar na prevenção de reinfecções. No Experimento 1, as aves do grupo C que foram vacinadas com a combinação da vacina viva, SG Δ cobS Δ cbiA, na 4ª semana e de uma bacterina na 8ª semana de vida demonstraram a menor taxa de reisolamento da estirpe desafio no fígado/baço ao fim do experimento, no 28º DPI. Este resultado indica que através da combinação da vacina viva e da bacterina pode ser atingido uma boa eficácia com uma resposta mista entre elementos celulares e humorais. Este programa de vacinação pode ser útil em granjas comerciais com boas condições manejo, onde não seja possível vacinar com duas doses de vacina viva em idades mais avançadas. Para o controle do tifo aviário nestas granjas, a eliminação mais rápida da infecção diminui o risco de contaminação do ambiente, reduzindo a infecção do restante do lote.

A colonização do intestino por uma estirpe vacinal de *Salmonella* spp. seria uma forma de proteger aves recém-eclodidas e aves recém-vacinadas contra a infecção por estirpes patogênicas, pois durante este período inicial de vida, a resposta imune das aves ainda é limitada. A proteção pela estirpe atenuada de SG Δ cobS Δ cbiA parece ser estimulada nos tecidos linfóides presentes em órgãos internos, como no fígado e no baço e sugerem que a imunidade na mucosa intestinal não foi capaz de impedir a entrada da estirpe de SG selvagem, utilizada para o desafio, uma vez que esta foi encontrada no fígado e baço de aves vacinadas e não vacinadas no 20º DPI. Estirpes atenuadas de SE mostram melhores resultados no

que tange ao estímulo da imunidade de mucosa, no entanto, são excretadas no ambiente, o que é uma característica indesejável para uma vacina. A proteção do trato intestinal das aves durante este período parece ser exercida, mais satisfatoriamente, pelo método de exclusão competitiva (METHNER et al., 2001; BERCHIERI JR.; FREITAS NETO, 2009).

A resposta imune induzida em aves domésticas vacinadas reduz a duração e a severidade das infecções por *Salmonella* spp. e ajuda a prevenir à reinfecção. Portanto, a vacinação ainda mostra-se como a melhor ferramenta para reduzir a suscetibilidade das aves às infecções por *Salmonella* spp. e assim, proteger a população consumidora da transmissão de agentes de infecções alimentares (GAST, 2007). No entanto, se o programa vacinal for aplicado de forma incorreta e as demais medidas de biossegurança, como a correta limpeza das instalações e o controle intensivo de vetores forem deixadas de lado, a vacina pode não produzir o efeito esperado (DAVIES; BRESLIN, 2003).

A estirpe atenuada SG Δ cobS Δ cbiA mostrou-se capaz de proteger aves contra o desafio pela estirpe patogênica de SG e os resultados obtidos na presente pesquisa são promissores. Este trabalho demonstrou que a utilização desta estirpe em programas vacinais utilizados a campo, para o controle do tifo aviário, pode alcançar excelentes níveis de proteção.

7. CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais adotadas no presente trabalho concluiu-se que:

A vacinação com *SGΔcobSΔcbiA* mostrou-se capaz de proteger as aves contra o desafio pela SG, e ajuda a prevenir a reinfeção é segura para uso em galinhas.

A vacina foi capaz de proteger galinhas contra o tifo aviário diminuindo a mortalidade, inclusive durante os períodos de estresse fisiológicos da vida dessas aves, como o início da produção de ovos.

A aplicação de 2 ou 3 doses da estirpe *SGΔcobSΔcbiA* é capaz de proteger parcialmente as aves contra o desafio da estirpe selvagem de SG.

A aplicação 3 doses por via oral da estirpe *SGΔcobSΔcbiA* não comprometeu a postura das aves.

8. REFERÊNCIAS

BABU, U.; DALLOUL, R. A.; OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H. S.; XIE, H.; RAYBOURNE R. B.; GAINES, D.; HECKERT, R. A. *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Laurel, v. 101, n. 3-4, p. 251-257, 2004.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A.; BERCHIERI JUNIOR, A. The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A.**, London, v. 20, n. 4, p. 681-692, Out-Dec., 1991.

BARROW, P. A., HUGGINS, M.B., LOVELL, M.A. Host specificity of *Salmonella* infections in chickens and mice is expressed at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 62, no. 10, p. 4602–4610, Out., 1994.

BARROW, P. A.; WALLIS, T. S. **Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application.** In: Wray, C. (Ed.) *Salmonella* in domestic animals. CAB International, Oxford, England, p.323-339, 2000.

BARROW, P. A. *Salmonella* infections: Immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A.**, London, v. 36, n. 1, p. 1-13, Fev. 2007.

BARROW, P.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A.**, London, v. 40, n. 1, 1-13, Feb. 2011.

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

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. **Salmoneloses aviárias**. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. *Doenças das aves*, 2^o ed. Campinas: Facta, 2009, p. 435-471.

BERCHIERI JUNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. **Tifo Aviário**. Capítulo Principais Doenças Bacterianas. In: *Saúde Aviária e Doenças*, Editora: Editora Roca, 1^a Ed., p. 90-96, 2006.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A**, London, v. 30, n.1, p. 229-239, 2001.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H.; PINHEIRO, L. A. S.; BARROW, P. A. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hen lines. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 31, n.1, p. 50-52, Jan.-Marc. 2000.

BJÖRKMAN, J.; RHEN, M.; ANDERSSON, D. I. *Salmonella typhimurium* *cob* mutants are not hyper virulent. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 139, n. 2-3, p. 121-126, Jun. 1996.

BOUZOUBAA, K.; NAGARAJA, K. V.; KABBAJ, F. Z.; NEWMAN, J. A.; POMEROY, B. S. Feasibility of using proteins from *Salmonella gallinarum* vs. 9R live vaccine for the prevention of fowl typhoid in chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v.33, n. 3, p. 385–391, Jul.-Sep. 1989

BOUZOUBAA, K.; NAGARAJA, K. V.; NEWMAN, J. A.; POMEROY, B. S. Use of Membrane Proteins from *Salmonella gallinarum* for Prevention of Fowl Typhoid Infection in Chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v. 31, N. 4, p. 699-704, Oct. - Dec., 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Sanidade Avícola. Instrução Normativa 78**. Diário oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília - DF, 5 nov. 2003, Seção 1, Página 3.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n.7, p. 2456-2467, July, 2000.

BUCHALA, F. G.; ISHIZUKA, M. M.; MATHIAS, L. A.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; KANASHIRO, A. M. I. Detecção de resposta sorológica contra *Mycoplasma* sp. em aves de criatórios de “fundo de quintal” próximos a explorações comerciais do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, Campinas, São Paulo, v. 73, n. 2, p.143-148, 2006.

CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MSDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. **Pullorum Diseases and Fowl typhoid**. In: Shivaprassad H. N., editor. Disease of poultry. 10th ed. Ames: Iowa State University Press, p. 220-228, 1997

CARDOSO, B.; ROCHA, L. C. **Controle de salmonelas em avicultura através do uso de vacina**. V Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM, Santa Maria, 10 e 11 Ago, 2006.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. In: ArtMed. **Patologia Veterinária Especial**, Porto Alegre: 1998. Cap. 1, p. 86-88

CDC - Centers for Diseases Control and Prevention. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections associated with frozen pot pies-United States, 2007, **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.57, n.47, p.1277-1280, 2007.

CERAGIOLI, M.; CANGIANO, G.; ESIN, S.; GHELARDI, E.; RICCA, E.; SENESI, S. Phagocytosis, germination and killing of *Bacillus subtilis* spores presenting heterologous antigens in human macrophages. **Microbiology**, Washington, DC, v. 155, n. 2, p. 338–346, Feb., 2009.

CERQUETTI, M. C.; GHERARDI, M. M. Orally administered attenuated *Salmonella* Enteritidis reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 185–192, Sep. 2000.

CHADFIELD, M. S.; BROWN, D. J.; AABO, S.; CHRISTENSEN, J. P.; OLSEN, J. E. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella* Gallinarum and other host-adapted *Salmonella enterica* serovars in the avian host. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1-2, p. 49–64, Mar., 2003.

CHARLES, S. D.; HUSSAIN, I.; CHOI, C. U.; NAGARAJA, K. V.; SIVANANDAN, V. Adjuvanted subunit vaccines for the control of *Salmonella* Enteritidis infection in turkeys. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, Ill, v. 55, n. 5, p. 636–642. May, 1994.

CHAUDHARI, A. A.; KIM, S. W.; MATSUDA, K.; LEE, J. H. Safety Evaluation and Immunogenicity of Arabinose-Based Conditional Lethal *Salmonella* Gallinarum Mutant Unable to Survive *Ex Vivo* as a Vaccine Candidate for Protection Against Fowl Typhoid. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v. 55, n. 2, p.165-171, Jun., 2011.

CHAUDHARI, A. A.; JAWALE, C. V.; KIM, S. W.; LEE, J. H. Construction of a *Salmonella* Gallinarum ghost as a novel inactivated vaccine candidate and its protective efficacy against fowl typhoid in chickens. **Veterinary Research**, London, v. 43, n. 1, p. 1-11, May, 2012.

CHRISTENSEN, J. P.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Ribotypes of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum, **Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A**, London, v. 22, n. 4, p. 725-738, Oct.-Dec., 1993.

DAVIES, R.; BRESLIN, M. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. **The Veterinary Record**, London, v. 152, n. 10, p. 283-287, Mar., 2003.

DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESBROEK, F.; DUCATELLE, R. Protection of laying hens against *Salmonella* Enteritidis by immunization with type 1 fimbriae. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 93–101, Jan., 2005.

DE BUCK, J.; PASMANS, F.; HAESBROEK, F.; DUCATELLE, R. Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella enteritidis* in the upper oviduct of laying hens. **Poultry Science**, Champaign Il, v. 83, n. 3, p. 352-8, Mar., 2004.

DEGUCHI, K.; YOKOYAMA, E.; HONDA, T.; MIZUNO, K. Efficacy of a novel trivalent inactivated vaccine against the shedding of *Salmonella* in a chicken challenge model. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v. 53, n. 2, p. 281–286, Jun., 2009.

EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. **EFSA Journal**, Parma, v. 10, n. 3. 2597,442 pp, 2012

EFSA. Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for public health hazards to be covered by meat inspection of swine. **EFSA Journal**, Parma, v. 9, n.10, 2371, 125pp, 2011.

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

FEBERWEE, A., DEVRIES, T. S., HARTMAN, E. G., DEWIT, J. J., ELBERS, A. R. W., DE JONG, W. A. Vaccination against *Salmonella enteritidis* in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on a live *Salmonella gallinarum* 9R strain: Evaluation of efficacy, safety, and performance of serologic Salmonella tests. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v. 45, n. 1, 83-91, Jan. - Mar., 2001a

FEBERWEE, A.; HARTMAN, E. G.; DE WIT, J. J.; DE VRIES, T. S. The Spread of *Salmonella gallinarum* 9R Vaccine Strain under Field Conditions. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v. 45, n. 4, p. 1024-1029, Oct. - Dec., 2001b.

FIELDS, P. I.; SWANSON, R. V.; HAIDARIS, C. G.; HEFFRON, F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 83, n. 14, p. 5189–5193, Jul., 1986

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics**, Paris, v. 25, n. 2, p. 541-554, Aug., 2006.

FREITAS NETO, O. C.; SETTA, A.; IMRE, A.; BUKOVINSKI, A.; Altaeb ELAZOMI, A.; Pete KAISER, A.; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P.; Michael JONES, M. A flagellated motile *Salmonella Gallinarum* mutant (SG Fla+) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 165, n. 3-4, p. 425-433, Aug., 2013.

FREITAS NETO, O. C.; PENHA FILHO, R. A. C.; BARROW, P.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Sources of Human non-typhoid salmonellosis: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 01-11, Jan.-Mar., 2010.

FREITAS NETO, O. C.; ARROYAVE, W. H.; ALESSI, A. C.; FAGLIARI, J. J.; BERCHIERI, JÚNIOR., A. *Salmonella Gallinarum*: Clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas. v. 9, n. 2, p.133-141, Apr - Jun 2007.

GARCIA, K. O.; A. BERCHIERI; A. M. SANTANA; ALARCON, M. F. F.; DE FREITAS NETO, O. C. ; FAGLIARI J. J. Experimental infection of commercial layers with wild or attenuated *Salmonella Gallinarum* mutant strains: anatomic Pathology, total blood cell count and serum protein levels. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, p. 91-104, 2013.

GAST, R. K. Serotype-Specific and Serotype Independent Strategies for Preharvest Control of Food-Borne *Salmonella* in Poultry. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v. 51, n. 4, pp. 817-828, Dec., 2007

GAST, R. K.; STONE, H. D.; HOLT, P. S. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing faecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v. 36, n. 4, p. 992–999, Oct. - Dec., 1992.

GORDON, W. A. M.; LUKE, D. A note on the use of the 9R fowl typhoid vaccine in poultry breeding flocks. **The Veterinary Record**, London, v. 71, n. 15, p. 926-927, Apr., 1959.

GREENWOOD, P. E.; NIKULIN, M. S. **A Guide To Chi-Squared Testing**. New York: Wiley, 1996

GRIFFIN, H. G.; BARROW, P. A. Construction of an *aroA* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum: its effectiveness in immunization against experimental fowl typhoid. **Vaccine**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 457-462, Feb., 1993.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 1, p. 26–29, Jan.-Feb. 2010.

HARBOURNE, J. F.; WILLIAMS, B. M.; PARKER, W. H.; FINCHAM, I. H. The prevention of fowl typhoid in the field using a freeze-dried 9R vaccine. **The Veterinary Record**, London, v.75, n. 34, p. 858-861, Aug., 1963.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS E. M. F. Prevalence of *Salmonella* serovars isolated from birds in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.17, n. 2, p. 55-62, 1997.

JEON, B. W.; NANDRE, R. M.; LEE, J. H. Oral immunization with an attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant as a fowl typhoid vaccine with a live adjuvant strain secreting the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **BMC Veterinary Research**, London, v. 9, n. 5, p. 1-8, May 2013.

KANG, M.-S.; KWON, Y.-K. ; KIM, H.-R.; OH, J.-Y.; KIM, M.-J.; BYUNG-KI AN, B.-K.; SHIN, E.-G.; KWON, J.-H.; PARK, C.-K. Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 160, n. 3-4, p. 491-5. Dec., 2012

KINDE, H.; CASTELLAN D. M.; KASS, P. H.; ARDANS, A.; CUTLER, G.; BREITMEYER, R. E.; BELL, D. D.; ERNST, R. A.; KERR, D. C.; LITTLE, H. E.; WILLOUGHBY, D.; RIEMANN, H. P.; SNOWDON, J. A.; KUNEYK, D. R. The Occurrence and Distribution of *Salmonella* Enteritidis and Other Serovars on California Egg Laying Premises: A Comparison of Two Sampling Methods and Two Culturing Techniques. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 48, n. 3, p. 590-594, Set. 2004.

KLEIN, E. Über eine epidemische Krankheit der Hühner, verursacht durch einer *Bacillus-Bacillus gallinarum*. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Abt I Orig**, Stuttgart, v. 5, :689–693, 1889.

KOKOSHAROV, T.; PETKOV, I.; DZHUROVA, I. Cocks with experimentally induced acute typhoid. **Veterinarno Meditsinski Nauki**, Sofia, v. 21, n. 5, p.18–26, May., 1984

KUMARI, D.; MISHRA, S. K.; LATHER, D. Pathomicrobial studies on *Salmonella* Gallinarum infection in broiler chickens, **Veterinary World**, Rajkot, v. 6, n. 10, p. 725-729, Out.,2013.

LEE, Y. J.; MO, I. P.; KANG, M. S. Protective efficacy of live *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in commercial layer flocks. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A.**, London, v. 36, n. 6, p. 495 – 498, 2007

LEE, Y.J.; MO, I. P.; KANG, M.S.; Safety and efficacy of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in young laying chickens. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A**, London, v. 34, n. 4, p. 362-366, Aug. 2005.

LEE, Y.J.; KIM, K.S.; KWON, Y.K.; TAK, R.B. Biochemical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Gallinarum isolated in Korea. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 4, n. 2, p.161-166, Aug., 2003.

LIU, T.; KÖNIG, R.; SHA, J.; AGAR, S. L.; TSENG, C, T.; KLIMPEL, G. R.; CHOPRA, A. K. Immunological responses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Braun lipoprotein and lipid A mutant strains in Swiss-Webster mice: potential use as live-attenuated vaccines. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 44, n. 3, p. 224-237, Mar., 2008.

MAMTA, S.; MISHRA, K.; LATHER, D. Ameliorating effect of tulsi (*ocimum sanctum*) leaf powder on pathology of *Salmonella* Gallinarum infection in broiler chickens. **Haryana Veterinary**, Hisar, v. 49, n. único, p. 6-10, Dec., 2010.

MASTROENI, P.; CHABALGOITY, J. A.; DUNSTAN, S. J.; MASKELL, D. J.; DOUGAN G. *Salmonella*: Immune responses and vaccines. **The Veterinary Journal, Cambridge**, v. 161, n. 2, p.132-164, Mar., 2000.

MATSUDA, K.; CHAUDHARI, A. A.; KIM, S. W. ; LEE, K. M. ; LEE, J. H. Physiology, pathogenicity and immunogenicity of *lon* and/or *cpxR* deleted mutants of *Salmonella* Gallinarum as vaccine candidates for fowl typhoid. **Veterinary Research**, London, v. 41, n. 5, p. 59, Sep-Oct. 2010.

METHNER, U., BERNDT, A., STEINBACH, G. Combination of competitive exclusion and immunization using an attenuated live *Salmonella* vaccine strain in chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v. 45, n. 3, p. 631-638, Jul. - Sep., 2001.

MONLEON, R.; MARTIN, M. P.; BARNES, H. J. Bacterial orchitis and epididymo-orchitis in broiler breeders. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A**, London, v. 37, n. 6, p. 613-617, Dec., 2008

NASSAR, T. J.; AL-NAKHLI, H. M.; AL-OGAILY, Z. H. Use of live and inactivated *Salmonella* Enteritidis phage type 4 vaccine immunise laying hens against experimental infection. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 13, n. 3, p. 855–867, 1994.

OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. World Organisation for Animal Health, 2012. **Terrestrial Animal Health Code, Chapter 2.3.11.**, 14p. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2012. Paris, France. Disponível. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Healthstandards/tahm/2.03.11_FOWLTYPHOID.pdf > Acesso em: 18/09/2013.

OKAMOTO, A. S. ; MENCONI, A.; GONÇALVES, G. A. M.; ROCHA, T. S.; ANDREATTI FILHO, R. F.; SAVANO E. N.; SESTI, L. Reversion to Virulence Evaluation of a 9R Vaccine Strain of *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum in Commercial Brown Layers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.12, n.1, p. 47-52, Jan-Mar., 2010.

OLIVEIRA, G. H.; FERNANDES, A. C.; BERCHIERI JÚNIOR A. Experimental infection of laying hen with *Salmonella* Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 36, n.1, p. 51-56, Jan.- Mar. 2005.

PAIVA, J. B.; PENHA FILHO, R. A. C.MOURA, B. S.; BERCHIERI JUNIOR, A. Safety and Efficacy of a *Salmonella* Gallinarum $\Delta cobS\Delta cbiA$ Strain with Potential to Prevent Chicken Infections by *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.14, n.2, p. 115-120, Apr.-Jun., 2012.

PAIVA, J. B.; PENHA FILHO, R. A. C.; ARGÜELLO, Y. M. S.; SILVA, M. D.; GARDIN, Y.; RESENDE, F.; BERCHIERI JUNIOR, A.; SESTI, L. Efficacy of several *Salmonella* vaccination programs against experimental challenge with *Salmonella gallinarum* in commercial brown layer and broiler breeder hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.11 n.1, Jan.-Mar. 2009

PENHA FILHO, R. A. C.; MOURA, B. S; ALMEIDA, A. M.; MONTASSIER, H. J.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JUNIOR, A. Humoral and cellular immune response generated by different vaccine programs before and after *Salmonella* Enteritidis challenge in chickens. **Vaccine**, Amsterdam, v. 30, n. 52, p. 7637-7643, Dec., 2012.

PENHA FILHO, R. A. C.; PAIVA, J. B.; SLVA, M. D.; ALMEIDA, A. M.; BERCHIERI JUNIOR, A. Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. **Vaccine**, Amsterdam, v. 28, n. 16, p. 2853-2858, Apr., 2010.

PENHA FILHO, R. A. C.; PAIVA, J.B.; ARGUELLO, Y. M. S.; SILVA, M.D.; GARDIN, Y.; RESENDE, F.; BERCHIERI JUNIOR, A.; SESTI, L. Efficacy of several *Salmonella* vaccination programs in commercial layer and broiler breeder hens against experimental challenge with *Salmonella* Enteritidis. **Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A**, London, v.38, n. 5, p. 367-375, Oct., 2009.

PENHA, G. A.; SUZUKI, E. Y.; UEDA, F. S.; PEREIRA R. E. P. Diagnóstico da salmonelose e sua importância para a avicultura: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 6, n.10, p. 1-8, Jan., 2008.

POMEROY, B. S; NAGARAJA, K. V. **Fowl typhoid**. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, W. H. Ed. In: Diseases of Poultry. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 1991, p. 87-99.

QUINN P. J.; MARKEY B.; CARTER M. E.; DONNELLY W. J.; LEONARD F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Artmed, Porto Alegre, p.115-130, 2005.

RANA, N.; KULSHRESHTHA, R.C. Cell-mediated and humoral immune responses to a virulent plasmid-cured mutant strain of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum in broiler chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 1-3, p.156-162, Jun., 2006.

RICHTER-DAHLFORS A., BUCHAN A. M. J., FINLAY B. B. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 186, n. 4, p. 569–580, Aug., 1997

SCHALLER G. Decision criteria for vaccination against *Salmonella* in poultry. **Acta Veterinaria Scandinavia**, Copenhagen, v. 90, n. supplements 1, p. 69-71, 1996.

SHAH, D. H.; SHRINGI, S.; DESAI, A. R.; HEO, E. J.; PARK, J. H.; CHAE, J. S. Effect of *metC* mutation on *Salmonella* Gallinarum virulence and invasiveness in 1-day-old White Leghorn chickens. **Veterinary Microbiology**, Jeonju, v. 119, n. 2-4, p. 352-357, Jan., 2007.

SHAH, D. H.; SEOL, J.-W.; PARK, S.-Y.; RYU, K.-S.; KWON, J.-T.; CHO, M.-R.; PARK, J.-H.; KANG, C.-S.; KANG, H.-S.; CHAE, J.-S. Control of Fowl Typhoid Using Tissue Culture Medium Waste After Harvest of Korean Wild Ginseng (*Panax ginseng*). **The Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 14 n. 3, p. 455-462, Jul.-Sep., 2005

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Pullorum Disease and Fowl Typhoid. In: **Diseases of poultry (12th)**. Oxford, 2008 p. 620-636.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl Typhoid and Pullorum Disease. **Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties**, Paris, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 2, n. 2, p.85-100, May., 2002.

SILVA, E. N.; SNOEYENBOS, G. H., WEINACK, O. M.; SMYSER, C. F. Studies on the use of 9R strain of *Salmonella gallinarum* as a vaccine in chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square Pa, v.25, n. 1, p. 38-52, Jan-Mar. 1981.

SMITH, I. M. Protection Against Experimental Fowl Typhoid by Vaccination with strain 9r Reconstituted from the Freeze-Dried state. **Journal of Comparative Pathology**, London, Vol. 79, no. 2, p. 197-205. Apr., 1969.

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

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, A. S.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 315-322, May-Jun., 1996

TIMMS, L. M.; MARSHALL, R. N.; BRESLIN, M. F. Laboratory and field-trial assessment of protection given by *Salmonella enteritidis* PT4 inactivated adjuvant vaccine. **British Veterinary Journal**, London, v. 150, n. 1, p. 93-102, Jan-Fev., 1994.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZÉBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n.1, p. 521–524, Jan. 2005

THOMSON, N. R.; CLAYTON, D. J.; WINDHORST, D.; VERNIKOS, G.; DAVIDSON, S.; CHURCHER, C.; QUAIL, M. A.; STEVENS, M.; JONES, M. A.; WATSON, M.; BARRON, A.; LAYTON, A.; PICKARD, D.; KINGSLEY, R. A.; BIGNELL, A.; CLARK, L.; HARRIS, B.; ORMOND, D.; ABDELLAH, Z.; BROOKS, K.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; WOODWARD, J.; NORBERCZAK, H.; LORD, A.; ARROWSMITH, C.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; SANDERS, M.; WHITEHEAD, S.; CHABALGOITY, J. A.; MASKELL, D.; HUMPHREY, T.; ROBERTS, M.; BARROW, P. A.; DOUGAN, G. PARKHILL, J. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome Research**, New York, v.18, n.10, p, 1624–1637, Oct., 2008.

VAN IMMERSEEL, F.; MEULEMANS L.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; VELGE, P.; BOTTREAU, E.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Bacteria-host interactions of *Salmonella* Paratyphi B dT⁺ in poultry. **Epidemiology and infection**, Cambridge, v. 132, n. 2, p. 239-243, Apr., 2004.

WAN NORHANA, M. N.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, Kidlington, v. 21, n. 4, p. 343–361, April, 2010.

WIGLEY, P.; HULME, S.; POWERS, C; BEAL, R.; SMITH, A; BARROW, P. Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterize immunity to fowl typhoid in the chicken. **BMC Veterinary Research**, London, v. 12, n. 1, p. 1-6, Jan., 2005.

WIGLEY, P.; HULME, S. D.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P. A. *In vivo* and *in vitro* studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by SALI locus. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, n. 11, p.1111–1120, Sept., 2002

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

WYANT, T. L.; TANNER, M. K.; STEIN, M. B. *Salmonella typhi* flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 67, n. 7, p. 3619-3624, Jul., 1999.

WORLDPOULTRY, **Fowl typhoid strikes layer farm in Northern Ireland**. 2012. Disponível em: < <http://www.worldpoultry.net/Layers/Health/2012/11/Fowl-typhoid-strikes-layer-farm-in-Northern-Ireland-1099165W/> > Acesso em 05 de Novembro de 2012.

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