

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMPORTÂNCIA DOS GENES *fliC* e *motB* DE *Salmonella*
enterica subsp. *enterica* sorovar Enteritidis NA
COLONIZAÇÃO INTESTINAL E INVASÃO SISTÊMICA
EM AVES (*Gallus gallus domesticus*)**

Fernanda de Oliveira Barbosa

Médica Veterinária

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMPORTÂNCIA DOS GENES *fliC* e *motB* DE *Salmonella*
enterica subsp. *enterica* sorovar Enteritidis NA
COLONIZAÇÃO INTESTINAL E INVASÃO SISTÊMICA
EM AVES (*Gallus gallus domesticus*)**

Fernanda de Oliveira Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Prof.Dr. Oliveira Caetano de Freitas

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal.

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

B238i Barbosa, Fernanda de Oliveira
Importância dos genes *fliC* e *motB* de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis na colonização intestinal e invasão sistêmica em aves (*Gallus gallus domesticus*) / Fernanda de Oliveira Barbosa. -- Jaboticabal, 2016
xx, 67 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Angelo Berchieri Junior
Coorientador: Oliveiro Caetano de Freitas Neto
Banca examinadora: Ana Maria Iba Kanashiro, Rafael Antônio Casarin Penha Filho
Bibliografia

1. Paratifo aviário. 2. Flagelo. 3. Motilidade. 4. Aves. 5. Patogenicidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616.981.49:636.5



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IMPORTÂNCIA DOS GENES *fliC* e *motB* DE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis NA COLONIZAÇÃO INTESTINAL E INVASÃO SISTÊMICA EM (*Gallus gallus domesticus*)

AUTORA: FERNANDA DE OLIVEIRA BARBOSA

ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

COORIENTADOR: OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO
Departamento de Ciências Veterinárias / UFPB - Paraíba/PB

Profa. Dra. ANA MARIA IBA KANASHIRO
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola / Instituto Biológico - Descalvado/SP

Pós-Doutorando RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDA DE OLIVEIRA BARBOSA – nascida em 22 de novembro de 1988, na cidade de Atibaia, São Paulo. Medica Veterinária formada em outubro de 2013, pela Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. Durante e a graduação foi bolsista de Iniciação Científica em duas ocasiões e monitora das disciplinas de “Citologia, Histologia e Embriologia” e posteriormente de “Imunologia Veterinária”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Fátima e Wilian, por todo o apoio, amor e zelo. Sem vocês essa conquista não seria possível.

Agradeço ao meu orientador Angelo Berchieri, por me dar a oportunidade de participar da equipe e aprender com seus ensinamentos que ultrapassam a dissertação.

Agradeço ao coorientador Oliveiro por fornecer a idéia do projeto e todo apoio, dedicação, paciência durante esse período.

Agradeço à equipe da Ornitopatologia: Adriana, Andrei, Anny, Diego, Lucas e Marcela pelo auxílio durante execução dos experimentos. Não poderia deixar de esquecer de Janine, Angélica e Gabriela que participaram da equipe e equipes dos departamentos de Patologia Animal e Tecnologia que me emprestaram equipamentos quando necessário.

Agradeço às amigas que conquistei em especial Anny, Marcela, Mayara e Zé, que tornaram meus dias mais leves fora do laboratório.

Agradeço ao meu namorado Eduardo pelo amor, atenção e paciência.

Agradeço à todos os funcionários da UNESP que contribuíram de alguma forma com este trabalho: Adriana, Agda, Aline, Camila, Chica, Lia, João, Marcolino, Edgar, Theo e motoristas que trouxeram os pintinhos para o experimento.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, que foram cedidos pela empresa Hy-Line do Brasil para o estudo.

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Agradeço aos membros da banca pela sugestões feitas para melhoria do trabalho.

Muito Obrigada!

AUXÍLIO FINANCEIRO

Este projeto teve bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, sob o processo nº 2014/02014-1

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	x
CERTIFICADO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 <i>Salmonella enterica</i>	3
1.2 <i>Salmonella</i> Enteritidis e Saúde Pública	4
1.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis e avicultura	6
1.4 Fase intestinal e sistêmica do paratifo aviário	8
1.5 Estrutura do flagelo – genes <i>fliC</i> e <i>motB</i>	10
3 OBJETIVOS	14
3.1 Geral.....	14
3.2 Específicos	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Bactérias e preparo dos mutantes.....	15
4.2 Escolha da sequência alvo e construção dos iniciadores.....	16
4.2.1 A amplificação dos fragmentos de DNA recombinante	17
4.2.2 Precipitação dos fragmentos de DNA recombinantes	18
4.2.3 Eletroporação.....	18
4.2.4 Transdução.....	18
4.2.5 Verificação da mutação nas estirpes de <i>Salmonella</i> spp.....	19
4.2.6 Detecção de motilidade	20
4.2.7 Sorologia.....	20
4.3 Experimentos <i>in vivo</i>	20
4.3.1. Aves experimentais	21
4.3.2. Preparo do inóculo	21
4.4 Experimento 01: Avaliação da excreção fecal e mortalidade.....	21

4.5	Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica	22
4.5.1.	Avaliação macro e microscópica.....	23
4.6	Forma de análise dos resultados.....	23
5	RESULTADOS.....	24
5.1	Preparo dos mutantes.....	24
5.2	Verificação de motilidade nas estirpes SENal ^f , SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta motB$	26
5.3	Teste de aglutinação com soros contra antígenos de <i>Salmonella</i>	26
5.4	Aves experimentais	27
5.5	Experimento 01: Avaliação da excreção fecal e mortalidade.....	27
5.6	Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica	28
5.6.1	Avaliação macro e microscópica.....	30
	DISCUSSÃO	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	APÊNDICES.....	59

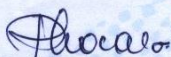
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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



**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 1.353/15 do trabalho de pesquisa intitulado "Importância dos genes *fliC* e *motB* de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis na colonização intestinal e invasão sistêmica em *Gallus gallus domesticus*", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de março de 2015.

Jaboticabal, 03 de março de 2015.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

CERTIFICADO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA

	Comissão Interna de Biossegurança	
	Ofício CIBio 004/14	
	Ref.: Certificado de Aprovação de Projeto de Pesquisa	

CERTIFICADO

Certificamos, a quem possa interessar, que o trabalho de pesquisa intitulado: "IMPORTÂNCIA DOS GENES *fliC* e *motB* DE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis NA COLONIZAÇÃO INTESTINAL E INVASÃO SISTÊMICA EM *Gallus gallus domesticus*", sob responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Bercheri Junior, foi aprovado pelo CIBio da FCAV-UNESP em reunião de 13/07/15.

Jaboticabal, 13 de julho de 2015.



Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes
- Presidente da CIBio -

IMPORTÂNCIA DOS GENES *fliC* e *motB* DE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis NA COLONIZAÇÃO INTESTINAL E INVASÃO SISTÊMICA EM AVES (*Gallus gallus domesticus*)

RESUMO – *Salmonella* Enteritidis (SE) causa o paratifo aviário em aves e frequentemente está relacionada aos surtos de infecção alimentar em seres humanos. A contribuição do flagelo *versus* motilidade na interação patógeno-hospedeiro requer estudos mais aprofundados. Para melhor entendimento da contribuição individual desses fatores de virulência em aves, pintinhos de um dia de vida foram desafiados oralmente com estirpe selvagem de SE, uma mutante não-móvel mas flagelada (SE Δ *motB*) e outra mutante aflagelada (SE Δ *fliC*). Excreção fecal e colonização de fígado, baço e conteúdo cecal pelas estirpes de SE foram avaliadas. Além disso, também foi realizada a avaliação das alterações macroscópicas e microscópicas. Nos estágios iniciais da infecção, ambos mutantes mostraram menor capacidade de colonizar o ceco, além de menor recuperação no baço por SE Δ *fliC* comparando a estirpe selvagem SE. Após 7 dpi não havia diferenças na contagem das três estirpes em conteúdo cecal, fígado e baço. Análises histopatológicas demonstraram que estirpes flageladas (SE Δ *motB* e SE) induziram reatividade linfóide em ingluvío, ceco, íleo e fígado. No entanto, nos estágios iniciais da infecção a estirpe SE Δ *fliC* não estimulou a reatividade linfóide em lâmina própria de ceco e íleo mas induziu discretos focos necróticos em fígado. Portanto, neste estudo a presença de estrutura flagelar e motilidade parece exercer um papel nos estágios iniciais da colonização intestinal e infecção sistêmica por SE nas aves.

Palavras-chave: Paratifo aviário, flagelo, motilidade, aves, patogenicidade.

IMPORTANCE OF GENES *fliC* and *motB* OF *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis IN INTESTINAL COLONIZATION AND SYSTEMIC INVASION IN BIRDS (*Gallus gallus domesticus*)

ABSTRACT - *Salmonella* Enteritidis (SE) causes fowl paratyphoid in poultry often related to outbreaks of food-borne diseases in humans. The contribution of flagella and motility in host pathogen interaction require further investigation. To better understand the individual contribution of these virulence factors in poultry, one day old chickens were challenged orally with wildtype strain of SE, a nonmotile but fully flagellated (SE Δ *motB*) and aflagellated mutant (SE Δ *fliC*). Faecal excretion and colonization of liver, spleen and cecal contents by the SE strains were assessed. Additionally, the assessment of gross and microscopic alterations was also performed. At the early stages of infection both mutants showed lower capacity to colonize the ceca, besides the lower recovering in spleen of SE Δ *fliC* comparing to the wild type of SE. After 7 dpi there were no differences among the counts of the three strains in ceca, liver and spleen. Histopathological analyses demonstrated that flagellated strains (wild type SE and SE Δ *motB*) induced lymphoid reactivity in crop, ceca, ileum and liver. On the other hand, in the early stages of infection, SE Δ *fliC* strain did not stimulate lymphoid reactivity in lamina propria of ceca and ileum but induced discrete necrotic foci in liver. Thus in the present study the flagellar structure and motility seemed to play a role at the early stages of the intestinal colonization and systemic infection by SE in the chicken.

Palavras-chave: fowl paratyphoid, flagellum, motility, birds, pathogenicity

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Tri- Fosfato
C	Celsius
Cl ^r	Resistência ao cloranfenicol
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dpi	Dias pós-infecção
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	Colaboradores do autor
g	gramas
(g)	aceleração da gravidade
h	horas
HE	Hematoxilina-Eosina
H ₂ S	Gás sulfídrico
H ₂ O	Água
IFN	Interferon
IL-1 β	Interleucina um beta
IL-8	Interleucina oito
IL-18	Interleucina dezoito
kV	quilovolt
kb	quilobase
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeos
Log ¹⁰	Logaritmo na base 10
mm	milímetro
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
m Ω	miliohm
NaI ^r	Resistência ao ácido nalidíxico

NF-kB	Fator nuclear kappa B
NOD	Domínio de oligomerização de ligação denucleotídeos
PAMPS	Padrões associados à patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMF	Força próton motiva
PRRs	Receptores de reconhecimentos de padrões
q.s.p.	Quantidade suficiente para
s	segundos
SE	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> sorovar Enteritidis
SE $\Delta fliC$	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> sorovar Enteritidis contendo o gene <i>fliC</i> defectivo
SE $\Delta motB$	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> sorovar Enteritidis contendo o gene <i>motB</i> defectivo
SG	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorotipo Gallinarum ntéric Gallinarum
SN	Selenito-novobiocina
SP	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorotipo Gallinarum ntéric Pullorum
SPI-1	Ilha de Patogenicidade do tipo 1
SPI-2	Ilha de Patogenicidade do tipo 2
ssp.	Espécie
SST3	Sistema de Secreção do Tipo Três
ST	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> sorovar Typhimurium
Subsp.	Subespécie
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TLR	Receptores do Tipo Toll
TLR-5	Receptores do Tipo Toll – 5
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
μF	microfarads
μg	micrograma

μL	microlitro
μm	micrometro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Myd88	Gene 88 da resposta primária de diferenciação mielóide
V	volt
VB	Verde-Brilhante

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Plasmídios utilizados nesse trabalho.....	16
Tabela 2. Iniciadores utilizados neste estudo.....	17
Tabela 3. Resultados do teste de soroaglutinação anti-antígeno de <i>Salmonella</i>	27
Tabela 4. Mortalidade de machos de linhagem semipesada para postura comercial, desafiados experimentalmente no primeiro dia de vida com cultura de SE $\Delta motB$, SE $\Delta fliC$ em comparação com a estirpe SE.....	27
Tabela 5. Relação do número de amostras positivas pelo número total de amostras de machos de postura, examinadas por suabe cloacal e desafiadas com as estirpes SE $\Delta motB$, SE $\Delta fliC$ e SE para avaliação da excreção fecal.	28
Tabela 6. Alterações macroscópicas observadas em aves de postura desafiadas experimentalmente com as estirpes mutantes SE $\Delta motB$, SE $\Delta fliC$ e SENal ^r após necropsia.	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração de um flagelo de *Salmonella* spp. com as principais proteínas que o constituem. Fonte: Chevance e Hughes (2008) 11
- Figura 2. Ilustração das proteínas que contituem o motor flagelar (MotA: azul; MotB: laranja). Fonte: Adaptado de Morimoto e Minamino (2014) .. 12
- Figura 3. Esquema da regulação dos genes responsáveis pela produção do flagelo. Fonte: Bonifield e Hugues (2003) 13
- Figura 4. Eletroferograma em agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder), 1: fragmento de DNA recombinante *motB*, 2: fragmento de DNA recombinante *fliC*. 24
- Figura 5. Eletroferograma em agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). 2, 5 e 8: SE $\Delta fliC$; 1, 4 e 7: SE selvagem; 3, 6 e 9: controle negativo. 25
- Figura 6. Eletroferograma em agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). 2, 5 e 8: SE $\Delta motB$; 1, 4 e 7: SE selvagem; 3, 6 e 9: controle negativo. 25
- Figura 7. Fotografia de ágar semisólido inoculado com estirpes de *Salmonella* spp. após incubação por 24h por 28°C. 1: SE $\Delta motB$, 2: SE $\Delta fliC$, 3: SENal^f. Setas indicam ponto de inoculação da bactéria. Borda do halo de multiplicação demarcada por asterisco indica motilidade em SENal^f. 26
- Figura 8. Contagem de SE $\Delta fliC$ (■), SE $\Delta motB$ (▲) e SENal^f (●) em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal por dia de colheita. Média do número viável (Log¹⁰UFC/g) de SE $\Delta fliC$, SE $\Delta motB$ e SENal^f em conteúdo cecal, no fígado e no baço de aves experimentalmente infectadas no primeiro dia de vida. Letras diferentes por dia de colheita representam resultados estatisticamente significantes ($P < 0.05$). 29
- Figura 9. Alterações macroscópicas de aves desafiadas com SE $\Delta motB$, SE $\Delta fliC$ e SENal^f no 7° dpi. (A) Fígado (seta preta) e baço (asterisco preto) de ave não desafiada. Aves desafiadas com SE $\Delta motB$ (B), SE $\Delta fliC$ (C) e SENal^f (D), apresentando hepatomegalia (seta vermelha) e esplenomegalia (asterisco vermelho). 32
- Figura 10. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em ingluvío de aves coletados nos dias dois, três, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi com as estirpes mutantes SE $\Delta motB$ (A), SE $\Delta fliC$ (B) e SENal^f (C). Escores de intensidade de lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: H.E. (Hiperplasia epitelial); D.E. (Descamação epitelial); R.L. (Reatividade

linfóide em lâmina própria); D.C.M. (Degeneração da camada muscular); H.C.M. (Hipertrofia de células musculares); I.C.I. (Infiltrado de células inflamatórias na camada muscular)..... 33

Figura 11. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em fígado de aves coletados nos dias dois, três, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi com as estirpes mutantes SE $\Delta motB$ (A), SE $\Delta fliC$ (B) e SENal^r (C). Escore de intensidade das lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: D.H. (Degeneração hepática); N (Áreas de necrose); C.I. (Células inflamatórias na região de necrose); R.L. (Reatividade linfóide em parênquima hepático); G (Granulomas); H.V. (Hipertrofia da parede dos vasos); C.V.S. (Congestão de vasos e sinusóides); I.P. (Inflamação perivascular). 34

Figura 12. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em íleo de aves coletados nos dias dois, três, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi com as estirpes mutantes SE $\Delta motB$ (A), SE $\Delta fliC$ (B) e SENal^r (C). Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: A.C. (Atrofia de cripta); C. (Congestão de vasos); I.L.M. (Infiltrado Linfocitário na mucosa); D.C.M. (Degeneração da camada muscular); A.V. (Atrofia de vilosidade); H.V.L. (Hiperplasia de vasos linfáticos na submucosa). 35

Figura 13. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em ceco de aves coletados nos dias dois, três, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi com as estirpes mutantes SE $\Delta motB$ (A), SE $\Delta fliC$ (B) e SENal^r (C). Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: I.I.M. (Infiltrado inflamatório mononuclear); D.A. (Desnudamento apical de vilos); A.V. (Atrofia de vilosidade); E.SM. (Edema de submucosa); F.V. (Fusão dos vilos); D.L.SM. (Dilatação linfática de submucosa)..... 36

Figura 14. Fotomicrografia do inglúvio de aves infectadas com estirpes mutantes (SE $\Delta motB$ e SE $\Delta fliC$) e selvagem de *S. Enteritidis* aos 5 dpi. (A) Inglúvio sem alterações de ave não desafiada; (B) Descamação epitelial e degeneração de camada muscular (seta preta) em ave desafiada com SE $\Delta motB$ (C) Degeneração da submucosa (seta preta) em ave desafiada com SE $\Delta fliC$ (D) Degeneração da submucosa e camada muscular (seta preta e vermelha, respectivamente) em ave desafiada com a estirpe selvagem de *S. Enteritidis*. Hematoxilina e eosina, objetiva 10x. 37

Figura 15. Fotomicrografia de fígado de aves infectadas com estirpes mutantes (SE $\Delta motB$ e SE $\Delta fliC$) e selvagem de *S. Enteritidis* em 5 dpi. (A) Fígado sem alterações de ave não desafiada; (B) Presença de

reatividade linfóide perivascular (seta preta) e em pontos multifocais no parênquima (setas verdes) e discreta congestão em aves desafiadas com SE $\Delta motB$; (C) Degeneração hepática severa com ausência de reatividade linfóide perivascular em aves desafiadas com SE $\Delta fliC$; (D) Degeneração hepática severa e presença de reatividade linfóide perivascular (seta preta) e discreta congestão em aves desafiadas com a estirpe selvagem de *S. Enteritidis*. Hematoxilina e eosina, objetiva 20x. 38

Figura 16. Fotomicrografia de íleo de aves infectadas com estirpes mutantes (SE $\Delta motB$ e SE $\Delta fliC$) e selvagem de *S. Enteritidis* em 5 dpi. (A) Ceco sem alterações de ave não desafiada; (B) Observar infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta preta) em ave desafiada com SE $\Delta motB$; (C) Ceco sem alterações de mucosa em ave desafiada com SE $\Delta fliC$; (D) Observar infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta preta) em ave desafiada com estirpe selvagem de *S. Enteritidis*. Hematoxilina e eosina, objetiva 10x. 39

Figura 17. Fotomicrografia de ceco de aves infectadas com estirpes mutantes (SE $\Delta motB$ e SE $\Delta fliC$) e selvagem de *S. Enteritidis* em 5 dpi. (A) Ceco sem alterações de ave não desafiada; (B) Observar infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta) em ave desafiada com SE $\Delta motB$; (C) Observar ausência de infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta) em ave desafiada com desafiada com SE $\Delta fliC$ e edema (asterisco); (D) Observar infiltrado inflamatório mononuclear difuso na mucosa de ave desafiada com estirpe selvagem de *S. Enteritidis* com fusão de vilos e discreto edema (asterisco). Hematoxilina e eosina, objetiva 10x. 40

1. INTRODUÇÃO

Salmonella spp. são bastonetes gram-negativos com metabolismo aeróbio facultativo, pertencentes à família Enterobacteriaceae e geralmente flagelados. *S. Gallinarum* (SG) e *S. Pullorum* (SP) são alguns dos poucos micro-organismos do gênero que não possuem flagelos. Ambos são específicos de aves e provocam doenças sistêmicas graves, o tifo aviário e a pulorose, respectivamente.

O paratifo aviário é causado por qualquer *Salmonella* que não seja SG e SP. Tais micro-organismos, denominados de salmonelas paratíficas, não possuem hospedeiros específicos e provocam quadro de inflamação intestinal, intensa colonização e excreção fecal intensa. As salmonelas paratíficas, incluindo *S. Typhimurium* (ST) e *S. Enteritidis* (SE) estão entre as principais causadoras de infecção alimentar em seres humanos.

É postulado que a presença de flagelos estaria associada à colonização intestinal e redução da severidade da infecção sistêmica. A estrutura flagelar, ao ser reconhecida por receptores do tipo TLR-5 nas células intestinais, estimularia forte resposta inflamatória local, culminando na eliminação do micro-organismo pelo sistema imune do hospedeiro. Por esta razão, SG e SP provocariam resposta inflamatória intestinal discreta, mas severa infecção sistêmica em aves.

A capacidade de colonizar o trato entérico e invadir o organismo do hospedeiro são fatores cruciais para o desencadeamento das salmoneloses. Neste contexto, o flagelo seria essencial, pois estaria diretamente associado a esse processo. Estudos foram realizados com intuito de associar a presença e ausência de flagelos e de motilidade com a patogenia das salmoneloses. No entanto, há uma variação de resultados conforme hospedeiro e sorovares estudados.

Com intuito de esclarecer se os flagelos e a motilidade de *Salmonella* Enteritidis (SE) estariam associados à patogenia do paratifo aviário, realizou-se o presente estudo. Para isso, aves de um dia de vida foram desafiadas com a estirpe selvagem e duas mutantes; uma não-móvel, mas flagelada (SE Δ motB) e outra aflagelada e imóvel (SE Δ fl/C). As propriedades das estirpes de

colonizar o intestino, realizar infecção sistêmica e provocar alterações nos órgãos das aves foram comparativamente avaliadas.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Salmonella enterica*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, no qual são identificados 2610 sorotipos (GUIBOURDENCHE et al., 2010). A espécie *enterica* (2.557 sorotipos) é subdividida em seis subspecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Os demais sorotipos pertencem a espécie *bongori* (GRIMONT; WEILL, 2007). Segundo o esquema descrito por Popoff et al. (1996), a nomenclatura correta para o gênero deve ter a primeira letra do nome do sorovar maiúscula e sem itálico, podendo ser escrito todo o nome da bactéria (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis) ou apenas o gênero e o sorotipo (*Salmonella* Enteritidis).

Os sorovares de *Salmonella* são diferenciados por meio da estrutura antigênica dos antígenos somáticos (O), capsulares (Vi) e flagelares (H), segundo esquema proposto por Kauffmann e White, que é baseado na hibridação DNA/DNA e em propriedades bioquímicas (HOLT et al., 1994). Os antígenos somáticos O são polissacarídeos termoestáveis constituintes da porção mais externa da parede bacteriana, comum a todos os sorovares do gênero *Salmonella* e são identificados por números arábicos (LE MINOR, 1984; HOLT et al., 1994). Sorogrupos (designados com letras maiúsculas) são organizados em grupos de acordo com antígenos somáticos. Os antígenos H são proteínas flagelares, conhecidas por flagelinas, encontradas nas enterobactérias móveis e designadas com letras minúsculas (fase 1) e por números arábicos (fase 2), codificadas pelos genes *fliC* e *fliB*, respectivamente (ECHEITA et al., 2002; FERREIRA; CAMPOS, 2008). A combinação dos antígenos O e H determinam o sorotipo. Portanto, *S. enterica* sorovar Enteritidis é classificada com base nos antígenos da sorotipagem da bactéria para identificar o antígeno somático (O:1,9,12) e antígeno flagelar de fase 1 (H: g,m) e fase 2 [1, 7] (BRENNER, et al., 2000; GRIMONT; WEILL, 2007).

Possuem formato de pequenos bacilos de 0,7 a 1,5 x 2,5 µm, são bactérias gram-negativas, não esporuladas, aeróbias ou anaeróbias

facultativas, sendo que a maioria possui flagelos peritríqueos. Desenvolvem-se bem à temperatura de 37 °C, formando colônias em torno de 2-4 mm de diâmetro, arredondadas, com bordas lisas, um pouco elevadas e brilhantes (HOLT et al., 1994).

São capazes de metabolizar nutrientes, produzir gás a partir da fermentação de glicose, não fermentam sacarose, malonato ou lactose. Produzem gás sulfídrico (H₂S) em sua maioria, utilizam citrato como fonte de carbono, reduzem nitrato a nitrito, não hidrolizam uréia, são oxidase negativa, catalase positiva e não produzem urease e indol. A maioria descarboxila lisina e ornitina, não desaminam os aminoácidos fenilalanina e triptofano (HOLT et al., 1994).

S. Enteritidis adapta-se a muitos hospedeiros e nas aves são responsáveis pelo paratifo aviário, podendo acometer várias espécies de aves (BERCHIERI; FREITAS NETO, 2009). Em seres humanos, a infecção alimentar causada por produtos avícolas contaminados com SE constitui em problema de saúde pública mundial.

1.2 *Salmonella* Enteritidis e Saúde Pública

Dentre as salmoneloses paratíficas, SE é um dos principais sorovares presentes nos surtos de infecções alimentares causados por *Salmonella* spp. Além do caráter zoonótico, contribui também para impactos econômicos negativos devido ao custo investigativo de vigilância, tratamento e prevenção da infecção (PUI et al., 2011).

Os principais alimentos implicados na transmissão são os ovos, carne de aves e seus derivados (WHO, 2010). A contaminação pode decorrer da presença da bactéria disseminada na carcaça de frango durante processamento na indústria, principalmente nas fases de escaldagem, depenagem, evisceração e refrigeração, além da recontaminação cruzada de ovos e produtos avícolas utilizados no consumo humano e outros fatores como o manuseio incorreto pelos consumidores na preparação do alimento (CARRASCO et al., 2012). Segundo Louis et al. (1988), 57% dos surtos de infecções alimentares por *Salmonella* Enteritidis são associados a alimentos

preparados com ovo, dentre estes, 20% relacionado ao consumo direto do próprio alimento.

Pessoas infectadas por *Salmonella* spp. geralmente apresentam febre, cefaleia, cólicas abdominais e diarreia entre 12 a 72 horas depois do consumo de alimentos ou bebidas contaminadas. A infecção persiste de quatro a sete dias e maioria se recuperam sem tratamento com antimicrobianos. Geralmente é mais grave em idosos, crianças, gestantes e imunodeprimidos, nos quais a infecção pode se disseminar através da corrente sanguínea para outros órgãos, exigindo o tratamento. Em casos mais graves, pode causar a morte (CDC, 2010).

Salmonella Enteritidis possivelmente chegou ao Brasil por meio de aves reprodutoras infectadas, provenientes da Europa na década de 80 (IRINO et al., 1996). Neste mesmo período, infecções humanas por SE aumentaram na América do Norte, América do Sul, Europa e África (SIMOES et al., 2010). Dados epidemiológicos atuais sobre a ocorrência e frequência dos diferentes sorovares de *Salmonella* que estão envolvidos nos surtos por infecções alimentares demonstram expressiva permanência no Brasil, porém segundo Scur et al. (2014), são subnotificados.

Estudos recentes demonstram a prevalência de SE entre as fontes de infecção de salmoneloses paratíficas no território brasileiro, representando 38,2% do total (SINAN net, 2014). Esse fato é coincidentes com pesquisa realizada no Estado do Paraná, em que SE correspondeu a 87,8 % das estirpes isoladas de pacientes, principalmente associado ao consumo de alimentos à base de ovos, carnes e derivados (KOTTWITZ et al., 2010). No Estado de São Paulo, entre 1995 e 2008, o mesmo sorovar foi o responsável por 58 % dos surtos em seres humanos, devido consumo de alimentos elaborados à base de ovo contaminados (SIMOES et al., 2010). Fato semelhante ocorreu nos Estados Unidos, em que foi observado aumento nos registros de surtos por SE, totalizando 3.578 casos quando o esperado para o período seria de 1.639 casos, evidenciando uma epidemia que ocorreu entre os meses de maio e novembro.

A redução de S. Enteritidis a partir dos anos 2000, em comparação aos outros sorovares paratíficos pode ser consequência dos programas governamentais implementados na indústria avícola, somadas às medidas de

biossegurança e vacinação dos plantéis (VOSS-RECH et al., 2015). No entanto, ainda em 2014, a partir de 155 isolados de campo, o sorovar SE foi o segundo mais identificado (34,2 %) principalmente em pintos de um dia (PULIDO-LANDINEZ et al., 2013). Apesar da redução da prevalência, SE está presente nos plantéis e há o risco da infecção dos lotes e consequente contaminação de produtos avícolas, ressaltando a importância em saúde pública (BARROW, 2000).

1.3 *Salmonella* Enteritidis e avicultura

As salmoneloses aviárias ocorrem em três enfermidades distintas: a pulorose, cujo agente é *S. Pullorum*, o tifo aviário, causado por *S. Gallinarum* e o paratifo aviário, causado por qualquer *Salmonella* que não seja os biovars citados. A Pulorose e Tifo Aviário são doenças adaptadas às aves, porém o Paratifo Aviário não possui hospedeiro específico (BERCHIERI; FREITAS NETO, 2009).

SE é caracterizada por eficiente colonização intestinal, excreção fecal e manifestação de infecção sistêmica envolvendo o sistema reticuloendotelial (GAST et al., 2008). Em aves jovens provoca quadro semelhante à pulorose, mas com intensa colonização intestinal, inflamação e elevada excreção fecal. A ocorrência é incomum entre aves adultas e raramente há mortalidade em aves com mais de um mês de idade (SUZUKI, 1994), mas pode ocorrer e ser confundida com outras salmoneloses ou outras enfermidades bacterianas (BERCHIERI; FREITAS NETO, 2009).

A erradicação de *Salmonella* spp. dos plantéis avícolas é impraticável devido às várias fontes de infecção e facilidade de disseminação da bactéria entre diversas espécies de aves e mamíferos (ANDREATTI et al., 2009).

A transmissão pode ocorrer de forma horizontal ou vertical. As aves infectadas transmitem *Salmonella* spp. por meio da via horizontal, contaminação de fezes, água, poeira, fômites e contato com animais domésticos, aves silvestres e outros seres vivos. A transmissão vertical ocorre quando os folículos ovarianos estão infectados com a bactéria, atingindo os ovos em desenvolvimento no oviduto (POPPE, 2000). A principal forma seria o contato direto das fezes com a casca do ovo durante passagem pela cloaca ou

contato no meio ambiente com material contaminado. Durante este processo, a penetração de bactérias é favorecida pela pressão negativa formada pela diferença de temperatura entre o ambiente e ovo pós-eclosão (MESSENS, 2005).

A maioria das infecções por *Salmonella* spp. em aves se iniciam pela via oral. Após ingestão desses micro-organismos, há migração pelo trato alimentar, interagindo com a superfície da mucosa das placas de Peyer, células M do íleo e célula dendríticas presentes no lúmen, com consequente adesão e penetração nas células epiteliais intestinais (SUZUKI, 1994). As bactérias alcançam a submucosa e são internalizadas pelos macrófagos locais e rapidamente disseminam por meio da corrente sanguínea, invadindo, sobrevivendo e multiplicando em órgãos internos (SUZUKI, 1994; SALCEDO et al., 2001).

As lesões aparecem a partir do quarto dia pós-infecção, observando-se apatia, penas arrepiadas, asas caídas, amontoamento e diarreia. A partir de 14 dias de idade, os sinais são discretos, podendo ocorrer retardo no crescimento e ocasionalmente mortalidade. Em poedeiras é observada a queda de postura. Os cecos apresentam inicialmente diminuição de volume, espessamento de parede e conteúdo líquido que se torna caseoso de coloração branca a branco-amarelada, podendo conter partes avermelhadas ou enegrecidas. Baço e fígado se tornam congestos, edemaciados com hemorragias e pontos necróticos. Os rins congestos e aumentados. Hepatite e pericardite fibrino-purulenta podem ser observadas. Os pintinhos possuem gema não reabsorvida, coagulada, necrótica e caseosa. Outras alterações, menos comuns, seriam panoftalmia artrite purulenta, aerosaculite e onfalite. Aves adultas podem apresentar atrofia de ovário, folículos alterados (murchos, hemorrágicos e caseosos), morbidade e mortalidade (BERCHIERI; FREITAS NETO, 2009).

Entre as alterações microscópicas pode-se citar, na forma superaguda, uma congestão vascular em vários órgãos como fígado, baço e rins. Na forma aguda e sub-aguda, há pontos necróticos no fígado, congestão renal e nos cecos de aves jovens há extensa necrose da mucosa e submucosa com o lúmen contendo debris celulares necrosados, misturado com fibrina e heterófilos (BERCHIERI; FREITAS NETO, 2009).

1.4 Fase intestinal e sistêmica do paratifo aviário

Salmoneloses paratíficas causam duas formas de doença: gastroenterite e infecção sistêmica (MARCUS et al., 2000). O local de colonização primária de *Salmonella* spp em aves é o ceco (ALLEN-VERCOE; WOODWARD, 1999) e em seres humanos o íleo e cólon (AHMER; GUNN, 2011). Inicialmente, ocorre multiplicação no lúmen intestinal e adaptação da expressão gênica para o novo ambiente, dessa forma *Salmonella* adere às células epiteliais intestinais com auxílio de diferentes adesinas fimbriais ou não-fimbriais (RICHLYK; ELSHEIMER-MATULOVA; KYROVA, 2014).

Salmonella spp possuem ilhas de patogenicidade (*Salmonella* Pathogenicity Island-SPI), grandes regiões do cromossomo que codificam vários fatores de virulência (FOLEY et al., 2013). O Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3), codificado pela ilha de patogenicidade do tipo 1 (SPI-1), expressa estruturas bacterianas complexas que fornecem aos patógenos gram-negativos um mecanismo de virulência único, que permite a injeção de proteínas efetoras bacterianas diretamente no citoplasma da célula hospedeira, ignorando o meio extracelular (COBURN; SEKIROV; FINLAY, 2007).

As proteínas efetoras interagem com domínios de proteínas e desencadeiam série de reações, induzindo o rearranjo do citoesqueleto de actina da célula hospedeira, que facilita a captação de vacúolos contendo *Salmonella* spp. (GALAN, 2001). Após invasão, as bactérias permanecem dentro de um fagossomo modificado denominado vacúolo contendo *Salmonella*, dentro do qual sobrevivem e se replicam (STEELE-MORTIMER, 2008). Outro papel de SPI- 1 está associado à expressão de proteínas responsáveis pela produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no epitélio intestinal, que leva a infiltração de leucócitos polimorfonucleares mediados por IL-8, e um segundo grupo de proteínas efetoras causa sintomas clínicos como diarreia no hospedeiro (HENSEL, 2004).

Durante o processo de ataque e internalização, PAMPs (Padrão Molecular Associado à Patógenos) como a flagelina e LPS (lipopolissacarídeos) ativam o sistema imune do hospedeiro quando são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), entre

eles, receptores do tipo Toll (*Toll Like Receptores* - TLR) (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; YANG et al., 2012). Os TLRs são moléculas transmembranas com duas porções, uma externa, particular para cada TLR, responsável pelo reconhecimento dos PAMPs, e uma cauda intracelular para reconhecimento do receptor para a interleucina (IL-1 β) (GAY; KAITH, 1991). A flagelina é detectada pelos TLR-5 e irá ativar genes da resposta inflamatória via Myd88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), estimulando, inicialmente, NF-kB e fatores responsivos a IFN (Interferon), culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo 1 (YAMAMOTO; TAKEDA; AKIRA, 2004; BUZZO et al., 2010).

Outra família de receptores para padrões moleculares são os do tipo NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain*) que reconhecem a flagelina no citoplasma (LEE; KIM, 2007). Em seguida, ativam a enzima caspase-1, culminando na produção de IL-1 β e IL-18 (BUZZO et al., 2010)

Uma vez internalizada, *Salmonella* expressa um segundo tipo de SST3 codificado na ilha de patogenicidade do tipo 2 (SPI-2), que auxilia no processo de infecção sistêmica e patogenicidade intracelular (HENSEL, 2000). SPI-2 está ligada à habilidade de *Salmonella* sobreviver nas células fagocíticas e replicar-se dentro de vesículas nas células eucarióticas, além de inibir atividade antimicrobiana pela prevenção da fusão de lisossomos com o vacúolo fagocítico e pela modulação de MHC e expressão de citocinas que culmina com atração de macrófagos para o local (CHAPPELL et al., 2009). Em seguida, as bactérias são fagocitadas por macrófagos não ativados, sendo então transportados para o fígado e o baço, iniciando a infecção sistêmica (MONACK et al., 2000).

A translocação de proteínas efetoras de SPI-1 dentro de macrófagos pode induzir a formação rápida de um processo apoptótico. A proteína SipB codificada pela SPI-1 está envolvida na apoptose do macrófago pela ativação da caspase-1, a qual cliva a pró-IL-1B e pró-IL-18, precursores de citocinas pró-inflamatórias e na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-8. Este processo permite a saída do micro-organismo do macrófago e o retorno para o lúmen intestinal e posterior eliminação pelas fezes (CHAPPELL et al., 2009).

Um segundo subgrupo de proteínas efetoras de SPI-1 causa influxo de células polimorfonucleares para a mucosa infectada, induzindo diarreia aquosa que pode conter sangue (WALLIS; GALYON, 2000).

1.5 Estrutura do flagelo – genes *fliC* e *motB*

A construção e execução de função flagelar em *Salmonella* spp. envolve mais de 50 genes (MACNAB, 1992). O flagelo bacteriano, nanoestrutura capaz de auto-montagem, permite à bactéria se movimentar no ambiente, semelhante em gram-negativas e gram-positivas, exceto pelas primeiras possuírem uma segunda membrana (CHEVANCE; HUGHES, 2008).

O flagelo é projetado para o lado externo da célula por meio da membrana plasmática, podendo atuar como propulsor mecânico, conferindo mobilidade e auxiliando o processo de adesão e invasão das células do hospedeiro (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004). Além disso, contribui para outros comportamentos bacterianos como exportação de proteínas, quimiotaxia e são potentes imunógenos, capazes de estimular o sistema imune (YANG et al., 2012). Em gram-negativas, é composto por três regiões: o corpo basal que atua como motor flagelar, o gancho que conecta filamento e corpo basal, e o filamento que rotaciona promovendo a propulsão (MACNAB, 2003; MORIMOTO et al., 2013).

O corpo basal rotaciona o flagelo bacteriano, que é constituído por uma haste que atravessa o espaço periplasmático e muitos anéis. Alguns destes compõem o motor flagelar, dividido em estator (complexo Mot), o rotor (anel C, anel MS e haste) e os anéis L e P que são externos (Figura 1). As proteínas Mot, podem conter até uma dúzia de unidades que cercam cada corpo basal atuando na geração do torque (MACNAB, 2003; REID et al., 2006). Dessa forma, a rotação do flagelo é acionada pelo motor na sua base e o torque (força que tende a rodar) é gerado pela interação motor-estator, juntamente com o fluxo de íons H^+ através do canal no estator (KOJIMA, 2015).

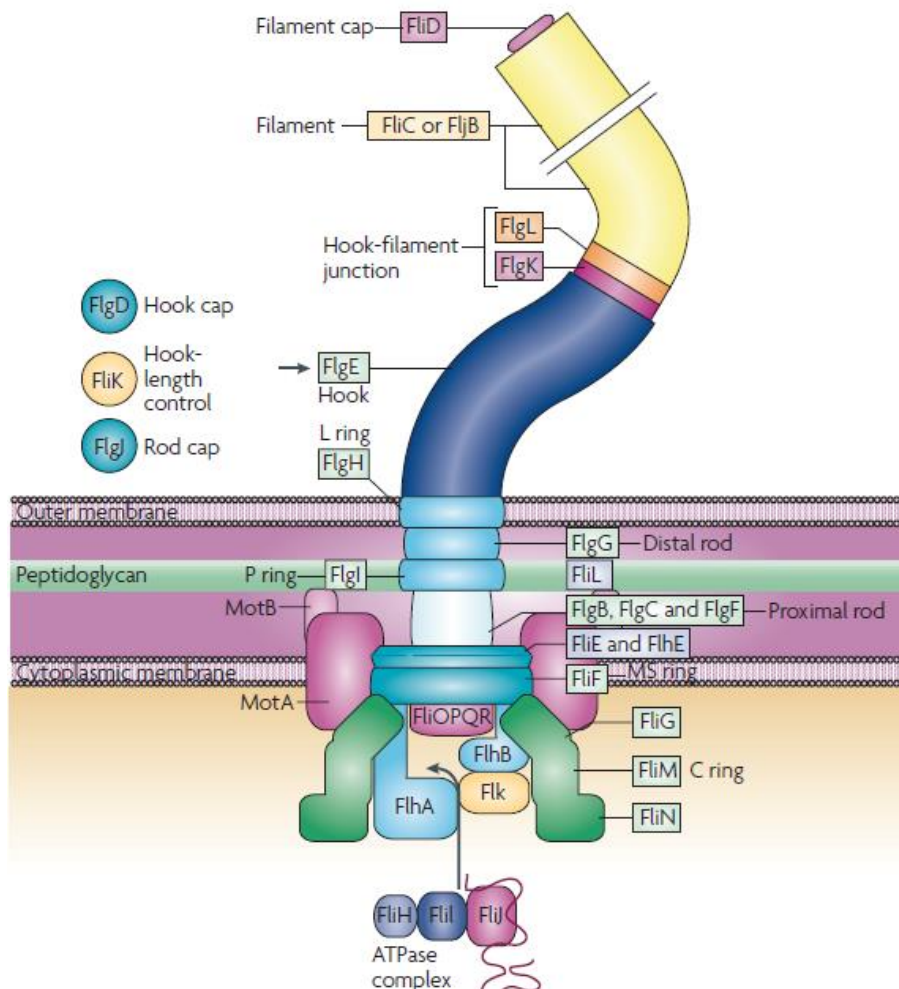


Figura 1. Ilustração de um flagelo de *Salmonella* spp. com as principais proteínas que o constituem. Fonte: Chevance e Hughes (2008)

A energia para movimentação do flagelo provém do complexo Mot, composto pelas proteínas MotA e MotB, nos quais estão inseridas na membrana citoplasmática e formam a unidade de geração da força do motor flagelar em *Salmonella* spp. e outras bactérias. Porém a energia necessária para rotação do flagelo é oriunda da força-próton-motiva (*PMF- proton motive force*) ao invés da molécula de adenosina tri-fosfato (ATP). Este movimento de prótons através da membrana citoplasmática promove a rotação do flagelo, o qual opera tanto no sentido horário quanto anti-horário (BERG, 2003; SOWA; BERRY, 2008). Cinco proteínas flagelares -MotA, MotB, FliG, FliM e FliN, são responsáveis por esse processo, sendo FliG, FliM, e FliN responsáveis pela alteração de sentido de rotação do motor (MINAMINO; IMADA, 2015). Além disso, a velocidade de rotação flagelar está diretamente relacionada à PMF atuante em MotB e MotA (WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2009)

A sequência MotA contém 295 aminoácidos, composta por quatro domínios transmembranares enquanto que MotB contém 309 aminoácidos e dois domínios transmembranares (Figura 2) (MURAMOTO; MACNAB, 1998). O complexo Mot está ancorado na camada de peptidoglicano por meio do domínio periplasmático de MotB (PGB), que ancora o estator a um local apropriado no motor (KOJIMA et al., 2009). Esta proteína composta pode ser subdividida em três partes: um pequeno segmento N-terminal citoplasmático, uma hélice transmembrânica e uma grande região C-terminal periplasmática.

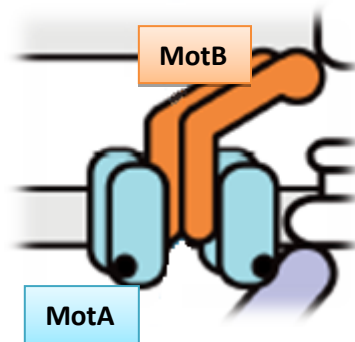


Figura 2. Ilustração das proteínas que constituem o motor flagelar (MotA: azul; MotB: laranja). Fonte: Adaptado de Morimoto e Minamino (2014).

Em *Salmonella* são contabilizados de 6 a 10 flagelos peritriques distribuídos em torno da bactéria (AIZAWA, 1996). O principal componente desta estrutura são os monômeros de flagelina, proteína codificada pelo gene *fliC* e constituída por 494 aminoácidos (SAMATEY, et al.; 2001). A organização dos monômeros culminam em longa estrutura helicoidal composta por 11 protofilamentos de 15 μm de comprimento, mas com apenas 15-250 Å de diâmetro (YONEKURA; YONEKURA; NAMBA, 2003).

A estrutura da flagelina é constituída por domínios, identificados de D0 a D3 (REICHHART, 2003). Estes constituem o monômero em duas regiões terminais conservadas (N e C terminal) que flanqueiam região central hipervariável, com tamanho e composição modificáveis (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004). Os domínios D0 e D1 são regiões terminais em estrutura α -hélice, enquanto que as regiões variáveis D2 e D3 são β -pregueadas e se localizam na região central, que é exposta sobre a superfície do flagelo e responsável pela interação antígeno-anticorpo (YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2003).

A síntese flagelar em *Salmonella Typhimurium* apresenta um mecanismo de alternância de fase em que ocorre a expressão de dois genes responsáveis por codificar a flagelina, o *fliC* (fase 1) ou *fljB*(fase 2). Esta variação é realizada por um promotor H produtor tanto da flagelina (*FljB*) quanto de um inibidor (*FljA*) de formação de flagelina proveniente do gene *fliC*. Essa recombinação é mediada pela DNA invertase, cujo gene *hin* está localizado dentro do segmento H, e este adjacente à *fljA/fljB*. A síntese da flagelina de fase 2 ocorre quando ambos os genes *fljB* e *fljA* são transcritos. Por meio de um mecanismo pós transcricional do gene H, *fljB* e *fljA* não são expressos permitindo a expressão de *fliC*. A Figura 3 ilustra este processo. A variação de fase flagelar possivelmente ocorre como evasão do sistema imune do hospedeiro, mas esse mecanismo não é bem compreendido (BONIFIELD; HUGHES, 2003; ALDRIDGE et al.; 2006).

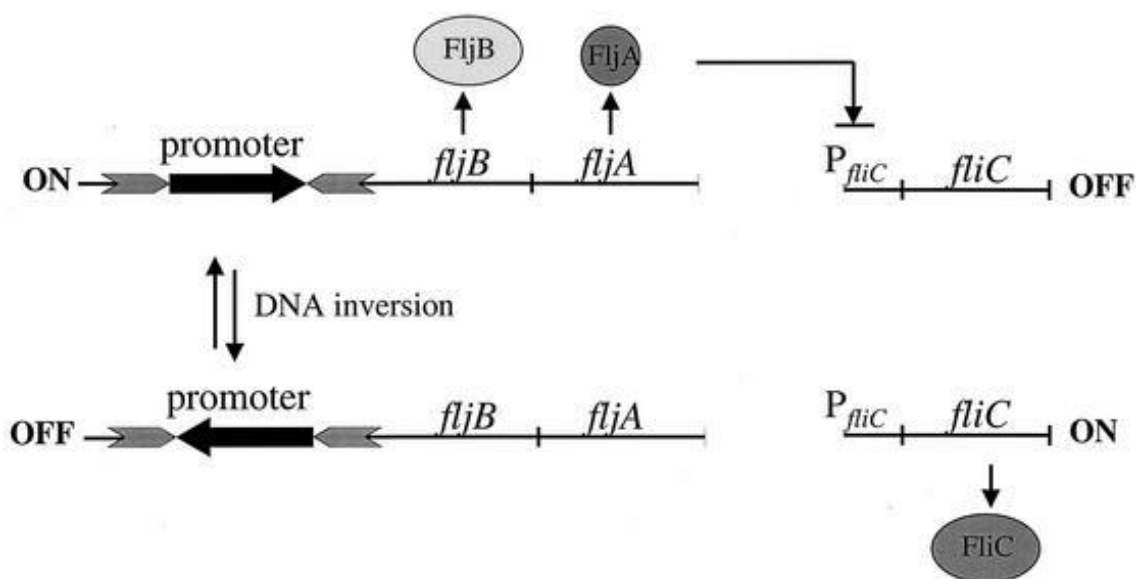


Figura 3. Esquema da regulação dos genes responsáveis pela produção do flagelo. Fonte: Bonifield e Hugues (2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a importância do flagelo e da motilidade de SE para colonização intestinal e invasão sistêmica em aves para postura comercial.

3.2 Específicos

3.2.1. Construir por métodos moleculares dois mutantes, o primeiro aflagelado, com deleção do gene *fliC* (SE $\Delta fliC$), e o segundo flagelado, porém imóvel com deleção do gene *motB* (SE $\Delta motB$).

3.2.2. Avaliar a excreção fecal, mortalidade e colonização intestinal dos mutantes SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta motB$ em aves de linhagem semipesada para postura comercial em comparação com a estirpe selvagem.

3.2.3. Avaliar a capacidade de invasão sistêmica dos dois mutantes (SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta motB$), em aves de linhagem semipesada para postura comercial em comparação com a estirpe selvagem.

3.2.4. Avaliar lesões macro e microscópicas observadas em inglúvio, fígado, íleo e ceco induzidas por dois mutantes (SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta motB$), em aves de linhagem semipesada para postura comercial em comparação com a estirpe selvagem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias e preparo dos mutantes

Para a construção das mutantes foi utilizada a estirpe *Salmonella* Enteritidis P125109 (SE^{NaI}). A bactéria possui resistência ao ácido nalidíxico e foi inicialmente isolada de aves, doada pelo Dr. Paul Barrow (Universidade de Nottingham) para o Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Jaboticabal.

Para a construção das estirpes mutantes SE^{NaI} Δ *motB* e SE^{NaI} Δ *fliC*, inicialmente deletou-se os genes *motB* e *fliC* utilizando-se a técnica *Lambda-red* (DATSENKO; WANNER, 2000). Nessa técnica, as células de SE^{NaI} recebem o plasmídeo pKD46 por eletroporação, tornando-se competentes para recombinação de fragmentos de DNA. Após a eletroporação, o caldo é semeado em placa de Petri contendo ágar Luria-Bertani (LB) (Difco™ LB Agar Lennox, 240110, Sparks, Nevada, US) e antibiótico ampicilina na concentração 100 µg/mL e incubado a 28 °C por 24h. As colônias presentes na placa sugerem inserção do plasmídeo pKD46. A eletroporação é um método utilizado para introdução de moléculas em células através de pulsos elétricos. Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes alvo (*motB* e *fliC*), foram construídos com a técnica de reação em polimerase (PCR), utilizando iniciadores de mutagênese e o plasmídeo pKD3, o qual confere resistência ao cloranfenicol (Cl^r). Após eletroporação para inserção do plasmídeo pKD3 em SE+pKD46, o caldo foi semeado em placas de Petri contendo ágar LB e antibiótico cloranfenicol na concentração de 20 µg/mL. As colônias presentes na placa de Petri foram selecionadas e realizadas confirmação da inserção do fragmento por PCR. Todos os plasmídeos utilizados foram extraídos com auxílio do kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Austrália), e as informações técnicas dos plasmídeos estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Plasmídios utilizados nesse trabalho

Plasmídeos	Descrição	Referência
pKD46	Amp ^r , contém genes constituintes do sistema de recombinação λ Red.	Datsenko e Wanner (2000)
pKD3	Amp ^r , Cl ^I , plasmídio molde para construção do cassete de recombinação	Datsenko e Wanner (2000)
pCP20	Amp ^r , Cl ^I , plasmídio que codifica a recombinase FLP	Datsenko e Wanner (2000)

A técnica do *Lambda-Red* pode, ocasionalmente, levar a recombinação dos fragmentos de DNA em outras partes do cromossomo bacteriano além da região alvo. Por isso, adotou-se a técnica de transdução com o bacteriófago Φ P22 (vide item 5.2.4.) para corrigir possíveis mutações secundárias dos mutantes SE Δ *motB* e SE Δ *fliC*. A retirada do gene de resistência ao cloranfenicol é realizada por meio da eletroporação do plasmídio pCP20. A região não codificadora da sequência do cassete Cl^I possui sítios de restrição para a enzima *FLP-recombinase*, a qual é sintetizada pelo pCP20.

4.2 Escolha da sequência alvo e construção dos iniciadores

Para inativação dos genes *motB* e *fliC*, selecionou-se as primeiras 50 bases nitrogenadas da sequência alvo e as últimas 50 da fita complementar. A sequência das 50 primeiras bases juntamente com 20 bases da sequência do cassete do antibiótico (sequência que antecede o código de início do cassete) formaram o iniciador direto de mutagênese. As 50 últimas bases da fita complementar e 20 bases da fita complementar do cassete do antibiótico (sequência posterior ao código de parada) formaram o iniciador reverso de mutagênese. Iniciadores direto e reverso (denominados de controle), utilizados para verificação da correta inserção dos cassetes, foram construídos tendo como alvo as sequências anterior e posterior ao local de inserção dos cassetes. Também com o objetivo de verificar a inserção dos cassetes, foram construídos iniciadores direto (C2) e reverso (C1), tendo como alvo a sequência central dos cassetes de cloranfenicol. Para construção dos iniciadores foram utilizados os softwares CLC *sequence viewer* 6.3 (CLC BIO), Artemis v11 (CARVER et al., 2005) e Primer premier 5 (PREMIER BIOSOFT

INTERNATIONAL). A Tabela 2 contém as sequências dos iniciadores utilizados.

Tabela 2. Iniciadores utilizados neste estudo

Número	Iniciadores	Sequência (5'-3')
1	motB F*	tgccgtggaatttggtcgta
2	motB R*	atccagagttgccgacagtg
3	motB 75F**	atgaaaaatcaggctcatcccattgtcgtcgtaaaacgccgaggcacaaccgc acggcggcggggcgcgtgtaggctggagctgcttc
4	motB 75R**	tcacctcgggtccgcttttggcgatgtgggtacgcttgccggcggggctgccgagg ctgttgaatacacttacatatgaatacctccttag
5	fliC_ctr F*	gttatcggcaatctggaagc
6	fliC_ctrR*	ggtgacaaaggcagggttcag
7	fliC50 F*	gatacaagggttacggtgagaaaccgtgggcaacagcccaataagtgtaggctg gagctgctt
8	fliC50R*	cttcgctgccttgattgtgtaccacgtgctcggtgaatcaatgccggaatatgaata tcctccttag
9	C1	ttatacgcaaggcgacaagg
10	C2	gatcttccgtcacaggtagg

*iniciadores utilizados para verificação da inserção dos marcadores de antibióticos

** iniciadores utilizados para produção de fragmento de DNA recombinante

4.2.1 A amplificação dos fragmentos de DNA recombinante

A amplificação dos fragmentos de DNA recombinante foi realizada por meio da PCR convencional, a solução consistia de: 34,2 µL de água ultrapura, 5 µL de 10X Tampão para PCR, 1,8 µL de MgCl₂ 50 mM ; 5 µL de dNTP 2 mM, 0,5 µL de iniciador de mutagênese 1; 0,5 µL de iniciador de mutagênese 2, 1 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 1 µL de DNA plasmidial.

Foi utilizando um termociclador convencional (BIO-RAD, MyCycler) com a seguinte programação: um ciclo de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 68 °C por 120 s; um ciclo final de alongação de 68 °C por 7 min e o resfriamento da amostra a 4 °C por 30 min.

4.2.2 Precipitação dos fragmentos de DNA recombinantes

Os produtos da PCR de cada fragmento (total 250 μ L por fragmento) foram colocados em microtubos de 2 mL e precipitados utilizando-se o kit comercial *Silica Bead DNA Gel Extraction* (ThermoScientific, K0513, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi então suspenso em 20 μ L de água ultrapura (SIGMA, W4502, EUA) e armazenamento a -20°C até o momento da eletroporação.

4.2.3 Eletroporação

Para a eletroporação, utilizou-se uma mistura contendo 20 μ L de uma suspensão de SENal^r (aproximadamente 1×10^9 bactérias) e 2 μ L da solução contendo DNA (plasmidial ou fragmentos de DNA recombinante). A eletroporação foi realizada em eletroporador Gene Pulser Xcell (BIO-RAD), utilizando-se cubetas de 2 mm de largura, voltagem de 2,5 kV, capacitância de 25 μ F e resistência de 200 m Ω . O mesmo procedimento foi realizado para as estirpes mutantes.

4.2.4 Transdução

O preparo das mutantes (*SE Δ motB* e *SE Δ fliC*) foi finalizado empregando-se a técnica de transdução com o bacteriófago Φ P22 (WING, 1968; SAMBROOK e RUSSEL, 2001), multiplicado na estirpe SENal^r. Preparou-se a cultura de SENal^r em caldo Luria-Bertani (LB) (DifcoTM LB Broth Lennox, 240230, Sparks, Nevada, US) incubado a 37°C por 24 h em agitação. Dessa cultura, contendo aproximadamente $1,8 \times 10^9$ UFC/mL, transferiu-se 1 mL para tubo contendo 10 mL de caldo LB, juntamente com 1 mL de uma solução de bacteriófago, contendo cerca de $1,0 \times 10^{10}$ Φ P22/mL. Após incubação a 37°C por 24 h em agitação, centrifugou-se a cultura a 4000 g por 20 min a 4°C . O sobrenadante foi filtrado (filtro Millipore 0,45 μ m) e procedeu-se a contagem em ágar LB com camada de SENal^r.

As estirpes SE $\Delta motB$ e SE $\Delta fliC$ foram cultivadas em 10mL de caldo LB com incubação a 37°C por 24h estaticamente. As culturas apresentaram a contagem de $1,4 \times 10^9$ UFC/mL e $2,8 \times 10^9$ UFC/mL, respectivamente. A essas culturas adicionou-se a solução do bacteriófago ØP22 na proporção de 0,03ØP22 /1 bactéria. A mistura foi incubada a 37°C por 24h em agitação. A seguir, centrifugou-se o cultivo a 4000 g por 20 min a 4 °C, filtrou-se o sobrenadante (filtro Millipore 0,45 µm) e procedeu-se à contagem das placas de lise do ØP22 em ágar LB com camada de SENal^r. Posteriormente, a solução de bacteriófago cultivada em cada estirpe foi adicionada à cultura da bactéria receptora seguindo-se a proporção de 0,8 ØP22/1 bactéria. Para a obtenção de bactérias em quantidade desejável, a cultura (10 mL de caldo LB) foi centrifugada a 4000 g a 4°C por 20 min e o sedimento ressuspendido em 1 mL de caldo LB. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min estaticamente e depois espalhada em placas de ágar LB contendo cloranfenicol na concentração de 20 µg/mL, que foram incubadas a 37 °C por 24 h. As colônias foram ainda submetidas à técnica da PCR para confirmação dos resultados.

4.2.5 Verificação da mutação nas estirpes de *Salmonella* spp.

A verificação da mutação nas estirpes de *Salmonella* spp. foi realizada pela PCR das regiões do genoma onde os cassetes foram inseridos. Para cálculo do peso molecular dos *amplicons*, foram utilizados os softwares Artemis v11 (CARVER et al., 2005) e CLC *sequence viewer* 6.3 (CLC BIO). O DNA genômico das estirpes mutantes foi extraído pelo método de fervura. A PCR foi realizada com três combinações de iniciadores: Direto controle + reverso controle, direto controle + C1 e reverso controle + C2. As concentrações de reagentes utilizadas para a amplificação dos fragmentos de DNA consistia de: 16 µL de água ultrapura; 2,5 µL de 10X Tampão para PCR; 1 µL de MgCl₂ 50 mM; 1 µL de dNTP 10 mM; 1 µL de iniciador 1; 1µL de iniciador 2; 0,5 µL de Taq DNA polimerase (500U) e 1 µL de DNA.

A PCR foi realizada em termociclador convencional (BIO-RAD, MyCycler) com a seguinte programação: um ciclo de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 20 s, 62 °C por 30 s e 72 °C por 120 s; um ciclo final de alongação de 72 °C por 5 min e o resfriamento da amostra a 4 °C por 30 min.

Amostras dos *amplicons* foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação dos pesos moleculares (Aparelho: *Consort E863*, 600 V 250 mA, cuba *Horizon 11-14 CE*, *Life Technology*). Utilizou-se 30 mL de gel composto por agarose a 1%, diluída em solução tampão TAE (4,84 g de TRIS base, 1 mL de ácido acético glacial, 2 mL de EDTA 0,5 M e H₂O qsp 1000mL, pH 8,0). Nas amostras, juntamente com o marcador de tamanho molecular (1 µL de GeneRuler, 1 kb DNA *Ladder*, 1 µL de solução corante), foi acrescentado 1 µL de solução *GelRed* (Biotium) e submetidos a uma corrente elétrica de 40 V por 2 h. O gel foi colocado sob luz ultravioleta e fotografado para visualização das bandas.

4.2.6 Detecção de motilidade

As estirpes *SEΔmotB*, *SEΔfliC* e *SENaI^f* foram inoculadas em ágar semisólido contendo solução a 0,9 % de caldo infusão de coração (Oxoid: CM1032) e 0,25 % de ágar LB (Difco, US). Colônias foram inoculadas em ágar semisólido com auxílio de estilete e incubadas a 28 °C por 24h.

4.2.7 Sorologia

A presença de flagelo em *SEΔmotB* e *SENaI^f* foram avaliadas por meio do teste de aglutinação utilizando colônias incubadas por 18 h em ágar LB (Difco, US) e utilizado lâmina de vidro para observar a reação contra o antígeno flagelar “g” e “m” (Remel, Dartford, UK).

4.3 Experimentos *in vivo*

Foram realizados dois experimentos *in vivo* utilizando aves de postura comercial. No primeiro foi avaliada a excreção fecal e mortalidade induzida pelos mutantes *SEΔfliC* e *SEΔmotB* em comparação com a estirpe selvagem. No segundo avaliação da infecção sistêmica e colonização intestinal das estirpes acima mencionadas.

4.3.1. Aves experimentais

Foram utilizadas 171 machos de uma linhagem semipesada para postura comercial, com um dia de vida. As aves foram alojadas em baterias em ambiente climatizado, recebendo água e ração *ad libitum*.

No momento da chegada dos animais, foram colhidas amostras de mecônio do interior das caixas para pesquisa de *Salmonella* spp. de acordo com metodologia descrita por Zancan et al. (2000). Os suabes foram colocados em frascos contendo caldo selenito (Selenite Broth Base, CM0395, Oxoid, US) com 0,04 % de novobiocina (SN). Após incubação a 37 °C por 18 horas, placas contendo ágar verde brilhante (VB - Brilhante Green Agar, Oxoid, CM0263, US) foram semeadas por método de esgotamento a partir do caldo SN. Essas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e posteriormente analisadas para identificação de colônia sugestiva de *Salmonella* spp.

4.3.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado como descrito por Berchieri et al. (2001). A partir de uma colônia do ágar LB (Difco, US), foi feita uma cultura em caldo LB (Difco, US) para cada uma das estirpes a serem inoculadas (selvagem e mutantes). A colônia levemente tocada com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril foi inoculada em 10 mL de caldo LB (Difco, US) e incubada a 37 °C por 24 h sob agitação constante. A contagem do inóculo foi feita por meio de diluição seriada em solução salina 0,85 %. Cada diluição com 100 µL foram despejados em ágar verde brilhante (Oxoid, US) e posteriormente incubado à 37 °C por 24 h para contagem das UFC/mL.

4.4 Experimento 01: Avaliação da excreção fecal e mortalidade

Foram adquiridos 45 machos de linhagem semipesada para postura comercial, com um dia de vida, instalados em baterias contendo água e ração *ad libitum*, divididos em três grupos com quinze animais em cada. No primeiro grupo, as aves foram infectadas com a estirpe SE Δ *motB*, no segundo com a estirpe mutante SE Δ *fliC*, e no terceiro, infecção com estirpe selvagem. No

primeiro dia de vida, as aves receberam 0,1mL de cultura microbiana preparada em caldo LB por 24 h a 37 °C em agitação (contendo aproximadamente 1×10^9 UFC/mL) por gavagem. As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se a mortalidade e procedendo-se à pesquisa da excreção fecal de SE por meio da colheita de fezes cloacais com suabes estéreis de algodão, duas vezes por semana. Os suabes foram colocados em tubos contendo 2 mL de caldo SN e após agitação, semeados em ágar VB Nal^f. Os tubos e as placas foram incubados à 37 °C por 24 horas.

4.5 Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica

Para esse estudos foram adquiridos 105 machos de linhagem semipesada para postura comercial, com um dia de vida, divididos em três grupos de trinta animais cada. No primeiro grupo, as aves foram infectadas com a estirpe mutante *SE Δ motB*, no segundo com a estirpe mutante *SE Δ fliC*, e as do terceiro grupo infectadas com estirpe selvagem. Foram utilizados 21 machos como controle negativo da infecção, que foram alojados em outra sala nas mesmas condições. A avaliação da infecção sistêmica foi feita observando-se os sinais clínicos, lesões macroscópicas nos órgãos e contagem bacteriana no fígado, baço e conteúdo cecal dos animais. Os pintinhos foram infectados com 0,1 mL de cultura da estirpe selvagem e das estirpes mutantes (*SE Δ fliC* e *SE Δ motB*), preparadas em caldo LB e incubadas à 37 °C por 24 h sob agitação (contendo aproximadamente 2×10^8 UFC/mL). A inoculação foi realizada por gavagem, no primeiro dia de vida. As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se a mortalidade.

Para a avaliação da infecção sistêmica, foram eutanasiadas nos dias dois, três, cinco, sete, 14, 21 e 28 pós-infecção (dpi), cinco aves de cada grupo, para a estimativa de *Salmonella* Enteritidis em baço, fígado e conteúdo cecal.

As amostras colhidas foram armazenadas em solução salina tamponada pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10, baço e fígado macerados e o conteúdo cecal homogeneizado, em seguida realizará à diluição seriada decimalmente em PBS. De cada diluição foi retirado 0,1 mL, espalhando em placas contendo VB Nal^f. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 h. O número de colônias por grama de órgão foi convertido em \log^{10} para análise dos resultados. Na

ausência de colônias, aos respectivos frascos contendo as amostras homogeneizadas em PBS (1:10), foi adicionado igual volume de SN, preparado em concentração dupla e incubado à 37 °C por 24 h que em seguida, foi semeado em VB NaI^f, com incubação à 37 °C por 24 h.

4.5.1. Avaliação macro e microscópica

Após a eutanásia, as mesmas aves foram submetidas à necropsia para avaliar as alterações macroscópicas. Para as lesões microscópicas, foram realizados exames histopatológicos por meio de colheita de fragmentos de fígado, ceco e íleo nos dias dois, três, cinco, sete, 14, 21 e 28 após a infecção (dpi). O mesmo foi realizado com três aves do grupo controle negativo.

As amostras foram colocadas em formaldeído tamponado a 4%, (pH - 7,2), na proporção de 20:1 (solução de formaldeído: fragmento de órgãos), e armazenadas pelo tempo mínimo de 24 horas.

Os fragmentos de corte histológico possuíam 4 µm de espessura, os quais foram em seguida, corados segundo a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) (TOLOSA et al., 2003). A análise histológica foi realizada utilizando-se um microscópio de luz (NICKON E200) equipado com câmera digital (COOLPIX 5400)

4.6 Forma de análise dos resultados.

Os dados relativos à mortalidade e excreção fecal foram analisados pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$) (GREENWOOD; NIKULIN, 1996). O teste de comparação múltipla de Tukey foi utilizado para análise das contagens das *Salmonellas* nos órgãos ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$) (DANIEL, 1991).

5 RESULTADOS

5.1 Preparo dos mutantes

A Figura 4 ilustra o eletroferograma obtido na amplificação do fragmento de DNA recombinante referente ao gene *motB*. Essa etapa referente ao gene *fliC* estava disponibilizada no laboratório.

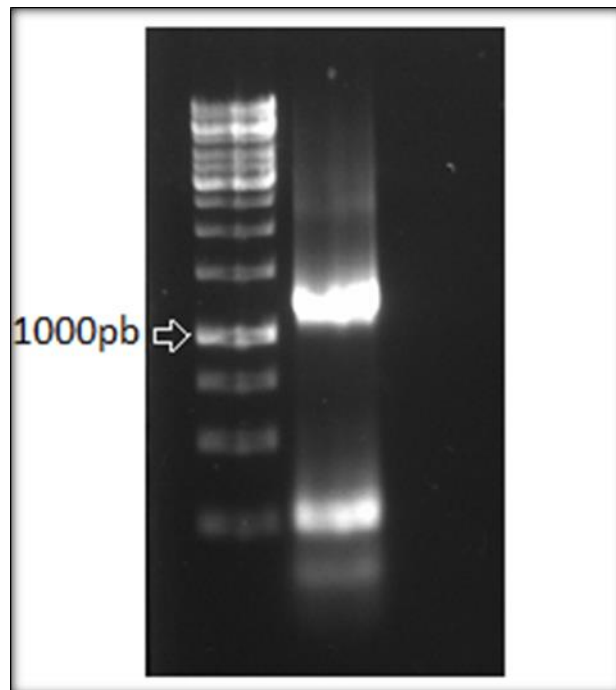


Figura 4. Eletroferograma em agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder), 1: fragmento de DNA recombinante *motB*, 2: fragmento de DNA recombinante *fliC*.

Os eletroferogramas representados pelas Figuras 5 e 6 ilustram a inserção dos marcadores de antibióticos na estirpe SENaI', descritos no item 3.2.6.

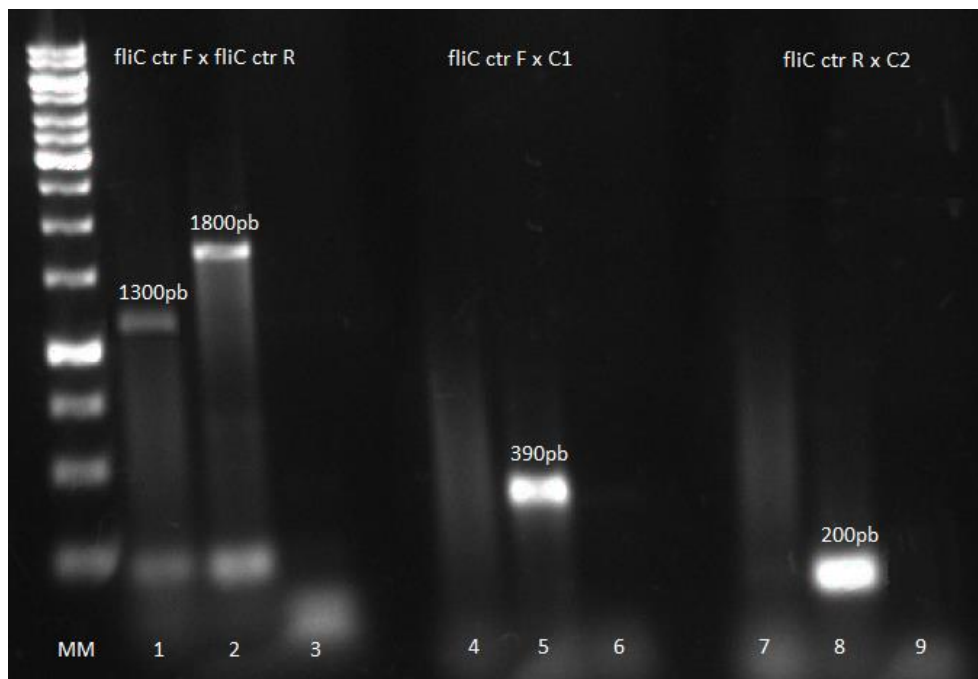


Figura 5. Eletroferograma em agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). 2, 5 e 8: SE $\Delta fliC$; 1, 4 e 7: SE selvagem; 3, 6 e 9: controle negativo.

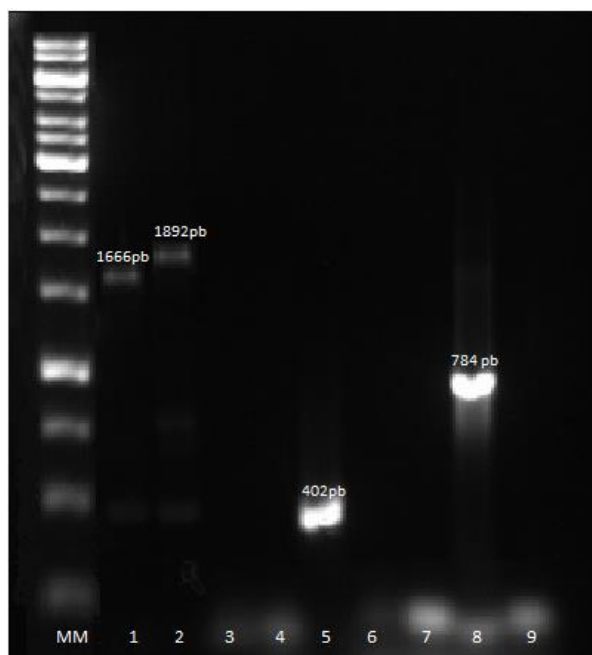


Figura 6. Eletroferograma em agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). 2, 5 e 8: SE $\Delta motB$; 1, 4 e 7: SE selvagem; 3, 6 e 9: controle negativo.

5.2 Verificação de motilidade nas estirpes SENal^r, SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta motB$

A estirpe selvagem apresentou multiplicação sugestiva de motilidade, quando inoculada em ágar semi-sólido. Enquanto que as mutantes SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta motB$ se multiplicaram na superfície do ágar (Figura 7).

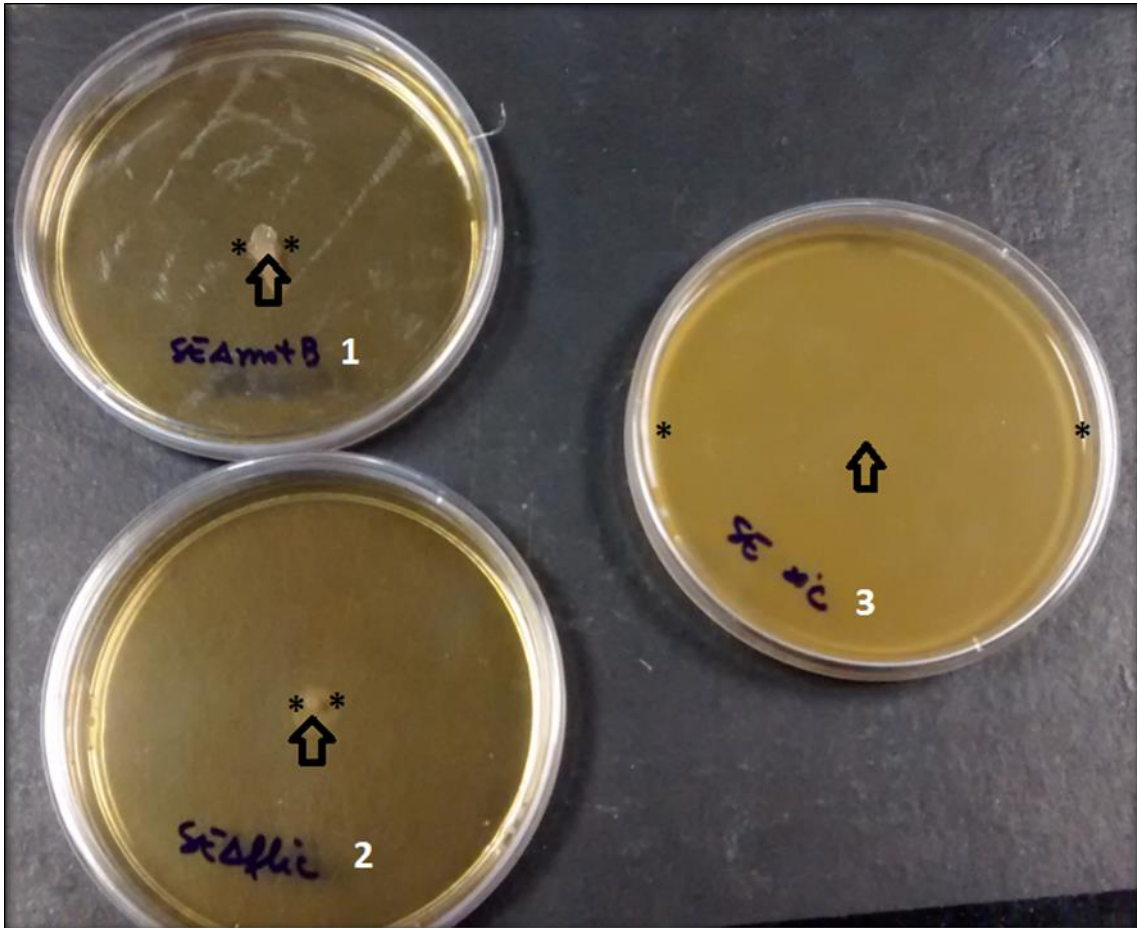


Figura 7. Fotografia de ágar semisólido inoculado com estirpes de *Salmonella* spp. após incubação por 24h por 28°C. 1: SE $\Delta motB$, 2: SE $\Delta fliC$, 3: SENal^r. Setas indicam ponto de inoculação da bactéria. Borda do halo de multiplicação demarcada por asterisco indica motilidade em SENal^r.

5.3 Teste de aglutinação com soros contra antígenos de *Salmonella*

Os resultados do teste de aglutinação estão ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados do teste de soroaglutinação anti-antígeno de *Salmonella*.

Estirpes	Soro polivalente anti-antígeno somático O	Soro monovalente anti-antígenoflagelar H(g,m)
SE selvagem	+	+
SE $\Delta fliC$	+	-
SE $\Delta motB$	+	+

5.4 Aves experimentais

Os suabes de fundo de caixa realizados no momento da chegada das aves apresentaram-se negativos para *Salmonella* spp.

5.5 Experimento 01: Avaliação da excreção fecal e mortalidade

Durante toda o experimento 01, não foi observada mortalidade em aves do grupo inoculado com a estirpe SE $\Delta motB$, sendo que aves dos grupos inoculados com SE $\Delta fliC$ e com a estirpe selvagem, respectivamente, apresentaram 13% de mortalidade (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade de machos de linhagem semipesada para postura comercial, desafiados experimentalmente no primeiro dia de vida com cultura de SE $\Delta motB$, SE $\Delta fliC$ em comparação com a estirpe SE.

Estirpe	Mortalidade				%
	2 dpi	3 dpi	7dpi	Total	
SE $\Delta motB$	-	-	-	-/15	0 a
SE $\Delta fliC$	1	1	-	2/15	13 a
SENaI ¹	1	-	1	2/15	13 a

*Números seguidos de letras iguais nas linhas indicam que não há diferença pelo teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$);

Os resultados obtidos de suabes cloacais realizados duas vezes por semana para verificação da excreção fecal foram similares entres os três grupos analisados ($P < 0,05$) de acordo com dados da Tabela 5.

Tabela 5. Relação do número de amostras positivas pelo número total de amostras de machos de postura, examinadas por suabe cloacal e desafiadas com as estirpes SE Δ motB, SE Δ fliC e SE para avaliação da excreção fecal.

Resultados positivos para <i>Salmonella</i> Enteritidis			
dpi	SEΔmotB	SEΔfliC	SENaI^r
1	15/15	12/15	15/15
6	13/15	12/13	12/14
8	15/15	13/13	13/13
13	15/15	12/13	12/13
15	12/15	12/13	12/13
20	14/15	12/13	11/13
22	13/15	13/13	10/13
27	11/15	10/13	11/13
Total	108/120 a	96/106 a	96/107a

dpi: dias pós-inoculação; letras iguais nas linhas indicam que não há diferença pelo teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$); total: número total de amostras positivas/ número total de aves inspecionadas.

5.6 Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica

Os sinais clínicos iniciaram-se quatro dias pós-infecção. As aves de todos os grupos apresentaram diarreia permanecendo até o 13^o dia pós-infecção, sendo observados traços de sangue em todos os grupos. Não houve mortalidade durante o experimento.

A Figura 8 representa a contagem bacteriana em baço, fígado e conteúdo cecal de aves desafiadas com SE Δ motB, SE Δ fliC e SENaI^r, nos quais foram semelhantes entre si e sem diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

As médias das contagens bacterianas em fígado, baço e conteúdo cecal seguidas do desvio padrão estão disponíveis no Apêndice 1A.

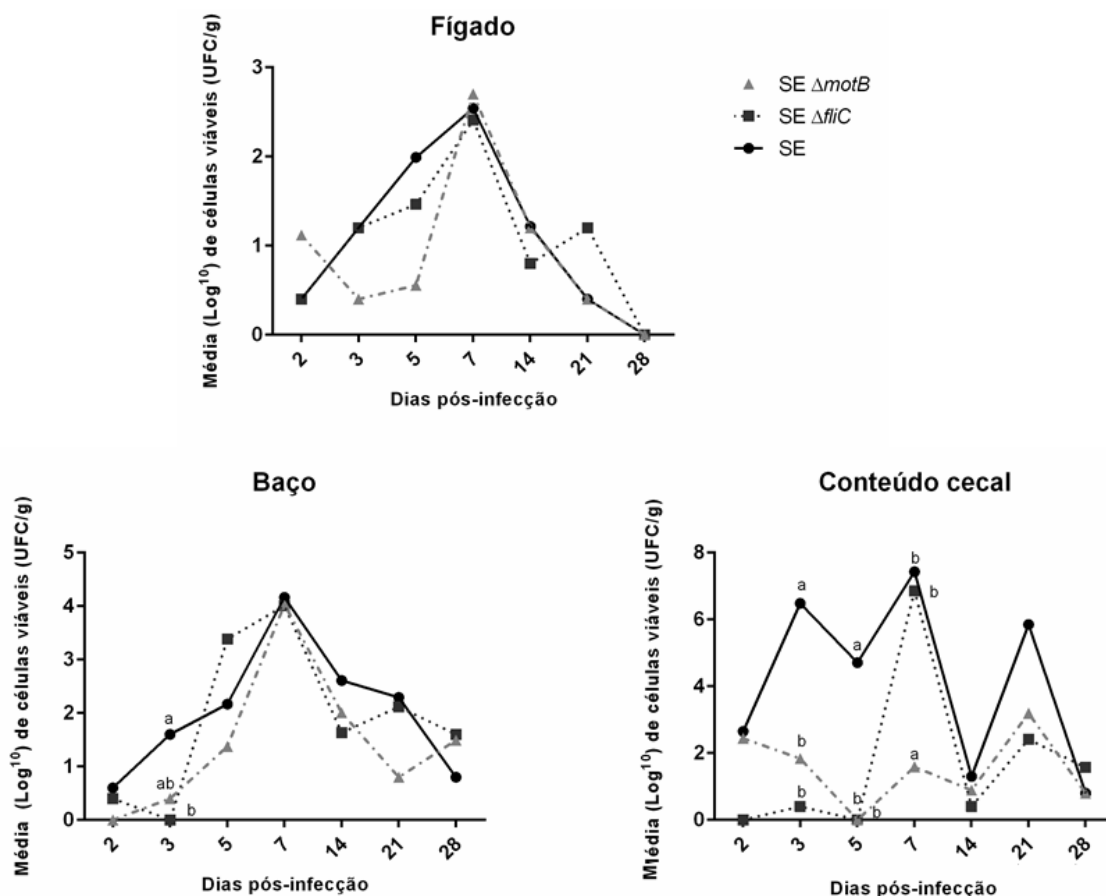


Figura 8. Contagem de SE $\Delta fliC$ (■), SE $\Delta motB$ (▲) e SE $\Delta fliC$ (●) em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal por dia de colheita. Média do número viável (Log^{10} UFC/g) de SE $\Delta fliC$, SE $\Delta motB$ e SE $\Delta fliC$ em conteúdo cecal, no fígado e no baço de aves experimentalmente infectadas no primeiro dia de vida. Letras diferentes por dia de colheita representam resultados estatisticamente significantes ($P < 0.05$).

De modo geral, a recuperação da estirpe selvagem foi superior ao das estirpes mutantes, em todos os órgãos no período correspondente ao início da infecção. Após 14 dpi, os grupos foram semelhantes entre si.

As estirpes mutantes foram capazes de colonizar fígado e baço, porém sem diferença estatística. Apenas em 3 dpi no baço, a estirpe mutante SE $\Delta fliC$ foi menos recuperada que outras mutantes, e em 5 dpi, a multiplicação bacteriana foi superior ao da estirpe selvagem.

Em conteúdo cecal, ambas estirpes mutantes foram significativamente menos recuperadas que a selvagem em 3 e 5 dpi. Porém em 7 dpi, SE $\Delta fliC$ equiparou-se a selvagem, sendo superiores à recuperação da estirpe SE $\Delta motB$. Esta durante todo o experimento, manteve-se em nível aproximadamente constante em torno de dois como observado na Figura 8.

5.6.1 Avaliação macro e microscópica

As alterações macroscópicas observadas durante as necropsias durante todo o período experimental estão demonstradas na Tabela 6. A partir do terceiro dias pós-infecção foram encontradas lesões como hepatomegalia e esplenomegalia, com congestão em ambos os órgãos, como ilustrado na Figura 9.

Tabela 6. Alterações macroscópicas observadas em aves de postura desafiadas experimentalmente com as estirpes mutantes SE $\Delta motB$, SE $\Delta fliC$ e SE Δnal^r após necropsia.

GRUPOS	Dias pós-infecção						
	2	3	5	7	14	21	28
SE$\Delta motB$	-	Enterite discreta (2/5)	Esplenomegalia (3/5) Fígado congesto Ceco com petéqueas (1/5)	Esplenomegalia com congestão (3/5)	Fígado congesto (1/5)	Ceco avermelhado (1/5)	Ceco tigrado (5/5) Má absorção da gema (5/5)
SE$\Delta fliC$	-	Hepatomegalia com congestão (4/5) Esplenomegalia(1/5)	Petéqueas no peito(1/5)	Esplenomegalia (1/5)	Má absorção da gema (1/5)	-	Má absorção da gema (1/5) Ceco tigrado (5/5) Má absorção da gema (5/5)
SEΔnal^r	Espessamento mucosa intestinal (4/5)	Enterite moderada (5/5) Esplenomegalia(2/5)	Petequeas no peito (1/5) Casio no ceco (1/5) Esplenomegalia (1/5) Fígado congesto(1/5)	Fígado congesto com áreas de coloração esverdeada (1/5) ; Esplenomegalia com congestão (2/5) Enterite (1/5)	Má absorção da gema (1/5)	Má absorção da gema (1/5)	Ceco tigrado (5/5) Íleo avermelhado (5/5) Má absorção da gema (1/5)

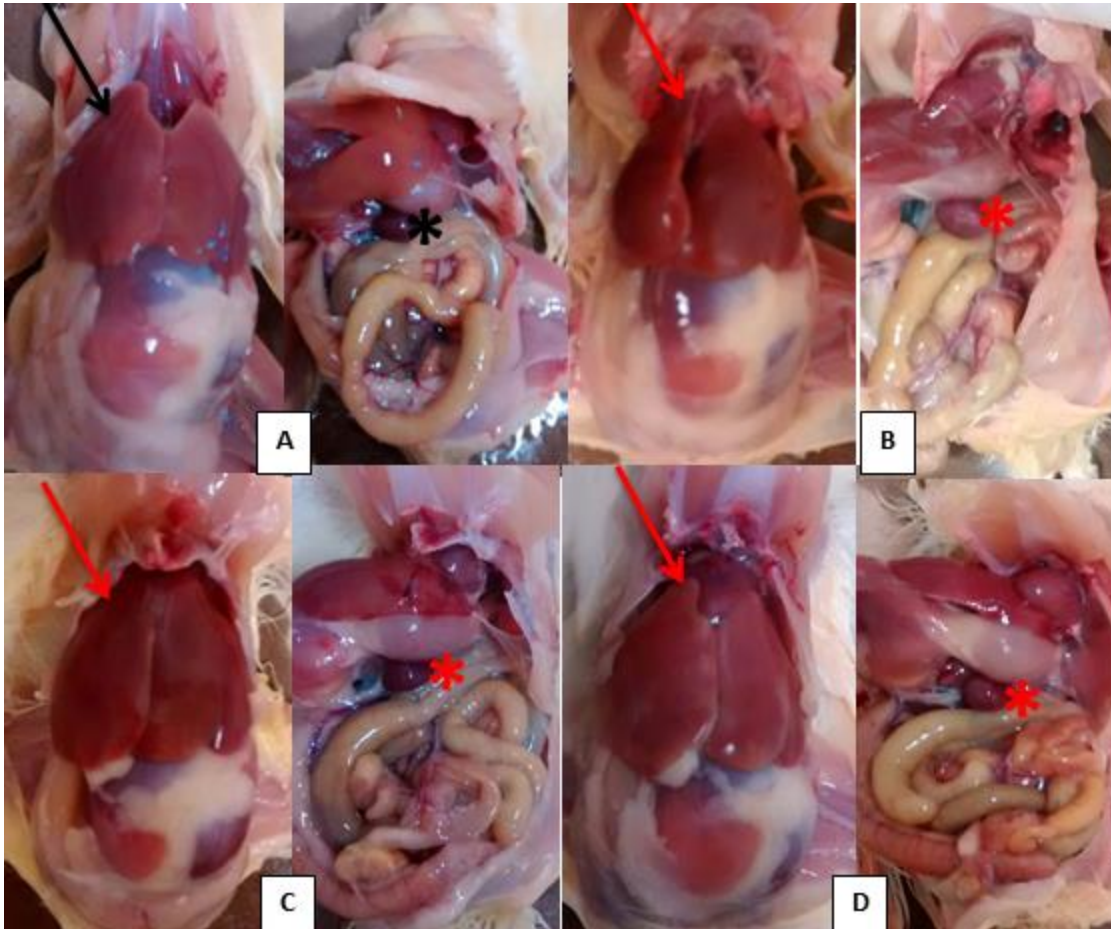


Figura 9. Alterações macroscópicas de aves desafiadas com $SE\Delta motB$, $SE\Delta fliC$ e $SENal'$ no 7° dpi. (A) Fígado (seta preta) e baço (asterisco preto) de ave não desafiada. Aves desafiadas com $SE\Delta motB$ (B), $SE\Delta fliC$ (C) e $SENal'$ (D), apresentando hepatomegalia (seta vermelha) e esplenomegalia (asterisco vermelho).

As Figuras de 10 a 13 ilustram as proporções de escores das principais alterações microscópicas observadas no inglúvio, fígado, ceco e íleo coletados nos dias dois, três, cinco, sete, 14, 21, e 28 dpi. Descrições mais detalhadas das intensidades das lesões em diferentes órgãos e momentos estão disponíveis nos Apêndices 1B, 2B e 3B

No inglúvio de todos os grupos foram observadas hiperplasia e descamação epitelial, reatividade linfóide em lâmina própria, degeneração da camada muscular, hipertrofia de células musculares lisas e infiltrado de células inflamatórias mononucleares na musculatura externa.

A descamação epitelial foi mais pronunciada nos dias 2 e 7 dpi para todos os grupos, sendo que a estirpe $SE\Delta motB$ induziu descamação moderada em relação ao escore discreta dos outros grupos.

A presença de reatividade linfóide na lâmina própria em todos os grupos, foi expressiva somente a partir de 7 dpi, no qual as estirpes flageladas induziram progressivamente essa alteração até atingir escore moderado no final do experimento. Porém, a estirpe $SE\Delta fl/C$ que induzia um grau discreto desta lesão microscópica nos primeiros dias da infecção, foi capaz de induzir um pico de grau moderado de reatividade linfóide ao 14 dpi.

Os escores das lesões observadas no inglúvio tornam-se semelhantes entre todos os grupos após 14 dpi.

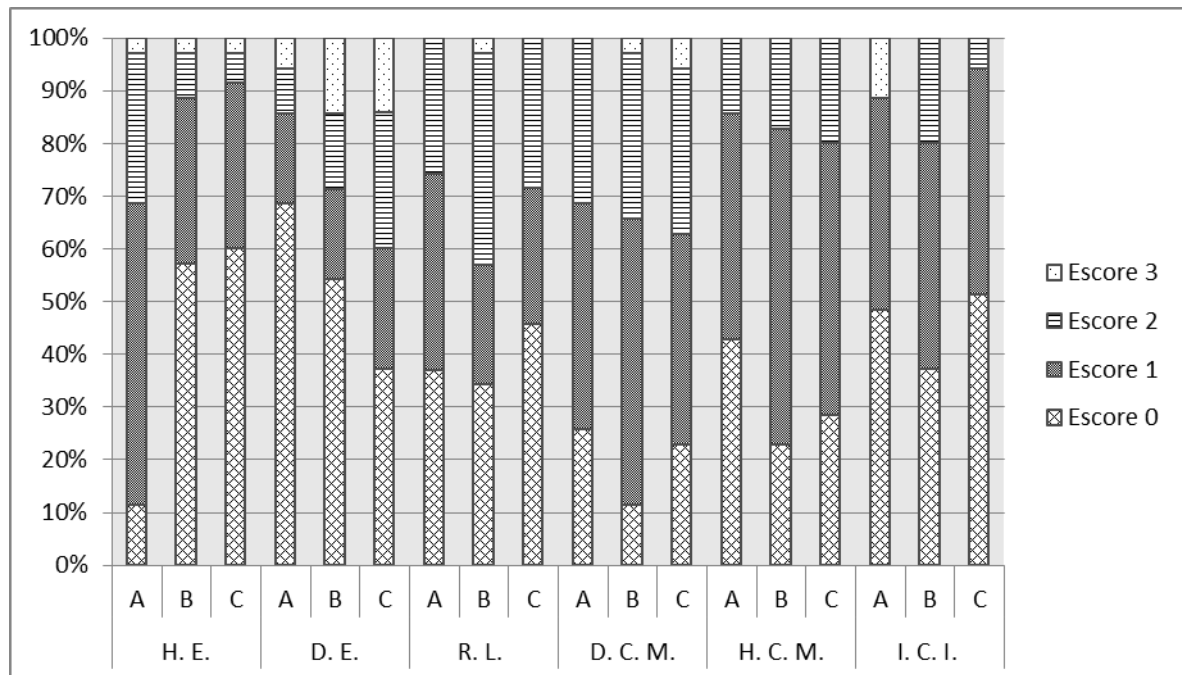


Figura 10. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em inglúvio de aves coletadas nos dias dois, três, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi com as estirpes mutantes $SE\Delta motB$ (A), $SE\Delta fl/C$ (B) e $SE\Delta I^r$ (C). Escores de intensidade de lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: H.E. (Hiperplasia epitelial); D.E. (Descamação epitelial); R.L. (Reatividade linfóide em lâmina própria); D.C.M. (Degeneração da camada muscular); H.C.M. (Hipertrofia de células musculares); I.C.I. (Infiltrado de células inflamatórias na camada muscular).

No fígado foram descritas lesões microscópicas de células inflamatórias na região de necrose, granulomas, congestão de vasos e sinusóides, hipertrofia da parede dos vasos e inflamação perivascular em todos os grupos.

A degeneração hepática de aves inoculadas com SENal^r foi mais severa em 7 dpi, enquanto que as outras estirpes induziram o pico de degeneração hepática de grau moderado aos 14 dpi.

A reatividade linfóide em regiões de necrose e parênquima para a estirpe SE Δ fliC foram observadas desde a primeira coleta, mas discretas em comparação aos outros grupos. No entanto, SE Δ motB e SENal^r induziram posterior reatividade linfóide de grau moderado com pico em 14 e 7 dpi, respectivamente.

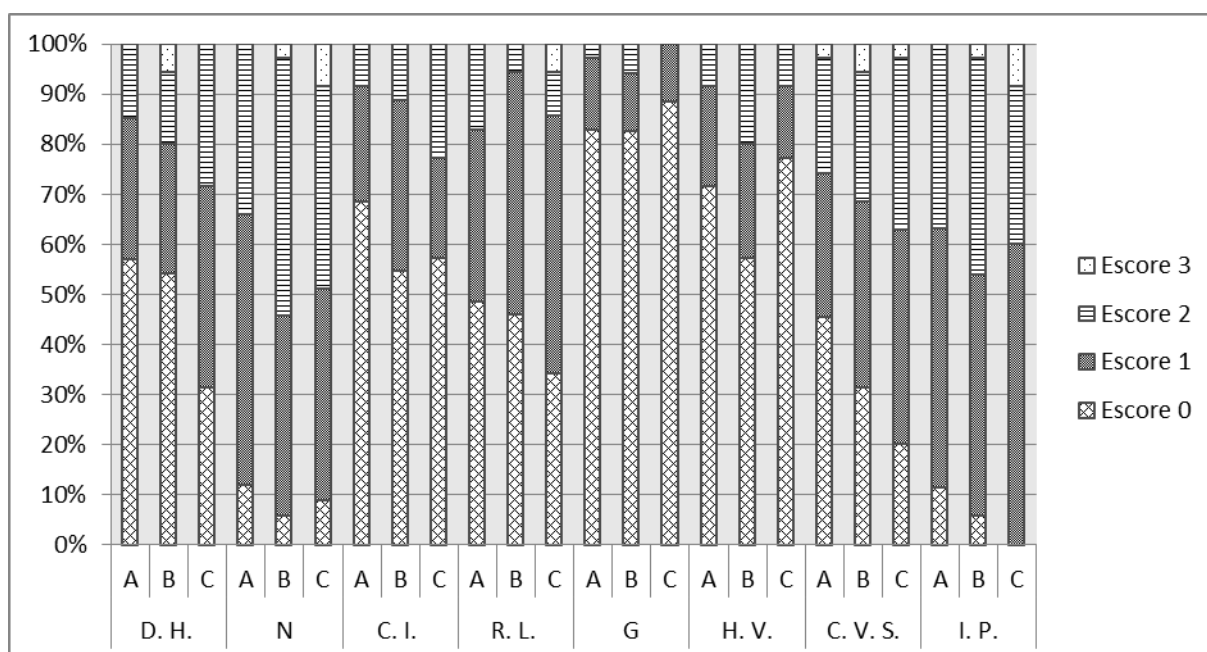


Figura 11. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em fígado de aves coletados nos dias dois, três, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi com as estirpes mutantes SE Δ motB (A), SE Δ fliC (B) e SENal^r (C). Escore de intensidade das lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: D.H. (Degeneração hepática); N (Áreas de necrose); C.I. (Células inflamatórias na região de necrose); R.L. (Reatividade linfóide em parênquima hepático); G (Granulomas); H.V. (Hipertrofia da parede dos vasos); C.V.S. (Congestão de vasos e sinusóides); I.P. (Inflamação perivascular).

A presença de infiltrado mononuclear em lâmina própria, desnudamento apical de vilos, atrofia de vilosidade, edema de submucosa, fusão dos vilos e dilatação linfática de submucosa foram observados no ceco desde a primeira coleta.

A estirpe SENal^r induziu presença de infiltrado mononuclear em lâmina própria de grau moderado a severo desde a primeira coleta. No entanto as estirpes mutantes, induziram grau semelhante de lesões somente aos 5 dpi. A mutante SE Δ motB apresentou o grau mais severo somente em 14 dpi, enquanto que as outras estirpes atingiam em 7 dpi.

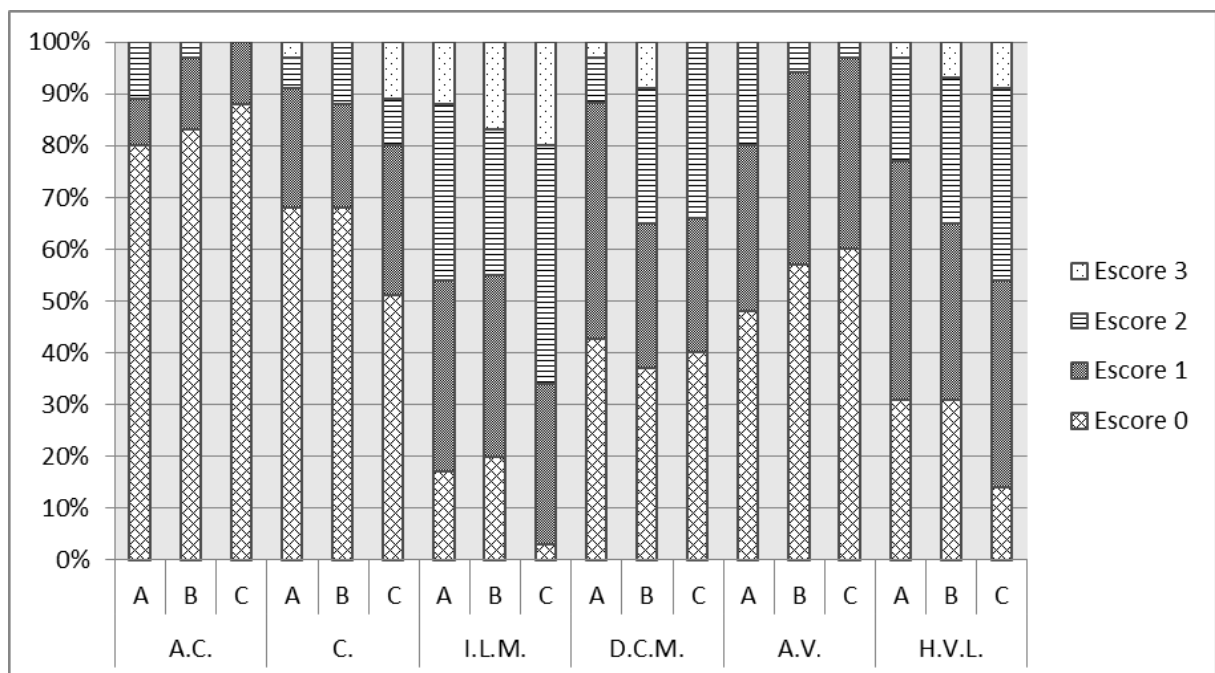


Figura 122. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em ileo de aves coletados nos dias dois, três, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi com as estirpes mutantes SE Δ motB (A), SE Δ fl/C (B) e SENal^r (C). Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: A.C. (Atrofia de cripta); C. (Congestão de vasos); I.L.M. (Infiltrado Linfocitário na mucosa); D.C.M. (Degeneração da camada muscular); A.V. (Atrofia de vilosidade); H.V.L. (Hiperplasia de vasos linfáticos na submucosa).

No ceco foram descritas as lesões microscópicas de infiltrado inflamatório mononuclear, desnudamento apical de vilos, atrofia de vilosidade, congestão de

vasos, infiltrado linfocitário na mucosa, degeneração da camada muscular, alteração de vilosidade e hiperplasia de vasos linfáticos na submucosa.

Em todos os grupos, o edema de submucosa foi observado de dois a sete dpi, com escore de severo a moderado e tornou-se discreto a nulo até a última coleta.

Presença de infiltrado linfocitário em mucosa inicialmente apresentou-se moderado em todos os grupos, permanecendo constante até o final do experimento, exceto pelas estirpes mutantes em que foi observado escore discreto aos três e cinco dpi.

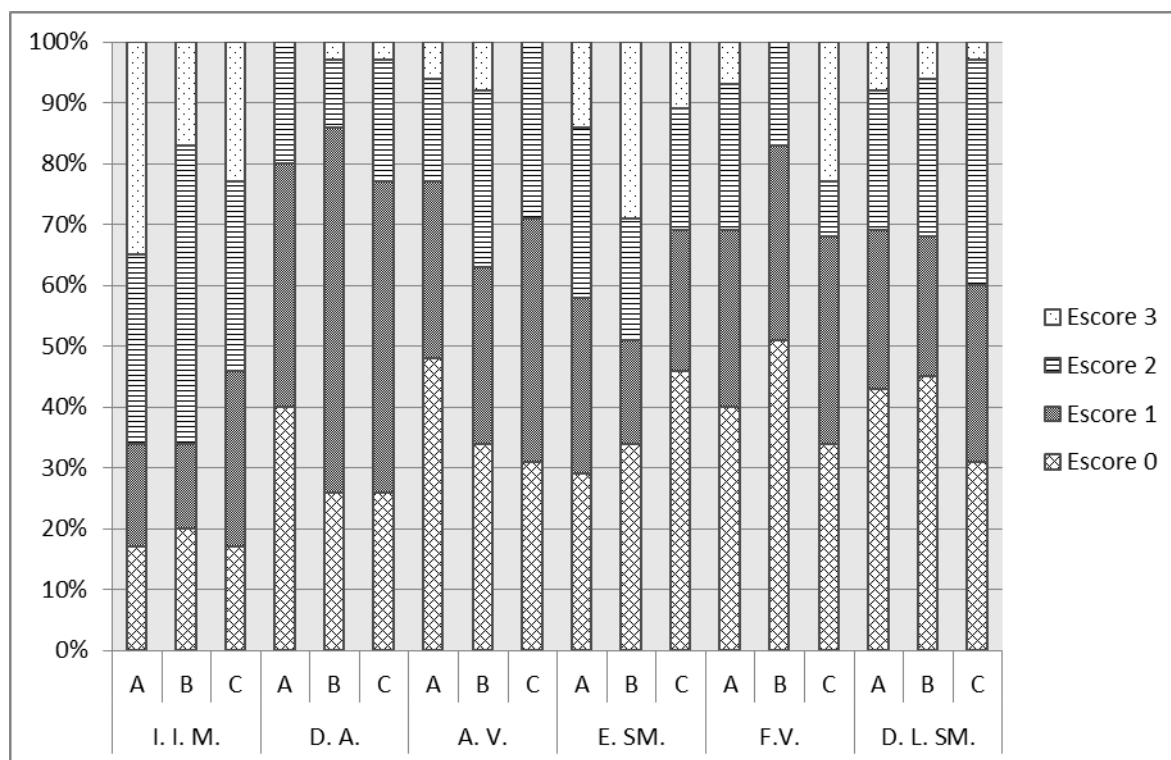


Figura 133. Total de proporções de escores de lesões microscópicas em ceco de aves coletados nos dias dois, três, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi com as estirpes mutantes $SE\Delta motB$ (A), $SE\Delta flhC$ (B) e $SE\Delta nal^r$ (C). Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: I.I.M. (Infiltrado inflamatório mononuclear); D.A. (Desnudamento apical de vilos); A.V. (Atrofia de vilosidade); E.SM. (Edema de submucosa); F.V. (Fusão dos vilos); D.L.SM. (Dilatação linfática de submucosa).

As Figuras de 14 a 17 ilustram o contraste de lesões microscópicas entre os grupos aos 5dpi, observadas em inglúvio, fígado, íleo e ceco. Após 7dpi as lesões microscópicas eram similares, não ocorrendo diferenciação entre os grupos.

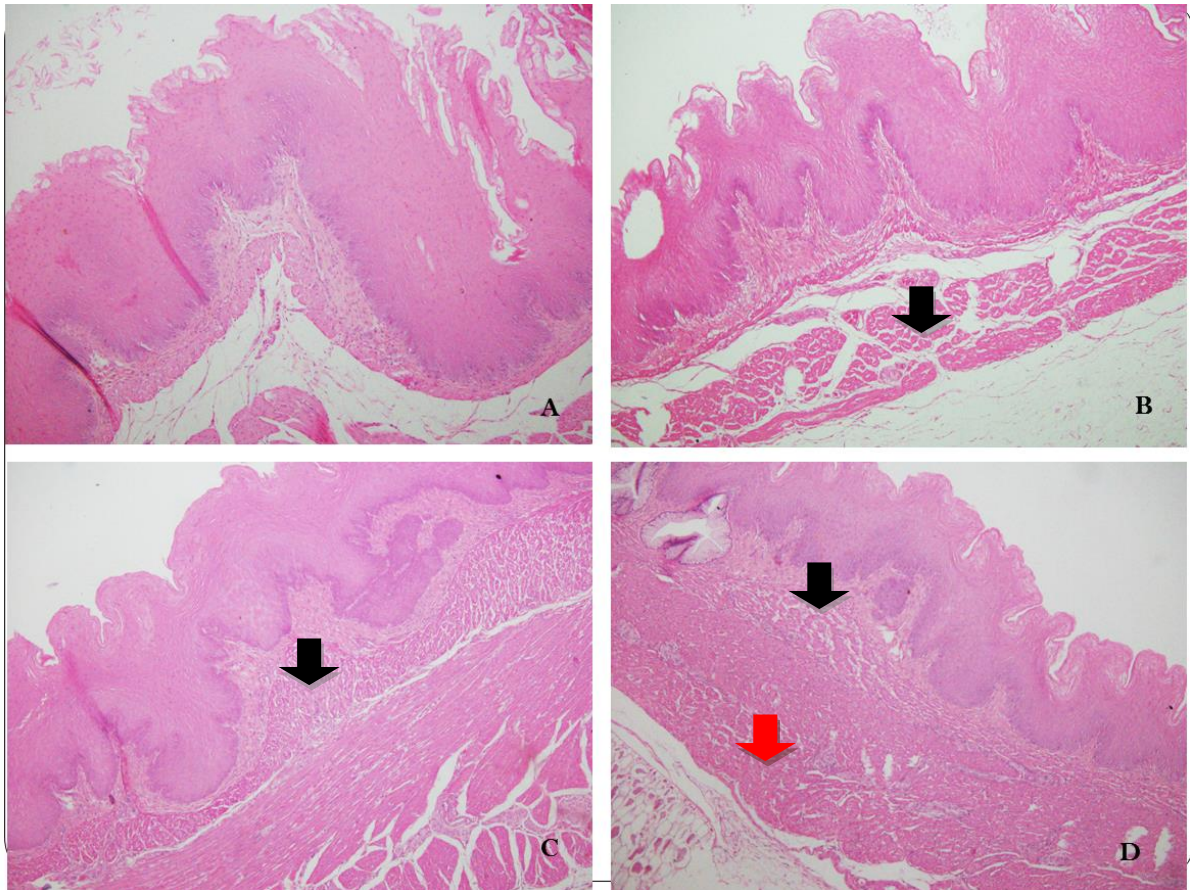


Figura 14. Fotomicrografia do inglúvio de aves infectadas com estirpes mutantes ($SE\Delta motB$ e $SE\Delta fliC$) e selvagem de *S. Enteritidis* aos 5 dpi. (A) Inglúvio sem alterações de ave não desafiada; (B) Descamação epitelial e degeneração de camada muscular (seta preta) em ave desafiada com $SE\Delta motB$ (C) Degeneração da submucosa (seta preta) em ave desafiada com $SE\Delta fliC$ (D) Degeneração da submucosa e camada muscular (seta preta e vermelha, respectivamente) em ave desafiada com a estirpe selvagem de *S. Enteritidis*. Hematoxilina e eosina, objetiva 10x.

Houve espessamento no epitélio do inglúvio de todas as aves inoculadas com *Salmonella*. A estirpe selvagem induziu degeneração de submucosa e camada

muscular, enquanto que as estirpes $SE\Delta motB$ e $SE\Delta fliC$, induziram respectivamente, apenas degeneração de camada muscular e submucosa.

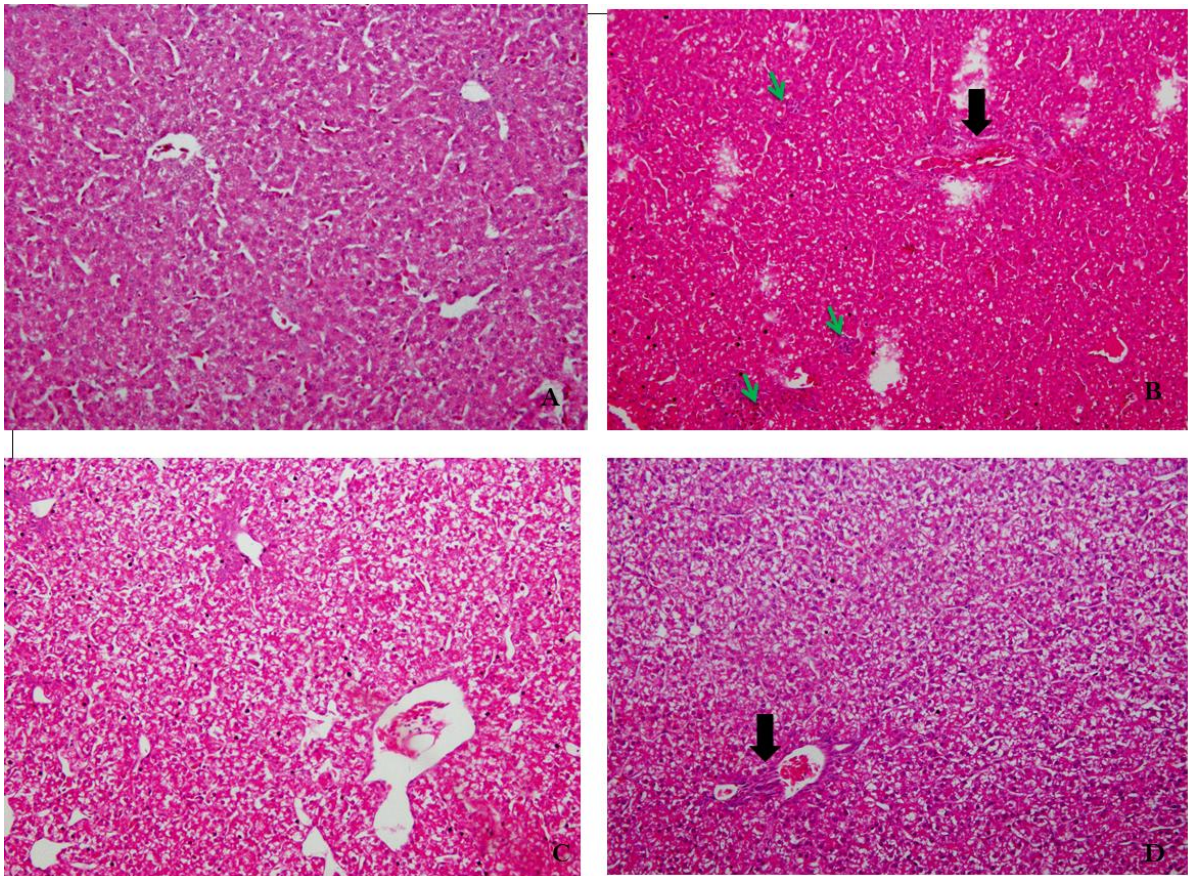


Figura 15. Fotomicrografia de fígado de aves infectadas com estirpes mutantes ($SE\Delta motB$ e $SE\Delta fliC$) e selvagem de *S. Enteritidis* em 5 dpi. (A) Fígado sem alterações de ave não desafiada; (B) Presença de reatividade linfóide perivascular (seta preta) e em pontos multifocais no parênquima (setas verdes) e discreta congestão em aves desafiadas com $SE\Delta motB$; (C) Degeneração hepática severa com ausência de reatividade linfóide perivascular em aves desafiadas com $SE\Delta fliC$; (D) Degeneração hepática severa e presença de reatividade linfóide perivascular (seta preta) e discreta congestão em aves desafiadas com a estirpe selvagem de *S. Enteritidis*. Hematoxilina e eosina, objetiva 20x.

No fígado, a estirpe selvagem induziu severa degeneração de parênquima hepático, assim como a estirpe aflagelada. A presença de discreta reatividade linfóide perivascular foi induzida pelas estirpes flageladas selvagem e $SE \Delta motB$.

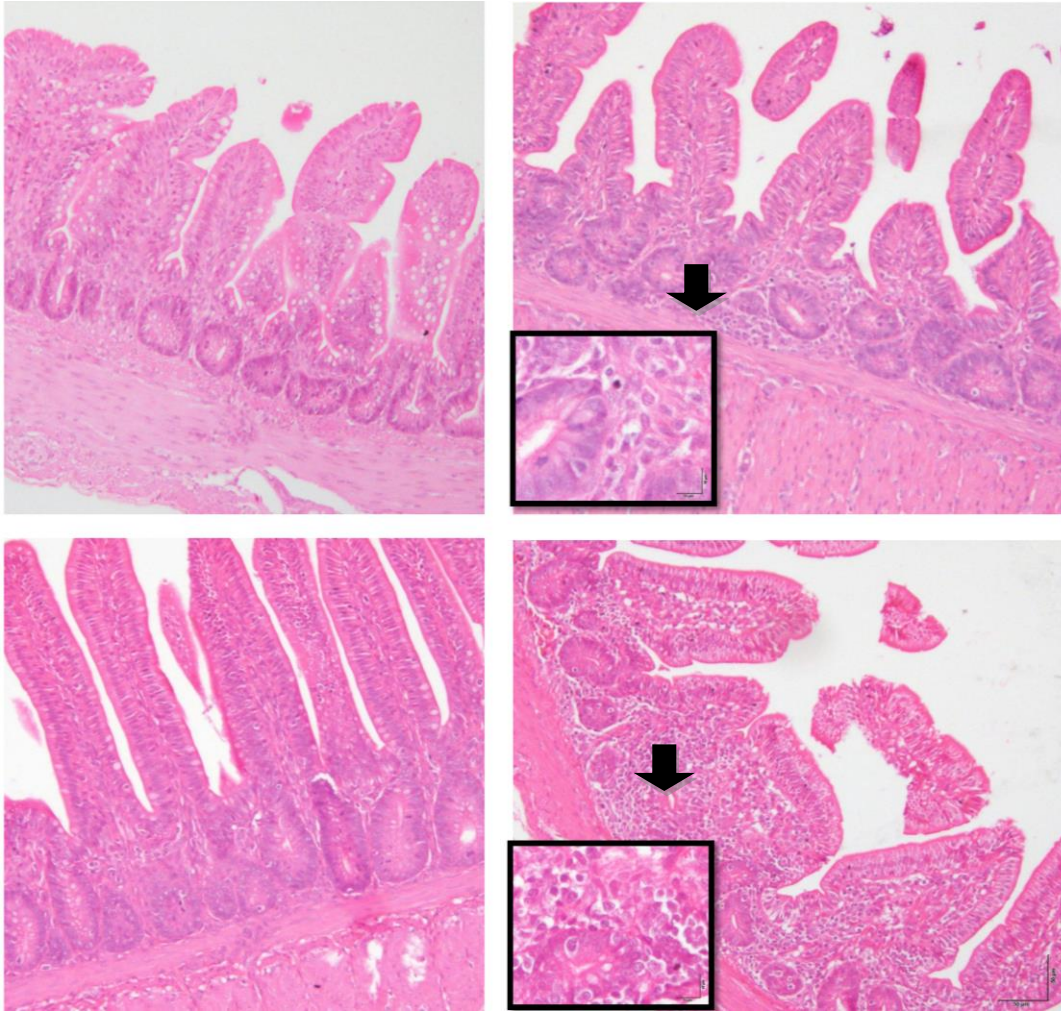


Figura 16. Fotomicrografia de íleo de aves infectadas com estirpes mutantes (SE $\Delta motB$ e SE $\Delta fliC$) e selvagem de *S. Enteritidis* em 5 dpi. (A) Ceco sem alterações de ave não desafiada; (B) Observar infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta preta) em ave desafiada com SE $\Delta motB$; (C) Ceco sem alterações de mucosa em ave desafiada com SE $\Delta fliC$; (D) Observar infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta preta) em ave desafiada com estirpe selvagem de *S. Enteritidis*. Hematoxilina e eosina, objetiva 10x.

No íleo, a estirpe selvagem induziu severa reatividade linfóide na mucosa com perda da conformação e fusão das vilosidade. A estirpe aflagelada não foi capaz de induzir reatividade de mucosa no período inicial da infecção, semelhante ao controle negativo.

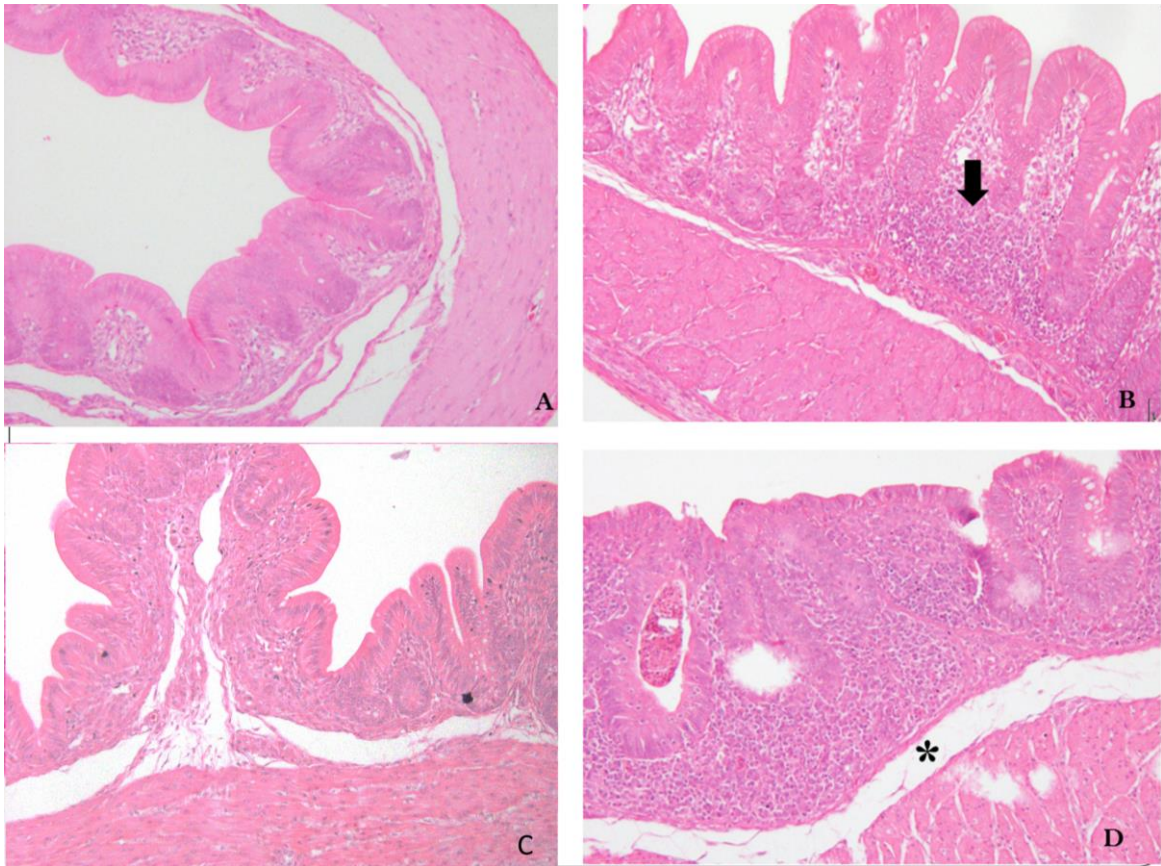


Figura 17. Fotomicrografia de ceco de aves infectadas com estirpes mutantes (SE $\Delta motB$ e SE $\Delta fliC$) e selvagem de *S. Enteritidis* em 5 dpi. (A) Ceco sem alterações de ave não desafiada; (B) Observar infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta) em ave desafiada com SE $\Delta motB$; (C) Observar ausência de infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta) em ave desafiada com desafiada com SE $\Delta fliC$ e edema (asterisco); (D) Observar infiltrado inflamatório mononuclear difuso na mucosa de ave desafiada com estirpe selvagem de *S. Enteritidis* com fusão de vilos e discreto edema (asterisco). Hematoxilina e eosina, objetiva 10x.

No ceco, foi induzida moderada reatividade linfoide em todos os grupos desde 2 dpi. Porém aos 3 e 5 dpi, foi observada atenuação com discreta reatividade linfóide induzida pelas estirpes mutantes.

DISCUSSÃO

A patogenicidade de *Salmonella* spp. é multifatorial e complexa, envolvendo diversos fatores de virulência que permitem ao micro-organismo causar infecção no hospedeiro (WALLIS; GALYOV, 2000; RYCHLIK; BARROW, 2005). Alguns fatores de virulência são reconhecidos como “clássicos” em *Salmonella* spp., tais como os plasmídios de virulência, ilhas de patogenicidade, toxinas, adesinas e os flagelos (WASSENAAR; GAASTRA, 2001; VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

A maioria dos micro-organismos do gênero *Salmonella* possuem flagelos peritríqueos com excessão dos biovars *S. Gallinarum* (SG) e *S. Pullorum* (SP) que são imóveis, mas capazes de causar infecção sistêmica grave em aves (IQBAL et al., 2005). Por outro lado, estirpes flageladas colonizam o intestino de forma intensa, provocando um quadro de enterite que pode evoluir para infecção sistêmica de menor severidade (GAST, 2008). O reconhecimento da proteína do flagelo por receptores TLR5 intestinais e consequente indução de resposta inflamatória local, ajudariam a controlar a infecção sistêmica (TENNANT et al., 2011).

Estudos a respeito da participação do flagelo na patogenia de *Salmonella* spp. apresentam resultados variados, conforme o modelo experimental e sorovares envolvidos (IQBAL et al., 2005; FREITAS NETO et al., 2013; YIM et al., 2014). Além da presença de flagelina, a motilidade seria outro fator de virulência a ser considerado. De acordo com outros estudos, a colonização inicial de células intestinais é prejudicada na infecção por estirpes contendo flagelos paralisados (ROBERTSON et al., 2003; VAN ASTEN et al., 2004).

A reduzida quantidade de dados, correlacionando a ausência de motilidade e flagelos em *S. Enteritidis* (SE) com as alterações na patogenia da infecção de aves jovens motivaram a realização do presente estudo. Sabe-se que infecções causadas por alguns sorovares paratíficos resultam em colonização cecal assintomática com excreção fecal persistente. Entretanto, na infecção por SG, a excreção fecal somente ocorre em momentos próximos à morte das aves (OLIVEIRA; BERCHIERI; FERNANDES, 2005; WATSON et al., 2012). Durante quatro semanas, a excreção fecal dos mutantes SE $\Delta motB$ (imóvel, mas flagelado) e SE $\Delta fliC$ (sem flagelos) foi

similar à da estirpe selvagem ($P>0.05$). À semelhança dos achados de ALLEN-VERCOE e WOODWARD (1999), os quais relataram que a excreção fecal de estirpes não-móveis flageladas e aflageladas de SE foram similares à da estirpe selvagem. Esses resultados indicam que mesmo sem motilidade ou flagelos, estirpes de SE continuam sendo excretadas e capazes de contaminar o ambiente e consequentemente, outras aves.

Naturalmente ou em ensaios experimentais, a ausência de flagelos em outros sorovares foi apontada como fator determinante para aumento de patogenicidade de estirpes para aves (IQBAL et al., 2005; FREITAS NETO et al., 2013). Portanto era de se esperar que incapacidade de sintetizar essa estrutura tornasse a estirpe SE $\Delta fliC$ mais patogênica para aves. Entretanto, no presente estudo não houve diferença entre as taxas de mortalidade provocadas pelas três estirpes (SE $\Delta fliC$, SE $\Delta motB$ e SE) em aves susceptíveis à infecção sistêmica ($P>0,05$). Resultado semelhante foi obtido por PARKER e GUARD PETER (2001) os quais desafiaram aves SPF com estirpes de SE, não observando diferenças entre a mortalidade provocada pela estirpe selvagem e pela mutante com deleção no gene *fliC*. É plausível assumir que a patogenia do paratifo aviário provocado por SE requer outros fatores de virulência conjuntamente envolvidos. Portanto, as alterações fenotípicas provocadas pela ausência de flagelos e/ou motilidade nesse sorovar não são suficientes para elevar sua patogenicidade para aves.

Ao contrário do que é observado nas infecções por sorovares paratíficos, ao atingir o intestino SG e SP não colonizam o ceco de forma eficiente (SETTA et al., 2012). No segundo experimento, aos 3 e 5 dpi, as estirpes mutantes (SE $\Delta fliC$, SE $\Delta motB$) foram recuperadas no conteúdo cecal em quantidades inferiores as da estirpe selvagem ($P>0.05$). Esses dados são consistentes com os de estudos prévios, em que a recuperação de estirpes aflageladas de *S. Enteritidis* e *Typhimurium* do intestino de camundongos e aves foi reduzida nos primeiros dias pós-infecção (ALLEN VERCOE; SAYERS; WOODWARD, 1999; ROBERTSON et al., 2003; STECHER et al., 2004). Portanto, é possível afirmar que a ausência de motilidade e flagelos em SE afetariam principalmente momentos iniciais da colonização intestinal.

Ao longo do presente estudo, a estirpe SE $\Delta motB$ apresentou pior capacidade de colonizar o ceco que SE $\Delta fliC$. Van Astenet et al. (2004) também relataram que a existência de flagelos paralisados em SE parece ser mais prejudicial para colonização intestinal do que a sua total ausência. Segundo achados de Jones et al. (1992), a orientação dos filamentos flagelares influenciam o processo de invasão criando campo de repulsão eletrostática em torno dos flagelos paralisados, prejudicando a adesão à mucosa intestinal. Este fenômeno conhecido como impedimento estérico, explicaria a menor recuperação cecal de SE $\Delta motB$ em comparação às estirpes SE $\Delta fliC$ e SENaI^r durante infecção inicial.

A ausência de flagelos e motilidade, também prejudicaram a capacidade das estirpes mutantes (SE $\Delta fliC$, SE $\Delta motB$) de alcançar o fígado e o baço, ou seja de realizar invasão e infecção sistêmica. A motilidade em *Salmonella* spp. facilita o processo de invasão por auxiliar no rompimento da barreira de muco intestinal e aumentar a adesão às células epiteliais (ALLEN VERCOE; WOODWARD, 1999, DIBB-FULLER; WOODWARD, 1999; SCHMITT et al., 2001; ROBERTSON et al., 2003; HARVEY et al., 2011). Portanto, por serem imóveis, ambos mutantes estudados no presente trabalho teriam dificuldade em transpor o epitélio intestinal e realizar infecção sistêmica, o que explicaria a baixa recuperação dos mesmos em fígado e baço nos primeiros dias de infecção.

Após atingir órgãos sistêmicos como fígado e baço, as bactérias intracelulares, como *Salmonella* spp., diminuem a síntese flagelina e outros antígenos como forma de reduzir a estimulação de linfócitos T e outras células do sistema imune, facilitando sua multiplicação intracelular (CUMMINGS et al., 2005). No presente trabalho, a partir do 7º dpi a recuperação das estirpes mutantes (SE $\Delta motB$ e SE $\Delta fliC$) em baço e fígado foram próximos ao da estirpe selvagem. PARKER e GUARD-PETTER et al. (2001) e DIBB-FULLER e WOODWARD (2000) também obtiveram resultados semelhantes, indicando que os flagelos seriam de fato necessários apenas no início da infecção.

Aos 3dpi a recuperação de SE $\Delta fliC$ no baço foi menor que a da estirpe selvagem. Schmitt et al. (2001) também constataram que estirpes mutantes aflageladas foram menos capazes de alcançar o baço quando comparada à selvagem, mas replicaram-se mais rapidamente ou da mesma forma que a estirpe

selvagem após atingirem o órgão. Comportamento semelhante foi observado com a estirpe SE $\Delta fliC$ aos 5 dpi no presente estudo. Este discreto aumento na capacidade de multiplicação, possivelmente ocorreu por alterações da taxa metabólica bacteriana decorrente da incapacidade de sintetizar a flagelina (SCHMITT et al., 2001).

No presente estudo, notou-se moderada presença de infiltrado mononuclear na lâmina própria do íleo durante os momentos iniciais da infecção de aves desafiadas com as estirpes SE Na^r e SE $\Delta motB$, mas não naquelas inoculadas com SE $\Delta fliC$. A discreta inflamação intestinal induzida pela estirpe mutante aflagelada poderia estar correlacionada aos achados de Kaiser et al. (2000), os quais verificaram que a ausência de flagelos em *Salmonella* induz a expressão de baixos níveis de IL-6, o que levaria a reação pró-inflamatória de menor intensidade na mucosa intestinal, favorecendo a invasão do patógeno no local. Por outro lado, a presença de flagelo seria capaz de ativar os TLR5 e desencadear resposta imune pró-inflamatória mesmo em estado estático (YIM et al., 2014). Portanto, é possível afirmar que a ausência de motilidade na estirpe SE $\Delta motB$ não extingue a habilidade de reconhecimento da flagelina pelos TLR5.

No presente estudo, todas as estirpes induziram escores moderados de infiltrado mononuclear em mucosa de ceco, sugerindo que a presença do patógeno, mesmo com motilidade e estrutura flagelar defectivos, é capaz de desencadear inflamação local. Porém aos 3 e 5 dpi, a inflamação observada na mucosa dos cecos de aves infectadas com as estirpes mutantes foi menos intensa e coincidiu com a menor recuperação dessas estirpes do conteúdo cecal. Setta et al. (2012) demonstraram que o tropismo pelo ceco é comum à diferentes sorovares de *Salmonella*, mas estirpes aflageladas (SG e SP) são menos recuperadas que as paratíficas. Portanto, a ausência de motilidade e de flagelo afetariam os momentos iniciais da colonização cecal.

Vale destacar que alterações microscópicas como descamação epitelial, reatividade linfóide na lâmina própria e degeneração de camada muscular foram observadas no ingluvío das aves dos três grupos, porém tais alterações foram mais pronunciadas naquelas desafiadas com a estirpe selvagem. Embora a região do ceco das aves seja apontada como principal local de eleição para colonização e

invasão de *Salmonella* spp. (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009), outros sítios do trato gastrointestinal, como o ingluvívio, podem ser invadidos por esses micro-organismos. Segundo VAUGHN et al. (2008), no ingluvívio é desencadeada resposta imune humoral com secreção de IgA contra SE e de acordo com SEO et al. (2002) este tipo de resposta pode afetar a sobrevivência desse micro-organismo na ave. Estas lesões provavelmente são decorrentes do estímulo da imunidade de mucosa por meio de reconhecimento do flagelo das estirpes flageladas. Apesar da ausência de flagelina em SE $\Delta fliC$, esta ainda possui antígenos somáticos (O) e proteínas de membranas capazes de induzir imunidade local neste órgão (SEO, et al., 2002), o que explicaria os achados observados.

A estirpe selvagem induziu alterações microscópicas como degeneração hepática, reatividade linfóide em parênquima e áreas de necrose mais pronunciadas no fígado. Lesões semelhantes, porém discretas foram provocadas pelas estirpes mutantes. Estudos recentes afirmam que o fígado também possui TLR5, cuja ativação é dose-dependente de flagelina (XIAO et al., 2014). Portanto, apesar da inibição da síntese de flagelos, as estirpes flageladas (SE Nal^r e SE $\Delta motB$) ainda secretam quantidades mínimas de flagelina suficientes para indução de reatividade linfóide moderada, o que coincide com os achados observados no parênquima hepático após o 5º dpi. A estirpe SE $\Delta fliC$ é incapaz de secretar flagelina, mas sintetiza outros antígenos essenciais para a sobrevivência de *Salmonella*, explicando as alterações hepáticas discretas observadas em aves desafiadas com essa estirpe desde o início do estudo (CUMMINGS et al., 2005).

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, foi possível observar que a presença de flagelos paralisados em SE é mais prejudicial para colonização do ceco do que sua total ausência. A motilidade de SE ajudaria acelerar os estágios iniciais da colonização intestinal e invasão sistêmica. Embora mais análises necessitem ser realizadas, ao que tudo indica o aparato flagelar estimulou o sistema imune com indução de reação inflamatória na lâmina própria intestinal.

CONCLUSÕES

Nas condições em que presente estudo foi realizado foi possível concluir que:

- Mesmo na ausência de flagelos e/ou motilidade, as estirpes $SE\Delta flhC$ e $SE\Delta motB$ continuam sendo excretadas nas fezes.
- As alterações fenotípicas provocadas pela ausência de flagelos e/ou motilidade em SE não são suficientes para elevar sua patogenicidade para aves.
- O flagelo e motilidade colaboram com os estágios iniciais da colonização intestinal, sendo a ausência de motilidade mais prejudicial para colonização intestinal do que ausência de flagelos.
- O flagelo e motilidade afetam a invasão intestinal e, conseqüentemente, os momentos iniciais da infecção sistêmica.
- Reatividade linfóide é observada com maior intensidade em órgãos de aves desafiadas com estirpes flageladas ($SENaI^f$ e $SE\Delta motB$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E.T.; MENCONI, A.; ROCHA, T. S.; MARIETTO-GONÇALVES, G. A. Pesquisa de *Salmonella* ssp. Em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 16, n. 1, p. 190-194, 2009.

AHMER, B.M.M.; GUNN, J.S. Interaction of *Salmonella* spp. with the intestinal microbiota. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.2, n.101, p. 1-9, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00101>>.

AIZAWA, S.I. Flagellar assembly in *Salmonella* typhimurium. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.19, n.1, p.1-4., 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.344874.x>>.

ALDRIDGE, P. D.; WU, C.; GNERER, J.; KARLINSEY, J. E.; HUGHES, K.; SACHS, M. S. Regulatory protein that inhibits both synthesis and use target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella* enterica. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n.30, p. 11340-11345, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602127103>>.

ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M.J. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis to chick gut explant. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.48, n. 8, p. 771-780, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/00222615-48-8-771>>.

ALLEN-VERCOE, E.; SAYERS, A. R.; WOODWARD, M. J. Virulence of *Salmonella enteric* serotype Enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 122, n. 3, p. 395-402, 1999. Disponível em :<<http://dx.doi.org/10.1017/S0950268899002460>>.

BARROW, P.A. The paratyphoid *Salmonellae*. **Revue scientifique et technique**, Paris, v.19, n.2, p. 339-352, 2000.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Eds.). **Doenças das Aves**. 2. Ed. Campinas: FACTA, 2009, p. 435-453

BERCHIERI, J.R.A.; MURPHY, C.E.; MARSTON, K.; BARROW, P.A. Observation on the persistence and vertical transmission of *Salmonella* enterica serovars Pullorum

and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, v.30, n.3, p. 221-231, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079450120054631>>.

BERG, H.C.; BLOCK, S.M.A miniature flow cell designed for rapid exchange of media under high-power microscope objectives. **Journal of General Microbiology**, London, v.130, n.11, p.2915-2920, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/00221287-130-11-2915>>.

BONIFIELD, H.R., HUGHES, K.T. Flagellar phase variation in *Salmonella* enterica is mediated by a postranscriptional control mechanism, **Journal of Bacteriology**, Washington, v.185, n.12, p. 3567-3574, 2003. Disponível em: <<<http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.12.3567-3574.2003>>>.

BRENNER, F.W.; VILLAR R.G.; ANGULA F.J.; TAUXE R.; SWAMINATHAN B. *Salmonella* nomenclature. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.38,n.7, pg.2465-7,2000

BUZZO C. L.; CAMPOPIANO J. C.; MASSIS L. M.; LAGE S. L.; CASSADO A. A.; LEME-SOUZA R.; CUNHA L. D.; RUSSO M.; ZAMBONI D. S.; AMARANTE-MENDES G. P.; BORTOLUCI K. R.A novel pathway for inducible nitric oxide synthase activation through inflammasomes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285, n.42, p.32087–32095, 2010. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.124297>>.

CARRASCO E., MORALES-RUEDA, A., GARCIA-GIMENO, R.M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research Internacional**, Ottawav. 45, n. 2, p. 545-556, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>>.

CARVER, T. J.; RUTHERFORD, K. M.; BERRIMAN1, M.; RAJANDREAM1, M.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J. ACT: The Artemis Comparison Tool. Oxford University Press, June, 2005.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2006. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA, 2010.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P. A.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary**

Immunology and Immunopathology, Amsterdam, v.128, n.1-3, p.53-59, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.295>>.

CHEVANCE, F. F.; HUGHES, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature reviews Microbiology**, Londres, v.6, n.6, p.455-465, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1887>>.

COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B.B. Type III secretion systems and disease. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v.20, n.4, p. 535-549, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00013-07>>.

CUMMINGS, L.A.; WILKERSON, W.; BERGSBAKEN, T.; COOKSON, B.T. In vivo, *fliC* expression of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium is heterogeneous regulated by ClpX, and anatomically restricted. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 61, n.3, p. 795-809, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05271.x>>.

DANIEL, W. W. In: _____. (Ed.). *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences* 5. ed. New York: John Wiley and Sons, 1991. 944 p.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.97, n.12, p.6640-6645., 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>>.

DIBB-FULLER, M.P.; WOODWARD, M.J. Contribution of fimbriae and flagella of *Salmonella* enteritidis to colonization and invasion of chicks. **Avian Pathology**, Houghton v.29, n.4, p. 295-304, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079450050118412>>.

ECHEITA, M.A.; HERRERA, S.; GARAIZAR, J.; USERA, M.A. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. **Research in Microbiology**, Amsterdam v. 153, n.2, p.107-113, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01295-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01295-5)>.

FOLEY, S.L.; JOHNSON, T.J.; RICKE, S.C. NAYAK, R.; DANZEINEN, J. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 77, n.4, p.582-607, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00015-13>>.

FERREIRA, E.O.; CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALBERTWHUM, F. Microbiologia, 5 ed. São Paulo. Atheneu, 2008, cap 43, p. 329-338

FREITAS, N.O.C.; SETTA, A.; IMRE, A.; BUKOVINSKI, A.; ELAZOMI, A.; KAISER, P.; BERCHIERI, JR.A.; BARROW, P.A.; 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, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.015>>.

GALAN, J.E. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annual review of cell and developmental biology**, Palo Alto, v. 17, p.53-86, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.53>>.

GAST, R.K. *Salmonella* Infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; McDOUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. Diseases of poultry. 10.ed. Ames: Iowa State University Press, 2008 MUDAR PARA MAIS RECENTE. p. 81-129.

GAY, N.J.; KEITH, F.J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. **Nature**, London, v.351, n.6325, p. 355-356, 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/351355b0>>.

GREENWOOD, P. E.; NIKULIN, M. S. A. Guide To Chi-Squared Testing. New York: John Wiley and Sons, 1996. p. 280.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars. 9. ed. Paris: Instituto Pasteur: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 2007. 166 p.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I., BOCKMÜHL, J., GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 1, p.26-29, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2009.10.002>>

HARVEY, P.C.; WATSON, M.; HULME, S.; JONES, M.A.; LOVELL, M.; BERCHIERI, JR.A.; YOUNG, J.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P.A. *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Colonizing the Lumen of the Chicken Intestine Grows Slowly and Upregulates a Unique Set of Virulence and Metabolism Genes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 79, n.10, p. 4105-4121, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01390-1>>.

HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity island 2. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.36, n.5, p. 1015-1023, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01935.x>>.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella* entérica. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v.294, n.2-3, p. 95-102, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>>.

HOLT, J G, KRIEG, N R, SNEATH, P H A , STALEY J T, WILLIAMS, S T. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 9th. Baltimore, Maryland; Willians and Wilkins, 1994, p.787, v.2.

IRINO, K. FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Revista Institucional de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n.3, p. 193-196, 1996. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651996000300005>>.

IQBAL, M.; PHILBIN, V. J.; WITHANAGE, G. S. K.; WIGLEY, P.; BEAL, R. K.; GOODCHILD, M. J.; BARROW, P.; McCONNELL, I.; MASKELL, D. J.; YOUNG, J.; BUMSTEAD, N.; BOYD, Y.; SMITH, A. L. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. **Infection and immunity**, Washington, v. 73, n. 4, p. 2344 - 2350, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.4.2344-2350.2005>>.

JANEWAY, C. A.; Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, p. 197-216, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>>.

JONES, B.D.; LEE, C.A.; FALKOW, L. Invasion by *Salmonella* typhimurium is affected by the direction of flagellar rotation. **Infection and Immunity**, Washington, v.60, n.6, p. 2475-2480, 1992.

KAISER, P., ROTHWELL, L., GALYOV, E.E., BARROW, P.A., BURNSIDE, J., WIGLEY, P.. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology**, Washington, v.146, n.12, p. 3217-3226, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1516-635X1703281-286>>.

KOJIMA, S.; IMADA, K.; SAKUMA, M.; SUDO, Y.; KOJIMA, C.; MINAMINO, T.; HOMMA, M.; NAMBA, K. Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.73, n.4, p. 710-718, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06802.x>>.

KOJIMA, S. Dynamism and regulation of the stator, the energy conversion complex of the bacterial flagellar motor. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.28, p.66-71, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.07.015>>.

KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ALCOCCER, I.; FARAH, S.; ABRAHÃO W.M.; RODRIGUES, D.P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmoneloses ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Sciences**, Maringá, v. 32, n.1, p. 9-15, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actascihealthsci.v32i1.6340>>.

LE MINOR, L. Genus 111 *Salmonella* Lignieres 1900, 389AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 427-458, 1984.

LEE, M.S.; KIM, Y. Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.76, p. 447-480, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060605.122847>>.

LOUIS, S.T.; MORSE, D.L.; POTTER, M.E.; DEMELFI, T.M.; GUZEWICH, J.J.; TAUXE, R.V.; BLAKE, P.A. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella* enteritidis infections. New implications for the control of salmonellosis. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.259, n.14, p. 2103-2107, 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/jama.1988.03720140023028>>.

MACNAB R. M. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. **Annual review of genetics**, Palo Alto. n.26, p.131-158, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.001023>>.

MACNAB, R. M. How bacteria assemble flagella. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.57, p.77-100, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832>>.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**,

Paris v. 2, n. 2, p. 145-156, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00273-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2)>.

MESSENS, W. Eggshell penetration by *Salmonella*: A review. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 61, p. 71–84, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1079/WPS200443>>.

MINAMINO, T, IMADA, K. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. **Microbial Trends in Microbiology**, v.23, n.5, p.267-274, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.011>>.

MONACK, D.M.; HERSH, D.; GHORI, N.; BOULEY, D.; ZYCHLINSKY, A.; FALKOW, S. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid fever. **The Journal of experimental medicine.**, New York, v.192, n.2, p. 249-258, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1084/jem.192.2.249>>.

MORIMOTO, Y.V.; NAKAMURA, S.; HIRAOKA, K.D.; NAMBA, K.; MINAMINO, T. Distinct roles of highly conserved charged residues at the motA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.195, n.3, p. 474-481, 2013. Disponível em :<<http://dx.doi.org/10.1128/JB.01971-12>>.

MORIMOTO, Y.V.; MINAMINO, T. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. **Biomolecules**, Basel, v.4, n.1, p. 217-234, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/biom4010217>>.

MURAMOTO, K.; MACNAB, R.M. Deletion analysis of MotA and MotB, componentes of the force-generating unit in the flagellar motor of *Salmonella*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.29, n.5, p.1191-1202, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00998.x>

PARKER, C.T.; GUARD PETER, J. Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenicity of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in chicks. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v.204, n.2, p. 287-291, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10899.x>.

POPPE, C. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella* in domestic animals. New York: CABI Publishing, 2000. cap. 7, p. 107-132.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Kauffmann- White Scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 147, n. 39, p. 765-769, 1996.

PUI, C.F.; WONG, W.C. ; CHAI, L.C; TUNUNG, R. ; JEYALETCHUMI, P.; NOOR HIDAYAH, M.S.; UBONG, A; FARINAZLEEN, M.G.; CHEAH, Y.K.; SON, R. *Salmonella*: A foodborne pathogen. **International Food Research Journal**, v.18, n.2, p. 465–473, 2011.

PULIDO-LANDINEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; NASCIMENTO, V.P. Assignment of serotype to *Salmonella* enterica isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 57, n.4, p. 288-294, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12110>.

RAMOS, H.C.; RUMBO, M.; SIRARD, J.C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends Microbiology**, Cambridge, v.12, n.11, p.509-517, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.09.002>.

REICHHART, J. TLR5 takes aim at bacterial propeller. **Nature Immunology**, New York, v.4, n.12, p. 1159-1160, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/doi/10.1038/ni1203-1159>.

REID, S. W.; LEAKE, M. C.; CHANDLER, J. H.; LO, C. J.; ARMITAGE, J. P.; BERRY, R. M. The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 21, p. 8066–8071, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/doi/10.1073/pnas.0509932103>.

RYCHLIK, J.;BARROW, P.A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, v.29, n.5, p. 1021-1040, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.005>.

RICHLYK, I.;ELSHEIMER-MATULOVA, M.; KYROVA, K. Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. **Veterinary Research**, Paris, v. 45, n.1, p. 119- 133, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0119-2>.

ROBERTSON, J.M.C.; MCKENZIE, N.H.; DUNCAN, M.; ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M.J.; FLINT, H.J.; GRANT, G. Lack of flagella disadvantages *Salmonella* enterica serovar Enteritidis during the early stages of infection in the rat.

Journal of Medical Microbiology, Edinburgh, v.52, n. 1, p.91-99, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.04901-0>>.

SAIF, Y. M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. Diseases of Poultry. 12. ed. Oxford: Blackwell publishin, 2008. 1409 p.

SALCEDO, S.P., NOURSADEGHI, M., COHEN, J., HOLDEN, D.W. Intracellular replication of *Salmonella* typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.3, n.9, p.587–597, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00137.x>>.

SAMATEY, F.A.; IMADA, K.; NAGASHIMA, S.; VODERVISZT, F.; KUMASAKA, T.; YAMAMOTO, M.; NAMBA, K. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. **Nature**, London, v.410, n. 6826, p.331-337, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35066504>>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold spring harbor , 2001. v.1, p. 31-50.

SCHMITT, C.K.; IKEDA, J.S.; DARNELL, S.C.; WATSON, P.R.; BISPHAM, J.; WALLIS, T.S.; WEINSTEIN, D.L.; METCALF, E.S.; O'BRIEN, A.D. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, n.9, p. 5619–5625, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.9.5619-5625.2001>>.

SCUR, M.C.; PINTO, F.G.S.; BONA, E.A.M.; WEBER, L.D.; ALVES, L.F.A.; MOURA, A.C. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, Abuja, v.9., n.9, p. 823-830, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2013.8202>>.

SEO, K.H.; HOLT, P.S.; BRACKETT, R.E.; GAST R.K.; STONE, H.D. Mucosal humoral immunity to experimental *Salmonella* enteritidis infection in the chicken crop. **Avian Diseases**, Ithaca, v.46, n.4, p. 1015-1020, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[1015:MHITES\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[1015:MHITES]2.0.CO;2)>.

SIMOES, M.; ROCHA, M.M.M.; PISANI, B.; PRANDI, M.A.G.; LEMES-MARQUES, E.G. *Salmonella* Enteritidis: importância do inquérito epidemiológico, análise de alimentos e coprocultura na elucidação de 167 surtos alimentares. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.69, n.4, p. 497-502, 2010.

SINAN net. SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2014.

SOWA Y, BERRY R.M. Bacterial flagellar motor. **Quartely Review Biophysics**, London, v.41, n.2, p.103-132, 2008. Disponível em: <dx.doi.org/10.1017/S0033583508004691>.

STECHER, B.; HAPFELMEIER, S.; MULLER, C.; KREMER, M.; STALLMACH, T.; HARDT, W.D. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. **Infection and Immunity**, Washington, n. 72, n.7, p. 4138-4150, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004>>.

STEELE-MORTIMER, O. Infection of epithelial cells with *Salmonella* entérica. **Methods in molecular biology**, Clifton, v. 431, p.201-211, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-032-8_16>.

SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella* enteritidis in poultry. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.21,n.1-2, p.89-105, 1994. Disponível em: <[10.1016/0168-1605\(94\)90203-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)90203-8)>.

TENNANT, S.M.; WANG, J.; GALEN, J.E.; SIMON, R.; PASETTI, M.F.; GAT, O.; LEVINE, M.M.; Engineering and preclinical evaluation attenuated nontyphoidal *Salmonella* strains serving as oral vaccines and as reagents strains. **Infection and Immunity**, Washington, v. 79, n.10, p. 4175-4185, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.05278-11>>.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS NETO, A.G. Manual de Técnicas para histologia normal e patológica. 2. Ed. Editora Manole, 2003.

VAN ASTEN, F. J.; HENDRIKS, H.G.; KONINKX, J.F.; VAN DIJK, J.E. Flagella-mediated bacterial motility accelerates but is not required for *Salmonella* serotype

Enteritidis invasion of differentiated Caco-2 cells. **Internacional Journal Medical Microbiology**, Jena, v.294, n.6, p.395–399, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.07.012>>.

VAN ASTEN, A.J.; VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS immunology and medical microbiology**., Amsterdam, v.44, n.3, p. 251-259, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsim.2005.02.002>>.

VAUGHN, L.E.; HOLT, P.S.; MOORE, R.W.; GAST, R.K.; ANDERSON, K.E. Crop immune response post-*Salmonella* enteritidis challenge in eight commercial egg-layer strains and specific-pathogen-free White Leghorn chickens. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 52, n.1, p. 79-87, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1637/1933-5334>>.

VOSS-RECH, D. ; VAZ, C. S. L. ; ALVES, L. ; COLDEBELLA, A. ; RODRIGUES, D. ; LEAO, J. A. ; BACK, A. . A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, Champaign, v. 94, n.3, p. 433-441, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps/peu081>>.

XIAO, Y.; LIU, F.; YANG, J.; ZHONG, M.; ZHANG, E.; LI, Y.; ZHOU, D.; CAO, Y.; LI, W.; YANG, Y.; YAN, H. Over-activation of TLR5 signaling by high-dose flagellin induces liver injury in mice. **Cellular and Molecular Immunology**, Beijing, v.12, n.6, p.729-742, 2014. Disponível em: <dx.doi.org/10.1038/cmi.2014.110>.

ZANCAN, F. B.; 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, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000300016>> .

WALLIS, T.E.; GALYON, E.E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.36, n. 5, p. 997-1005, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01892.x>>.

WASSENAAR, T.M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line? **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v.201, n.1, p. 1-7, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10724.x>>.

WHO - World Health Organization. *Salmonella* epidemiology, 2010. Disponível em: <<http://www.safe-poultry.com/Salmonellaepidemiology.asp>> Acesso em fevereiro, 2015.

WILLEY, J.; SHERWOOD, L.; WOOLVERTON, C. Prescott's Principles of Microbiology. New York, NY: McGraw-Hill. p. 57–58, 2009.

WING, J. P. Transduction by phage P22 in a recombination-deficient mutant of *Salmonella typhimurium*. **Virology**, New York, n.36, n.2, p.271-276, 1968. Disponível em: [http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(68\)90144-X](http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(68)90144-X).

YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. **Molecular Immunology**, Oxford, v.40, n.12, p. 861-868, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.006>>.

YANG, X.; THORNBURG, T.; SUO, Z.; ROBISON, A.; LI, J.; LIM, T.; CAO, L.; HOYT, T.; AVCI, R.; PASCUAL, D.W. Flagella overexpression attenuates *Salmonella* pathogenesis. **Plos one**. San Francisco, v.7, n.10, p. 91-99, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046828>>.

YIM, L.; SASÍAS, S.; MARTÍNEZ, A.; BETANCOR, L.; ESTEVEZ, V.; SCAVONE, P.; BIELLI, A.; SIROK, A.; CHABALGOITY, J.A. Repression of flagella is a common trait in field isolates of *Salmonella enterica* Serovar Dublin and is associated with invasive humans infections. **Infection and Immunity**, Washington, v. 82, n.4, p. 1465–1476, 2014. Disponível em: <dx.doi.org/10.1128/IAI.01336-13>.

YONEKURA, K.; MAKI-YONEKURA, S.; NAMBA, K. Complet atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopic. **Nature**, London, v. 424, n.6949, p.643-650, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature01830>>.

APÊNDICES

Tabela 1A: Média (log₁₀) do número de células viáveis (UFC/g) em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal de aves desafiadas com SE Δ *fliC*, SE Δ *motB*, e SE *Nal*^r em diferentes intervalos.

Dpi	SE Δ <i>fliC</i>			SE Δ <i>motB</i>			SE		
	F	B	C	F	B	C	F	B	C
2	1,12A± 1,63	0,0A± 0,0	2,45A± 3,44	0,4A±0,89	0,4A± 0,89	0,0A±0,0	0,4A± 0,89	0,6A± 1,34	2,65A± 2,72
3	0,4A± 0,89	0,4AB± 0,89	1,84B± 3,11	1,20A± 1,1	0,0B± 0,0	0,40B± 0,89	1,2A± 1,1	1,6A± 0,89	6,48A± 2,51
5	0,56A± 1,24	1,38A± 1,89	0,0B± 0,0	1,46A± 2,09	3,39A± 0,4	0,0B± 0,0	1,99A± 1,12	2,17A± 2,07	4,71A± 4,41
7	2,7A± 2,32	4,04A± 1,28	1,59A± 3,56	2,41A± 0,32	4,01A± 0,6	6,85A± 2,75	2,54A± 0,39	4,17A± 0,46	7,43B± 3,10
14	1,20A± 1,1	2,01A± 2,01	0,89A± 1,23	0,80A± 1,10	1,63A± 1,53	0,40A± 0,89	1,22A± 1,11	2,61A± 1,93	1,30A± 1,99
21	0,4A± 0,89	0,80A± 1,10	3,19A± 3,55	1,20A± 1,10	2,12A± 1,35	2,42A± 2,81	0,40A± 0,89	2,30A± 1,32	5,85A± 2,19
28	0,0A± 0,0	1,5A± 1,49	0,80A± 1,1	0,0A± 0,0	1,6A± 0,89	1,46A± 2,92	0,0A± 0,0	0,8A± 1,1	0,80A± 1,1

Dpi: dias pós-infecção; F= Fígado; B=Baço; C = Conteúdo cecal. Médias e desvio padrão da contagem bacteriana em fígado, baço e ceco em cada momento. *Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha para cada órgão diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1B—Alterações microscópicas observadas em inglúvio, fígado, ceco e íleo em diferentes períodos, em aves infectadas com a estirpe mutante SE $\Delta motB$.

DPI	Inglúvio															
	2				3				5				7			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hiperplasia epitelial		2	2	1	2	1	2			2	3		1	1	3	
Descamação epitelial	3			2	2	2	1		3	2			1	2	2	
Reatividade linfóide em lâmina própria	2	2	1		4	1			5					3	2	
Degeneração de camada muscular	1	3	1		1	3	1			4	1			1	4	
Hiperplasia de células musculares	3	2			2	3				4	1			1	4	
Infiltrado inflamatório na camada muscular	3	2			5				3	2			3	2		
Dpi	14				21				28							
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hiperplasia epitelial	1	4				5				5						
Descamação epitelial	5				5				5							
Reatividade linfóide em lâmina própria	2	2	1			1	4			4	1					
Degeneração de camada muscular	2	2	1		1	1	3		4	1						
Hiperplasia de células musculares	3	2			2	3			5							
Infiltrado inflamatório na camada muscular	2	1	2		1	3	1			4	1					

Dpi	Fígado															
	2				3				5				7			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Degeneração dos hepatócitos	5				4	1			4	1			3	2		
Áreas de necrose		2	3			2	3			3	2		2	2	1	
Céulas inflamatórias em região de necrose	3	2			3	2			4	1			4			
Reatividade linfóide em parênquima hepático	1	3	1		1	3	1		5					5		
Granulomas	5				5				4	1			5			
Hipertrofia das paredes dos vasos	5				5				2	3					5	
Congestão dos vasos e sinusóides	4	1			4	1			3	2			2	2	1	
Inflamação perivascular		1	4			1	4		2	3				2	3	
Dpi	14				21				28							
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++

Degeneração dos hepatócitos	3	2			3	2			1	4										
Áreas de necrose		2	3			2	3			3	2									
Céulas inflamatórias em região de necrose	1	3	1		1	4			1	2	2									
Reatividade linfóide em parênquima hepático	2	3			2	3			2	2	1									
Granulomas		5			1	3	1		4	1										
Hipertrofia das paredes dos vasos	4	1			4		1		4		1									
Congestão dos vasos e sinusóides	1	2	2			3	2			1	4									
Inflamação perivasculare		2	2	1		3	2			3	2									
Ceco																				
Dpi	2				3				5				7							
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear		1	2	2	3		1	1	3	2						2	2			
Desnudamento apical dos vilos	1	2	2		2	2	1		3		2				1	3				
Atrofia de vilosidade	3	1	1		1	2	1	1	2	1	1	1			1	3				
Edema de submucosa		2	3			1	2	2		2	2	1			1	1	1	1		
Dilatação linfática de submucosa	5				5				1	3	1				2	1				
Fusão dos vilos	3	1	2						3	1	1				1	1	1	1		
Dpi	14				21				28											
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear		2	2	1		1	1	3			1	4								
Desnudamento apical dos vilos	2	3			1	3	1		4	1										
Atrofia de vilosidade	3	2			4	1			3		2									
Edema de submucosa		3	1	1	4				4	1										
Dilatação linfática de submucosa			2	3		3	2		4	1										
Fusão dos vilos		1	4		2	3			3	1		1								
Íleo																				
Dpi	2				3				5				7							
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Atrofia de criptas	5				2	2	1		3	1	1				5					
Congestão de vasos	3	2			4	1			4		1				2	3				
Infiltrado inflamatório de mucosa	4	1				5	1			4	1				2	2	1			
Degeneração de camada muscular	2	3				4	1			5					3	2				
Alteração de cripta ?	2	1	2		2	3			3	1	1				3	2				
Hiperplasia de vasos linfáticos na submucosa		3	2		2		2	1	1	3	1				3				2	

Dpi	14				21				28			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Atrofia de criptas	4		1		5				4		2	
Congestão de vasos	5				2	1	1	1	4	1		
Infiltrado inflamatório de mucosa	1	1	3				2	3	1	1	3	
Degeneração de camada muscular	4	1			2	1	1	1	4		1	
Alteração de cripta ?			1	4	4	1			4	1		
Hiperplasia de vasos linfáticos na submucosa	5				1	2	2		2	2	1	

Tabela 2B – Alterações microscópicas observadas em inglúvio, fígado, ceco e íleo em diferentes períodos, em aves infectadas com a estirpe mutante SE $\Delta f/lC$.

DPI	Inglúvio															
	2				3				5				7			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hiperplasia epitelial	1	4			4			1		3	3		2	2	1	
Descamação epitelial			2	3		3	2		4	1				2	1	3
Reatividade linfóide em lâmina própria	3	2			3	2			5				1	1	3	
Degeneração de camada muscular	1	2	2			3	2			3	2			3	2	
Hiperplasia de células musculares	2	3			1	3	1		1	2	2			3	2	
Infiltrado inflamatório na camada muscular	4	1			2	3			3	2			1	2	2	

Dpi	Fígado															
	2				3				5				7			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hiperplasia epitelial	3	2			5				5							
Descamação epitelial	5				5				5							
Reatividade linfóide em lâmina própria			4	1		2	3			1	4					
Degeneração de camada muscular	1	4			2	2	1		1	2	2					
Hiperplasia de células musculares		5			3	2			1	3	1					
Infiltrado inflamatório na camada muscular	1	4			2	2	1			1	4					

Dpi	Fígado															
	2				3				5				7			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Degeneração dos hepatócitos	5				4	1			4	1			3	2		
Áreas de necrose		2	3			2	3			3	2		2	2	1	

Céulas inflamatórias em região de necrose	3	2			3	2			4	1			4		2	
Reatividade linfóide em parênquima hepático	1	3	1		1	3	1		5				5			
Granulomas	5				5				4	1			5			
Hipertrofia das paredes dos vasos	5				5				2	3					5	
Congestão dos vasos e sinusóides	4	1			4	1			3	2			2	2	1	
Inflamação perivascular		1	4			1	4		2	3			2	3		
Dpi	14				21				28							
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Degeneração dos hepatócitos	3	2			3	2			1	4						
Áreas de necrose		2	3			2	3			3	2					
Céulas inflamatórias em região de necrose	1	3	1		1	4			1	2	2					
Reatividade linfóide em parênquima hepático	2	3			2	3			2	2	1					
Granulomas		5			1	3	1		4	1						
Hipertrofia das paredes dos vasos	4	1			4		1		4		1					
Congestão dos vasos e sinusóides	1	2	2			3	2			1	4					
Inflamação perivascular		2	2	1		3	2			3	2					
Ceco																
Dpi	2				3				5				7			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear		2	2	3	5				2	1	2			1	4	
Desnudamento apical dos vilos		3	1	1	4	1			1	3	1			1	4	
Atrofia de vilosidade	1		3	1	1	2	1	1	1	2	1	1		1	1	3
Edema de submucosa				5			2	3		1	3	1		2	1	2
Dilatação linfática de submucosa	2	2	1		5				1	1	3			2	2	1
Fusão dos vilos	4	1							3	1	1			2	1	1
Dpi	14				21				28							
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear		1	3	1			4	1			2	3				
Desnudamento apical dos vilos		5			1	2	2		2	3						
Atrofia de vilosidade	5				2	2	1		1	3	1					
Edema de submucosa	2	3			5				5							
Dilatação linfática de submucosa	1	1	3		1	1	3		5							
Fusão dos vilos	1	1	3		1	4			2	2	1					
Íleo																

Dpi	2				3				5				7			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Atrofia de criptas	4	1			5				2	3			5			
Congestão de vasos	3	1	1		3	1	1		5				4	1		
Infiltrado inflamatório de mucosa	2	3			1	4			3	2				2	2	
Degeneração de camada muscular	1	2	2				3	2		3	1	1	1	1	3	
Alteração de cripta ?	3	2	2		2	3			4	1			2	2	1	
Hiperplasia de vasos linfáticos na submucosa	1	2	2		2		2	1	2	3			2	1	1	
Dpi	14				21				28							
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Atrofia de criptas	5				5				3	1	1					
Congestão de vasos	4	1			4	1			1	2	2					
Infiltrado inflamatório de mucosa			4	1	1	1	2	1			2	3				
Degeneração de camada muscular	4	1			2	3			5							
Alteração de cripta ?	1	3	1		5				3	2						
Hiperplasia de vasos linfáticos na submucosa	3		2		1	3	1		2	1	2					

Tabela 3B – Alterações microscópicas observadas em inglúvio, fígado, ceco e íleo em diferentes períodos, em aves infectadas com a estirpe selvagem SE.

DPI	Inglúvio															
	2				3				5				7			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hiperplasia epitelial	1	4			2	2		1	4	1			1	2	2	
Descamação epitelial			1	4		1	3	1	3	2				2	2	1
Reatividade linfóide em lâmina própria	4	1			4		1		3	2			2	2	1	
Degeneração de camada muscular		1	2	1	1	3	1			3	2		1	1	3	
Hiperplasia de células musculares	1	3	1		2	3				3	2			2	3	
Infiltrado inflamatório na camada muscular	4	1			3	2			3	2			3	2		
Dpi	14				21				28							
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hiperplasia epitelial	5				3	2			5							
Descamação epitelial	4	1			1	1	3		5							

Reatividade linfóide em lâmina própria	2	1	2		1	2	2			1	4							
Degeneração de camada muscular	2	2	1		1	2	2			3	2							
Hiperplasia de células musculares	1	3	1		2	3				4	1							
Infiltrado inflamatório na camada muscular	1	3	1		1	4				3	1	2						
Fígado																		
Dpi	2				3				5				7					
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++		
Degeneração dos hepatócitos	3		2		2	2	1			5				1	4			
Áreas de necrose	5	2	2	1	1	2	2			3	2			1	1	1	2	
Céulas inflamatórias em região de necrose					5					4	1			5				
Reatividade linfóide em parênquima hepático	4	1			4	1				3	2			1	2	1	1	
Granulomas	5				5					5				5				
Hipertrofia das paredes dos vasos	5				5					3	2			4		1		
Congestão dos vasos e sinusóides	4	1				3	2			1	3	1			3	2		
Inflamação perivascular		3	2			4	1				5				2	2	1	
Dpi	14				21				28									
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++		
Degeneração dos hepatócitos		3	2		4	1				1	3	1						
Áreas de necrose	1	4				3	2					5						
Céulas inflamatórias em região de necrose	1		4			3	2				2	3						
Reatividade linfóide em parênquima hepático		3	1	1		4	1				5							
Granulomas	3	2				2	3			5								
Hipertrofia das paredes dos vasos	5				3	2				3	1	1						
Congestão dos vasos e sinusóides		1	3	1	2		3				4	1						
Inflamação perivascular			4	1		3	2				4	1						
Ceco																		
Dpi	2				3				5				7					
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++		
Infiltrado inflamatório mononuclear	1	2	1	1		2	2	1		3	1	1			2	2	1	
Desnudamento apical dos vilos		2	2	1		3	2			2	2	1			3	2		
Atrofia de vilosidade	2	3			1	2	2			1		4			4	1		
Edema de submucosa		1	2	2		1	3	1		1	4				1	2	1	1
Dilatação linfática de submucosa	1	1	2	1	2	1	2			3	1		1		2		3	
Fusão dos vilos	3	1		1							5				1	2	2	

Dpi	14				21				28			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear		3	1	1			3	2			2	3
Desnudamento apical dos vilos	1	2	2		2	3			1	4		
Atrofia de vilosidade	2	1	2		2	2	1		4	1		
Edema de submucosa	4		1		5				5			
Dilatação linfática de submucosa	3	1	1				5			4		1
Fusão dos vilos		3		2	3	1	2		4			1

Íleo

Dpi	2				3				5				7			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Atrofia de criptas	5				5				2	3			4	1		
Congestão de vasos	5				5				5				1	3	1	
Infiltrado inflamatório de mucosa		3	1	1		4	1		1	1	3				3	2
Degeneração de camada muscular		1	4			1	4			2	3		1	3	1	
Alteração de cripta ?	3	2			5				2	3			3	1	1	
Hiperplasia de vasos linfáticos na submucosa		1	1	3	2	2	1		2	3			1	2	2	

Dpi	14				21				28			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Atrofia de criptas	4	1			5				5			
Congestão de vasos		4		1		1	1	3	2	2	1	
Infiltrado inflamatório de mucosa		1	2	2		1	3	1		1	3	1
Degeneração de camada muscular	4	1			4	1			5			
Alteração de cripta ?	2	3			3	2			2	3		
Hiperplasia de vasos linfáticos na submucosa	1	2	2		1	2	2			2	3	