

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

**UTILIZAÇÃO DE UM MUTANTE ATENUADO DE
Salmonella enterica subesp. *enterica* sorovar
GALLINARUM $\Delta cobS \Delta cbiA$ PARA PROTEÇÃO DE AVES
CONTRA A INFECÇÃO POR *Salmonella enterica* subesp.
enterica sorovares GALLINARUM E ENTERITIDIS.**

Rafael Antonio Casarin Penha Filho

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

- 2009 -

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

**UTILIZAÇÃO DE UM MUTANTE ATENUADO DE
Salmonella enterica subesp. *enterica* sorovar
GALLINARUM $\Delta cobS \Delta cbiA$ PARA PROTEÇÃO DE AVES
CONTRA A INFECÇÃO POR *Salmonella enterica* subesp.
enterica sorovares GALLINARUM E ENTERITIDIS.**

Rafael Antonio Casarin Penha Filho

Prof. Dr. Angelo Berchieri Jr.

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 (Patologia Animal)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

- Fevereiro 2009 -

Penha Filho, Rafael Antonio Casarin
P399u Utilização de um mutante atenuado de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar GALLINARUM $\Delta cobS\Delta cbiA$ para proteção de aves contra a infecção por *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovares GALLINARUM E ENTERITIDIS / Rafael Antonio Casarin Penha Filho. -- Jaboticabal, 2009
viii, 72 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Ângelo Berchieri Junior
Banca examinadora: Nilce Maria Soares Queiroz Gama, Manoel Victor Franco Lemos
Bibliografia

1. *Salmonella enterica*. 2. Vacina. 3. Aves. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.981.49:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO – Nascido em 12 de janeiro de 1984, natural de Jundiaí, Estado de São Paulo, formou-se em Medicina Veterinária em janeiro do ano de 2007, pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP/Jaboticabal. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da FAPESP de julho de 2004 a junho de 2006, tendo desenvolvido o trabalho “ Via alternativa de recepção de elétrons em *Salmonella enterica* serovar Gallinarum durante a fase sistêmica da infecção de aves”. Ingressou no mestrado em março de 2007, na FCAV/UNESP/Jaboticabal no programa de Medicina Veterinária na área de Patologia Animal, com ênfase em ornitopatologia e Salmoneloses aviárias.

Email: rafaelpenha12@yahoo.com.br

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de
vencer”

Mahatma Gandhi

À minha família, meu pai Rafael Antonio Casarin Penha, mãe Luci Aparecida Souza pelo amor, paciência e apoio durante a realização do curso

À minha avó Anália Batista Souza (*in memoriam*) por dedicar-me o amor mais puro e incondicional que existe

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Angelo Berchieri Junior pela amizade, paciência, orientação e pela fé creditada em meu trabalho;

Aos Professores Hélio Montassier e Manoel Victor pela disponibilidade, apoio e pelas sugestões para a melhoria da dissertação;

Aos amigos de trabalho do departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal: Dna. Cida, Sr. Antonio, Oliveira, Jacqueline, Adriana, Mariana, Juliana e Vânia pelo apoio;

Aos funcionários da FCAV: Robson, Vicente, Sandra, Sr. Oswaldo, Téo, Edgar e João pela ajuda e disponibilidade;

Aos amigos Kleber, André, Igor, Daniel, Fábio, Miguel, Péricles e Cínthia pelo incentivo;

À Elaine Talita Santos pelo apoio e carinho;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do curso.

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Classificação de <i>Salmonella</i>	3
2.2. Salmoneloses e sua importância econômica em avicultura.....	3
2.3. Metabolismo bacteriano e a síntese de cobalamina.....	5
2.4. Medidas de controle da infecção por <i>Salmonella</i> spp. em aves.....	8
III. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivos Gerais.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Preparo dos Mutantes.....	20
4.2. Teste genotípico da cepa vacinal SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ para a detecção da deleção nos genes <i>cobS</i> e <i>cbiA</i>	20
4.2.1. <i>Primers</i>	20
4.2.2. PCR.....	21
4.2.3. Eletroforese.....	21
4.3. Ensaio <i>in vivo</i>	22
4.3.1. Cepas bacterianas.....	22
4.3.2. Preparo dos inóculos.....	22
4.3.3. Aves.....	23
4.4. Avaliação da infecção de aves por SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em comparação com a cepa de SG original.....	23
4.4.1. Experimento 01: Avaliação da mortalidade.....	23
4.4.2. Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica.....	24

4.5. Avaliação do potencial do mutante SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ como cepa vacinal sobre a cepas selvagens de SG e SE.....	25
4.5.1. Experimento 03: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ contra a infecção por SG.....	25
4.5.2. Experimento 04: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ contra a infecção por SE.....	25
4.5.3. Experimento 05: Prevenção da colonização intestinal e invasão dos órgãos por SE pela inoculação prévia de SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ em aves de um dia de vida.....	27
4.6. Análise estatística.....	28
V. RESULTADOS.....	29
5.1. Teste genotípico da cepa vacinal SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ para a detecção da deleção nos genes <i>cobS</i> e <i>cbIA</i>	29
5.2. Avaliação da infecção de aves por SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ em comparação com a cepa de SG original.....	30
5.2.1. Experimento 1: Avaliação da mortalidade.....	30
5.2.2. Experimento 2: Avaliação da infecção sistêmica.....	32
5.3. Avaliação do mutante SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ como cepa vacinal contra a infecção pelas cepas selvagens de SG e SE.....	34
5.3.1. Experimento 3: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ contra a infecção por SG.....	34
5.3.2. Experimento 4: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ contra a infecção por SE.....	36

	5.3.3. Experimento 5: Prevenção da colonização intestinal e invasão dos órgãos por SE pela inoculação prévia de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em aves de um dia de vida	39
VI.	DISCUSSÃO.....	40
VII.	CONCLUSÕES.....	48
VIII.	REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Mortalidade de aves vermelhas comerciais para postura, desafiadas experimentalmente no quinto dia de vida com cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em comparação com a cepa selvagem SGNal ^r	31
Tabela 2- Número (Log ₁₀) de células viáveis (UFC/g) de <i>Salmonella Gallinarum</i> em baço e fígado de aves vermelhas comerciais para postura, desafiadas no quinto dia de vida com cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ ou com a cepa selvagem (SGNal ^r).....	33
Tabela 3- Mortalidade de aves vacinadas oralmente com cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ e desafiadas oralmente com a cepa selvagem SGNal ^r	35
Tabela 4- Número de suabes positivos após a inspeção da cloaca de aves brancas para postura, para detecção de SENal ^r Spec ^r utilizada como cepa desafio após a vacinação de aves com cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$	37
Tabela 5- Contagem (Log ₁₀) do número de células viáveis (UFC/g) da cepa desafio SENal ^r Spec ^r , em baço, fígado e conteúdo cecal de aves brancas para postura, vacinadas oralmente com cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$	38
Tabela 6- Número (Log ₁₀) de células viáveis (UFC/g) de SENal ^r Spec ^r no conteúdo cecal de oito aves sacrificadas cinco dias após desafio por contato.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

γ/d – gama/delta

Ado-CBL – adenosilcobalamina, coenzima B₁₂

CN-CBL – cianocobalamina, vitamina B₁₂

CRP/cAMP – proteína receptora de AMP cíclico

SG – *Salmonella* Gallinarum

SGNaI^r – Cepa selvagem de *Salmonella* Gallinarum resistente ao ácido nalidíxico

SE – *Salmonella* Enteritidis

SENaI^rSpec^r – Cepa selvagem de *Salmonella* Enteritidis resistente ao ácido nalidíxico e à espectomicina

SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ – *Salmonella* Gallinarum com deleção em parte dos genes *cobS* e *cbiA*

STM – *Salmonella* Typhimurium

STM F98 $\Delta cobS \Delta cbiA$ – *Salmonella* Typhimurium com deleção em parte dos genes *cobS* e *cbiA*

UTILIZAÇÃO DE UM MUTANTE ATENUADO DE *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar GALLINARUM $\Delta cobS\Delta cbiA$ PARA PROTEÇÃO DE AVES CONTRA A INFECÇÃO POR *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovares GALLINARUM E ENTERITIDIS.

RESUMO: *Salmonella* Gallinarum (SG) causa o Tifo Aviário, uma doença caracterizada por alta mortalidade e morbidade em aves. *Salmonella* Enteritidis (SE) é uma salmonela paratífica, capaz de acometer aves e mamíferos. Carne de aves e ovos são as principais fontes de transmissão de SE, causando doença transmitida por alimentos em humanos. O controle destas bactérias nas criações avícolas é feito através da combinação de medidas sanitárias e a vacinação das aves. As vacinas vivas mostram-se melhores do que as inativadas para combater esses sorotipos, no entanto, a proteção contra SE, é parcial. A cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ é incapaz de sintetizar vitamina B₁₂. A ausência dessa substância prejudicou a sobrevivência da bactéria no organismo parasitado, causando atenuação na virulência. Neste trabalho, foram avaliadas a mortalidade e a infecção sistêmica causadas por SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em comparação com uma cepa selvagem de SG. Também foi avaliado seu potencial vacinal contra SG e SE em aves de postura e sua utilização para impedir a colonização cecal por SE em pintinhos de corte de um dia. As aves de postura foram vacinadas com uma dose aos cinco dias, ou com duas doses aos cinco e vinte e cinco dias de vida e foram desafiadas com as respectivas cepas de SG e SE aos 45 dias de vida. As aves que receberam tanto uma quanto duas doses da cepa vacinal foram parcialmente protegidas contra SG. A proteção contra SE foi significativa no grupo de aves que recebeu duas doses de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$. Porém, a inoculação de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em pintinhos com um dia de vida não impediu a colonização do ceco por SE. A cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ demonstrou ter potencial vacinal contra SG e SE.

Palavras-Chave: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, Mutante , Vacina, Aves, Atenuação

UTILIZATION OF THE ATTENUATED MUTANT STRAIN *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar GALLINARUM $\Delta cobS\Delta cbiA$ FOR THE PROTECTION OF POULTRY AGAINST THE INFECTION BY *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars GALLINARUM AND ENTERITIDIS.

SUMMARY: *Salmonella* Gallinarum (SG) causes Fowl Typhoid, a disease characterized by high mortality and morbidity rates in poultry. *Salmonella* Enteritidis (SE) is a paratyphoid salmonellae that infects birds and mammals. Poultry meat and eggs are the main sources of transmission of SE, causing foodborne disease in humans. The control of these bacterias inside the avian breeding sites is done by the combination of sanitary measures and poultry vaccination. Live vaccines have demonstrated greater efficacy on the protection of poultry against these serovars than the killed vaccines, though, protection against SE is still partial. The strain SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ is incapable to synthesize vitamin B₁₂. The absence of this substance harmed the bacterial survival in the infected organism, causing attenuation of the virulence. On this work, the mortality and the sistemic infection by SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ were measured and compared with a wild strain of SG. It was also evaluated the potential use of the attenuated strain as a vaccine against SG and SE in laying hens and its utilization to prevent the colonization of the ceca by SE on 1-day-old chickens. The laying hens were vaccinated with one dose at 5-day-old, or with two doses at 5 and 25-day-old and were challenged at 45-day-old with the respective strain of SG or SE. The vaccination either with one or two doses was able to protect the birds against challenge with SG. The administration of two doses of SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ protected the laying hens against SE. Although, the inoculation of SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ by oral gavage on newly hatched chicks was unable to prevent the colonization of the ceca by SE. The protection conferred by the strain SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ demonstrated its potential to be used as a vaccine.

Palavras-Chave: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, Mutant, Vaccine, Poultry, Attenuation

I. INTRODUÇÃO

A atividade avícola organizou-se de forma intensiva no início da década de 1960. Hoje, a indústria avícola, produz cerca de 60 milhões de toneladas de carne ao ano no mundo todo. No Brasil, desde 2006, a carne de frango é o produto de origem animal com o maior volume de exportações. Este crescimento tem que ser acompanhado pela evolução dos conhecimentos, principalmente ligados ao bem-estar e à sanidade animal. A criação animal moderna explora aspectos como a potencialização da criação no menor espaço possível, favorecendo a introdução e a disseminação de patógenos, que poderão permanecer no ambiente por tempo indeterminado e o aparecimento de doenças nas aves. As salmoneloses são de difícil controle e podem provocar zoonoses. As salmonelas paratíficas são transmitidas para o homem através do consumo de alimentos contaminados e causam intoxicação alimentar. A carne de frango e os ovos estão implicados como os principais meios de transmissão para seres humanos, principalmente de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (STM).

Salmonella Gallinarum (SG) é um sorotipo hospedeiro-específico de aves, altamente invasivo e causa o Tifo Aviário. Provoca alta mortalidade, gerando enormes prejuízos para a indústria avícola. SE é inespecífica quanto ao hospedeiro e a infecção de aves não provoca, necessariamente, o aparecimento de sinais clínicos da doença, tornando necessário o constante monitoramento da infecção por esta bactéria nos lotes.

O controle de SG e SE nos lotes de aves é muito complicado, uma vez que a *Salmonella* pode atingir toda a escala de produção (aves de corte, galinhas poedeiras e aves reprodutoras) e a transmissão de SE pode ser tanto vertical quanto horizontal, considerando-se que a ave pode excretar uma elevada quantidade de bactérias pelas fezes, contaminando o ambiente e infectando outras aves.

O tratamento com antibiótico foi proibido na Europa e seu uso é cada vez menor em outros continentes, principalmente em países exportadores, como o Brasil. Assim, as medidas de prevenção tomadas contra as salmoneloses, constam de várias

ferramentas utilizadas de forma combinada, como a desinfecção das instalações, controle de roedores e a vacinação, para garantir um resultado satisfatório.

A vacinação de aves de produção contra *Salmonella* spp. é uma tentativa de diminuir a colonização intestinal e a subsequente excreção da bactéria no meio ambiente pelas fezes, diminuir a colonização dos órgãos internos (incluindo o ovário) e diminuir a contaminação do conteúdo e da casca dos ovos produzidos.

Existem dois tipos de vacinas disponíveis no mercado, as bacterinas, que são constituídas por células inativadas ou subunidades de *Salmonella* e as vacinas vivas, contendo cepas atenuadas.

Com os recentes avanços em pesquisa, novas vacinas tem sido lançadas, mas a maioria dos testes realizados mostram apenas uma proteção parcial. Nenhuma vacina mostrou-se capaz de conter completamente infecções por sorotipos heterólogos de *Salmonella*.

Considerando as colocações acima, este projeto investigou a utilização da cepa atenuada SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, um mutante metabólico incapaz de sintetizar cobalamina, como uma cepa vacinal contra cepas virulentas de SG e SE.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação de *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, bastonetes gram-negativos e oxidase negativas. O gênero *Salmonella* consiste de duas espécies, *Salmonella enterica* e *S. bongori*, possuindo mais de 2400 sorotipos conhecidos. *Salmonella enterica* se divide em seis subespécies: *S. enterica* subesp. *enterica*, *S. enterica* subesp. *salamae*, *S. enterica* subesp. *arizonae*, *S. enterica* subesp. *diarizonae*, *S. enterica* subesp. *houtenae*, *S. enterica* subesp. *indica*. (FORSHELL & WIERUP, 2006).

2.2. Salmoneloses e sua importância econômica em avicultura

Salmonella spp. causa doença tanto em humanos quanto em animais. Os sorotipos *S. enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum (SG) e *S. enterica* subesp. *enterica* sorovar Pullorum (SP) são hospedeiro-específicos e causam graves infecções sistêmicas em aves, o Tifo Aviário e a Pulorose, respectivamente. A especificidade de SG com as aves parece ser decorrente da relação entre essa bactéria e o sistema mononuclear-fagocítico do hospedeiro (BARROW *et al.*, 1994). No entanto, é provável que outros fatores, como a interação com o epitélio intestinal, tenham relação com a especificidade (PASCOPELLA *et al.*, 1995; KAISER *et al.*, 2000).

A *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) está entre as salmonelas paratíficas. Este sorotipo causa doença em humanos através do consumo de produtos de origem avícola, gerando prejuízos para a indústria, governo e a população afetada. Nos Estados Unidos da América (EUA), o número de infecções por

Salmonella spp. reportado anualmente aos Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), chega a aproximadamente 40.000, destes, cerca de 18% são causados por SE (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007). Contudo, estima-se que os números sejam mais expressivos, chegando a 1,4 milhões de casos, 16.430 hospitalizações e 582 mortes (MEAD *et al.*, 1999; VOETSCH *et al.*, 2004). O grande número de casos de salmonelose humana, principalmente os causados por SE, tornaram esta doença uma questão de saúde pública internacional de grande importância econômica (RODRIGUE *et al.*, 1990; DUGUID & NORTH, 1991). A infecção por SE não apresenta necessariamente os sinais clínicos da doença nas aves, desta forma, é necessário a monitoria dos lotes para a detecção da bactéria. Porém, algumas cepas, são reconhecidamente mais perigosas, como o fagotipo 4 (PT4), que foi associado com o aumento da morbidade e da mortalidade entre aves no Reino Unido (BARROW *et al.*, 1987; LISTER, 1988; O'BRIEN, 1988; GAST & BEARD, 1990; KELLER *et al.*, 1995; POPPE, 2000) e nos Estados Unidos (KINDE *et al.*, 1996a,b).

O ambiente de criação das aves comerciais é propício para o aparecimento de vários sorotipos de *Salmonella*, mesmo assim, a SE se sobressai por conseguir contaminar os ovos facilmente (SOERJADI-LIEM & CUMMING, 1984; CALDWELL *et al.*, 1995; BYRD *et al.*, 1999). A pandemia de SE envolve a interação do patógeno com muitos ambientes, que incluem os galpões, as aves, os ovos, assim como o hospedeiro humano. A identificação e a eliminação das aves positivas foram medidas eficazes na eliminação da SG e SP nos EUA e Reino Unido, mas a chance de funcionarem para reduzir a incidência de SE é pequena. A re-introdução deste patógeno, em lotes de aves negativas e em instalações adequadamente limpas, é sempre ameaçada por pragas (roedores, insetos e aves silvestres), os principais contribuidores para a contaminação dos ovos (GUARD-PETTER, 2001). No entanto, a estratégia ideal para o controle da SE poderia ser o estabelecimento da imunidade nas aves através da vacinação (BAUMLER *et al.*, 2000).

2.3. Metabolismo bacteriano e a síntese de Cobalamina

Para completar seu ciclo, as bactérias precisam se adaptar às condições disponíveis para sobrevivência e multiplicação no ambiente em que se encontram; seja no meio ambiente, seja durante a invasão de seres vivos. O sistema respiratório bacteriano é modulado para alterar rapidamente o seu funcionamento, conforme as condições encontradas e a disponibilidade de substratos para a obtenção de energia. Assim sendo, as bactérias conseguem superar as adversidades ambientais e utilizar os substratos disponíveis. Faz parte da habilidade para superar as adversidades ambientais, a alteração da composição do sistema respiratório. Componentes da membrana celular alteram-se conforme a necessidade e a disponibilidade de substratos no meio em que se encontram. O conhecimento a respeito do processo de respiração em anaerobiose é importante no sentido de que a sobrevivência de *Salmonella* no organismo animal (ou mesmo em seres humanos), intracelular ou no trato entérico, ocorre em ambiente estritamente anaeróbico. Portanto, além dos mecanismos de patogenicidade (JONES *et al.*, 2001), sua sobrevivência depende da capacidade de utilizar os substratos disponíveis para se manter viva. A elucidação do metabolismo bacteriano pode ser útil para conhecer melhor o mecanismo utilizado pela bactéria para sobreviver no hospedeiro.

Durante a aerobiose, as enzimas da cadeia de transporte de elétrons (NADH *desidrogenase*, citocromo *oxidases*), que utilizam o oxigênio como aceptor de elétrons, são necessárias para o crescimento bacteriano na fase estacionária (BARROW *et al.*, 1996; ZHANG-BARBER *et al.*, 1997) e para virulência (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2004). No entanto, foi observado que mutantes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (STM), contendo alterações em genes que expressam componentes da cadeia aeróbica (*nuo*, *cyd*, *cyo*) em adição da sintase ATP colonizaram o trato digestivo tão eficientemente como a cepa original (TURNER *et al.*, 2003). Diante dessas circunstâncias, postula-se que o metabolismo energético possa ser fermentativo ou que

a respiração utiliza uma via alternativa de aceptores de elétrons, a respiração anaeróbica.

De fato, a via alternativa de aceptores de elétrons, é a principal forma de obtenção de energia para o crescimento das bactérias que se encontram em ambientes anaeróbicos, por exemplo, as enterobactérias. A respiração bacteriana em anaerobiose se dá pela degradação enzimática de substratos encontrados no meio, como fontes de carbono, nitrogênio e enxofre.

A importância dos genes *cobS* ou *cbiA* na patogenicidade de SG ainda não foi investigada. Estes genes participam da via de biossíntese de vitamina B₁₂ [cianocobalamina (CN-CBL)], que ocorre em anaerobiose. A importância e complexidade desta substância única, ficam claras quando leva-se em conta a quantidade de genes que participam de sua síntese, os quais ocupam cerca de 1% do genoma bacteriano (PRICE-CARTER *et al.*, 2001).

A biossíntese de cobalamina só é encontrada entre organismos procarióticos, aeróbicos, anaeróbicos e anaeróbicos facultativos, incluindo-se *Salmonella enterica*. Esta macromolécula constitui-se em nutriente essencial para a vida de animais e seres humanos. Em *Salmonella Typhimurium*, sua síntese ocorre em condições de anaerobiose, podendo ser sintetizada em aerobiose ou anaerobiose quando a bactéria for suprida com as substâncias precursoras como *cobinamide* (JETER *et al.*, 1984). As vias de produção da vitamina B₁₂ são muito complexas, requerendo a atividade catalítica de aproximadamente 30 enzimas (ANDERSSON, 1995). Destas, 25 são codificadas pelo *operon cob* (ESCALANTE-SEMERENA *et al.*, 1992; ROTH *et al.*, 1993). A expressão do *operon cob* é regulada por pelo menos seis agentes efetores: potencial óxido-redução, AMP cíclico (cAMP), propanediol, etanolamina, tetrionato e cobalamina (ESCALANTE-SEMERENA & ROTH, 1987; RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1994; PRICE-CARTER *et al.*, 2001). Um baixo potencial redox, gerado durante o crescimento anaeróbico da bactéria, é suficiente para aumentar a expressão do *operon cob* entre 4 e 100 vezes (ESCALANTE-SEMERENA & ROTH, 1987; ANDERSSON & ROTH, 1989a,b). A presença de cobalamina, quando ela se encontra sob a forma de coenzima B₁₂ (Ado-CBL) reprime a expressão do *operon cob* (LUNDRIGAN &

KADNER, 1989; ESCALANTE-SEMERENA *et al.*, 1990). O *operon* responsável pela biossíntese de Ado-CBL contém 17 genes CbiA-P, que estão envolvidos na produção da porção inicial da molécula (anéis *corrin*) e genes envolvidos na integração do nucleotídeo à *cobinamide* (*cobACDUST*) (ROTH *et al.*, 1993; WARREN *et al.*, 2002). As salmonelas são bactérias anaeróbicas facultativas capazes da biossíntese de cobalamina (CBL) durante o crescimento em anerobiose. CbiA (ácido cobirínico a,c-*diamido sintetase*) é a primeira *glutamina aminotransferase* na via anaeróbica para a biossíntese de vitamina B₁₂. Esta enzima chama a atenção por catalisar reações químicas em diversos pontos do substrato. O gene *cbiA* também é responsável, indiretamente, pela regulação negativa (repressão) de todo o *operon cob*. A presença de vitamina B₁₂ reprime a expressão de *cbiA* durante o início da fase de tradução nos ribossomos, desta forma, consegue reprimir a expressão de todo o *operon cob*, que cessa a produção de cobalamina (RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1994). A enzima CobS (*Adenosilcobalamina-5'-P sintetase*) fica localizada na membrana celular e catalisa o penúltimo passo da produção de Ado-CBL (MAGGIO-HALL *et al.*, 2004). A produção de cobalamina é completamente dependente desta enzima (MAGGIO-HALL & ESCALANTE-SEMERENA, 1999; ANDERSON *et al.*, 2008).

O *operon pdu*, que codifica enzimas para a utilização de propanediol como fonte de carbono e energia, fica localizado adjacente ao *operon cob*. A indução da expressão de ambos os *operons* aumenta em até 10 vezes quando propanediol é encontrado no meio. O controle da indução é mediado por uma proteína de regulação positiva (PocR), a qual é codificada por um gene posicionado entre os *operons cob* e *pdu* (BOBIK *et al.*, 1992; RONDON & ESCALANTE-SEMERENA, 1992). A proximidade e o controle coordenado destes *operons* reflete o fato de que a vitamina B₁₂ é essencial para a degradação do propanediol (TORAYA *et al.*, 1979; JETER, 1990). A co-regulação destes *operons* também reforça a hipótese de que a maior função da vitamina B₁₂, em *Salmonella* spp., seria atuar no catabolismo de fontes de carbono.

O gene *crp* codifica a proteína receptora de AMP cíclico (CRP/cAMP), um importante mensageiro citossólico envolvido na regulação de vários genes com funções catabólicas, incluindo o *operon cob*. Durante o crescimento anaeróbico em meio pobre

em fontes de carbono, como o piruvato, CRP/cAMP é necessária para a máxima indução do gene *pocR* e dos operons *cob* e *pdu* (Ailion *et al.*, 1993). Segundo Rosu *et al.* (2007), uma cepa mutante de SG com deleção no gene *crp* tornou-se atenuada e não causou mortalidade ou o aparecimento de sinais clínicos em aves. A biossíntese da vitamina B₁₂ em *Salmonella* spp. é dependente do sistema CRP/AMP cíclico (LAWRENCE & ROTH, 1996), dessa forma, a atenuação desta cepa pode estar relacionada à baixa indução para a expressão do operon *cob* e de outros operons ligados ao catabolismo de fontes energéticas.

A deleção dos genes *cobS* e *cbiA* ($\Delta cobS\Delta cbiA$) na *Salmonella*, impossibilita a produção de cobalamina, em condições anaeróbicas (RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1994). No entanto, a relação exata desta substância, ou de algum passo da sua via de biossíntese com a virulência bacteriana ainda não foi estabelecida, mas as razões para a atenuação da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ podem ser: dificuldades para sobreviver no intestino ou invadir o organismo pela parede intestinal; destruição mais eficiente desta cepa pelos macrófagos dos órgãos; ou a multiplicação lenta.

2.4. Medidas de controle da infecção por *Salmonella* spp. em aves

Os fatores de virulência das salmonelas hospedeiro-específicas são expressos para que a bactéria consiga sobreviver no interior das células. Para infectar o hospedeiro, *Salmonella* utiliza estes fatores durante todo seu ciclo. Os mecanismos de virulência conhecidos atuam em etapas como invasão do hospedeiro, colonização, sobrevivência, replicação e até a destruição dos macrófagos (LIBBY *et al.*, 2000). A atenuação na virulência da bactéria pode estar relacionada a defeitos em qualquer uma destas etapas ou em mais de uma ao mesmo tempo.

Estudos realizados por PAIVA *et al.* (2007), demonstraram que a deleção em dois genes, *cobS* e *cbiA*, de *S. Gallinarum* (SG $\Delta cobS\Delta cbiA$), tornou a cepa apatogênica, não provocando mortalidade em aves; e esta atenuação tem provável

ligação com a extinção da produção de cobalamina durante a fase intracelular, prejudicando sua sobrevivência dentro dos macrófagos (FIELDS *et al.*, 1986; BUCHMEIER & HEFFRON, 1989).

Estudos relacionados ao conhecimento genotípico de salmonelas e a expressão de seu comportamento podem ajudar a conhecer melhor a relação parasita-hospedeiro com as aves. Embora os sorotipos de *Salmonella*, Gallinarum, Pullorum e Enteritidis, tenham muitas características em comum, a relação parasita-hospedeiro com as aves difere entre eles (BERCHIERI JR *et al.*, 2001a,b; PINHEIRO *et al.*, 2001). SP e SG são imóveis e indistinguíveis antígenicamente; contudo, provocam enfermidades diferentes. SE é móvel, mas apresenta a mesma composição antigênica de SP e SG, embora bioquimicamente, apresente comportamento das salmonelas paratíficas. Quando SE infecta as aves, pode provocar um quadro de enfermidade que se assemelha à Pulorose, mas com um comprometimento intestinal que não se vê em casos de Pulorose e Tifo Aviário. As características da infecção de aves por SE são complexas e de difícil abordagem, tendo-se em vista que esta bactéria pode se disseminar entre as aves pela via vertical e por meio da excreção fecal. Em sendo assim, o seu controle é complexo, razão pela qual, casos de salmonelose humana ocorreram no mundo todo a partir da década de 80 do século passado, decorrentes da ingestão de produtos de origem avícola (COGAN & HUMPHREY, 2003).

Muitos países obtiveram sucesso na eliminação do Tifo Aviário com a realização de testes para detecção e eliminação de lotes contendo aves infectadas (COGAN & HUMPHREY, 2003). Porém, outros países ainda não desenvolveram boas estratégias de erradicação ou encontram dificuldades para controlar esta doença, principalmente na América do Sul, incluindo o Brasil, onde o crescimento da indústria avícola tem sido constante. Para evitar o uso de antibióticos, que continuam sendo utilizados (ROSU *et al.*, 2007), tem sido intensificado o desenvolvimento de vacinas contra *Salmonella* spp.

Os métodos de controle de SE em aves de exploração comercial baseiam-se no monitoramento de infecção em aves reprodutoras e medidas adicionais preventivas. A vacinação tem sido reconhecida como um método útil em programas de controle de SE em aves comerciais. Atualmente, tem-se utilizado programas com base em vacinas

inativadas e vacinas vivas. As primeiras têm sido usadas no Brasil, em aves comerciais e aves reprodutoras matrizes. A proteção conferida por essas vacinas é duvidosa e a forma de aplicação é laboriosa e estressante para as aves. A vacinação é individual e devido ao veículo utilizado, pode provocar reação local severa. As vacinas vivas são melhores imunógenos, contudo, estudos complementares são necessários para evitar problemas de saúde pública ou de reversão de virulência dessas cepas.

O uso de vacinas vivas contra salmonelas hospedeiro-específicas, que causam doença severa (p. ex. SG) induz a forte imunidade mediada por células (SMITH, 1956; HAYES *et al.*, 1999; EJIDOKUN *et al.*, 2000; RANA & KULSHRESHTHA, 2006), devido à alta invasividade e à apresentação sistêmica de antígenos íntegros e específicos. As vacinas podem diminuir o risco à saúde pública decorrente da presença de *Salmonella* spp. em produtos de origem aviária, por meio da redução da colonização do trato reprodutor, assim como a redução da excreção fecal. Vários experimentos já foram realizados testando diferentes formas de vacinação em aves. Alguns mostraram boa eficácia, mas a completa proteção contra *Salmonella* ainda não foi conseguida. Quando se trata da proteção conferida contra salmonelas paratíficas, as quais, como a SE, não são específicas de aves, os relatos são inconclusivos, provavelmente porque neste caso, não se busca apenas o controle da enfermidade, mas também, o controle da disseminação bacteriana, pelas fezes e pela via vertical.

Os primeiros testes para produção de vacinas contra SE foram realizados em camundongos que receberam vacinas vivas, inativadas e frações celulares do sorotipo Enteritidis, sendo então constatada uma resposta imune protetora contra a cepa desafio (COLLINS & MILNE, 1966; KAWAKAMI *et al.*, 1966; OSAWA *et al.*, 1967; COLLINS, 1968). Desde então, várias formulações de vacinas foram desenvolvidas para uso em aves com resultados satisfatórios (TIMMS *et al.*, 1990; GAST *et al.*, 1992; BARBOUR *et al.*, 1993; GAST *et al.*, 1993; TIMMS *et al.*, 1994). Atualmente, são comercializados dois tipos de vacinas contra SE em aves, as bacterinas e as vacinas vivas.

As vacinas mortas, também conhecidas como bacterinas, podem ser preparadas contendo célula inteira ou subunidades de SE. Estas vacinas foram utilizadas com resultados variados para a prevenção da infecção por *Salmonella* em humanos e

animais. Os recentes avanços no conhecimento da genética desta bactéria levaram ao desenvolvimento de vacinas contendo cepas atenuadas de *Salmonella* com mutações simples, duplas ou múltiplas no genoma bacteriano.

Algumas publicações resumizam os estudos realizados nos últimos anos (MEYER *et al.*, 1992; ZHANG-BARBER *et al.*, 1999; BARROW & WALLIS, 2000; MASTROENI *et al.*, 2000). Bacterinas podem reduzir a mortalidade de aves por *Salmonella*. Contudo, as vacinas vivas são consideradas, atualmente, as alternativas mais apropriadas, uma vez que também podem ser administradas oralmente. São mais efetivas em prevenir a infecção por *Salmonella*, induzindo forte resposta imune celular e humoral (sistêmica e local), contra o agente *in vivo*, enquanto bacterinas estimulam apenas a resposta imune humoral, contra antígenos produzidos *in vitro* (COLLINS, 1974; BARROW & WALLIS, 2000). Somando-se às vantagens da utilização de uma vacina viva para proteger a ave, as cepas vivas e atenuadas de *Salmonella* também são utilizadas, com bastante sucesso, como veículos carreadores de antígenos de outras bactérias ou até mesmo protozoários (MASTROENI *et al.*, 2000), atuando apenas como uma célula que expressa proteínas heterólogas (antígenos) e as libera no organismo animal (IANARO *et al.*, 1995; DARJI *et al.*, 1997; DUNSTAN *et al.*, 1999).

A resposta imune induzida em aves domésticas vacinadas reduz a duração e a severidade das infecções por *Salmonella* e ajuda a prevenir a re-infecção. Portanto, a vacinação ainda mostra-se como a melhor ferramenta para reduzir a suscetibilidade das aves pelas infecções por *Salmonella* e assim, proteger a população consumidora da transmissão de intoxicações alimentares (GAST, 2007).

Após a implementação de um amplo programa de vacinação para aves de postura de ovos comerciais no Reino Unido, ocorreu redução de infecções humanas por SE (COGAN & HUMPHREY, 2003). No entanto, se o programa vacinal for aplicado de forma incorreta e as demais medidas sanitárias, como a correta limpeza das instalações e o controle intensivo de vetores, forem deixadas de lado, a vacina pode não produzir o efeito esperado (DAVIES & BRESLIN, 2003).

Em um estudo para avaliar a eficácia de duas bacterinas, DAVISON *et al.* (1999) utilizaram 11 lotes de aves de postura comerciais. Foram monitorados parâmetros como

a presença ou a ausência de SE no ambiente, nos órgãos das aves (incluindo ovário e oviduto) e nos ovos. Apesar da vacinação, apenas as amostras do ambiente de 4 galpões (36,4%) foram negativas para SE durante todo o experimento e todos os lotes tiveram aves com cultura de órgãos positiva para SE em algum momento do experimento. Complementando o estudo foi feita uma pesquisa de SE nos ratos que eram encontrados nos galpões. Surpreendentemente, todos os galpões tinham ratos portadores de SE, com uma frequência que variou entre 25 a 100% dos animais analisados. Com este achado, pode-se sugerir que apesar da vacina ter um efeito protetor, as medidas sanitárias têm um papel importante no controle de SE.

GAST *et al.* (1992) testaram a eficácia de uma bacterina em emulsão oleosa, preparada a partir de células de SE. A bacterina proporcionou uma resposta imune humoral rápida e forte após a primeira imunização das galinhas. No entanto, apenas uma proteção parcial contra o desafio por SE foi observada. Além disso, não evidenciaram proteção contra a colonização intestinal por SE. A vacinação reduziu, mas não eliminou completamente a SE dos órgãos internos e do conteúdo dos ovos.

Porém, quando GAST *et al.* (1993) avaliaram a mesma bacterina utilizada no experimento anterior, analisando a excreção fecal de uma cepa de SE utilizada no desafio, os resultados foram diferentes. Ocorreu uma redução significativa na excreção fecal do grupo vacinado durante a primeira semana após o desafio. Verificaram ainda, que a partir da segunda semana após o desafio, a colonização intestinal das aves pela cepa de SE alcançou níveis tão baixos, que não foi possível discernir o efeito protetor da vacina entre nenhum dos grupos, tanto os vacinados quanto o controle.

O uso de cepas de maior patogenicidade, como é o caso de *S. Enteritidis* PT4, é um fator importante para desenvolver novas vacinas vivas (NASSAR *et al.*, 1994; ADRIAENSEN *et al.*, 2007). Cepas muito invasivas são capazes de estimular uma resposta imune mais forte e ser eliminadas antes do que ocorreria com uma cepa menos invasiva (BARROW *et al.*, 1988). Aves poedeiras infectadas com cepas invasivas mostram uma imunidade consideravelmente maior a re-infecção (BARROW *et al.*, 1990a).

ADRIAENSEN *et al.* (2007) produziram uma cepa de SE PT4 com mutação dupla nos genes *guaB* e *fliC*, e notaram que a mesma tornou-se atenuada, com reduzida invasividade. A imunidade conferida conseguiu proteger os órgãos, mas não impediu a colonização do trato entérico, inclusive dos cecos, pela cepa patogênica de SE. A cepa mutante SE PT4 Δ *guaB* Δ *fliC* perdeu a capacidade de sintetizar o flagelo, uma vez que o gene *fliC* foi inativado. Dessa forma, não se distingue da resposta contra os sorotipos SG e SP. A cepa mutante foi capaz de induzir resposta imune humoral protagonizada por IgG anti-LPS, mas devido à falta de flagelina, a indução de interleucina-1 β foi baixa, assim como a infiltração de células polimorfonucleares na parede intestinal.

A maioria dos trabalhos sobre a eficácia de uma vacina contra *Salmonella* descrevem apenas uma proteção parcial, tal como a redução da excreção fecal de SE (GAST *et al.*, 1993), ou apenas a diminuição da colonização dos tecidos do hospedeiro (BABU *et al.*, 2003; GANTOIS *et al.*, 2006; ADRIAENSEN *et al.*, 2007). Os resultados dos experimentos apesar de muito variáveis, apresentam um ponto em comum. Nenhum deles relata uma imunidade contra SE na qual a ave vacinada fica completamente protegida. A proteção contra a infecção dos órgãos internos é mais fácil de ser alcançada do que a proteção efetiva contra a colonização intestinal (CURTISS & HASSAN, 1996), principalmente quando se utiliza bacterinas, que são capazes de proteger aves contra a invasão dos órgãos internos por *Salmonella*, mas falham no controle da colonização intestinal (GERMANIER, 1972; BARROW *et al.*, 1990b; GAST *et al.*, 1992).

No entanto, as vacinas não deixam de ajudar e ser mais uma ferramenta na difícil tarefa de controlar uma infecção por *Salmonella* spp. em lotes de aves. A imunização de matrizes com bacterinas, por exemplo, tem grande utilidade quando aplicada em conjunto com limpeza e desinfecção apropriadas, controle de roedores, barreiras sanitárias, descarte de lotes afetados e monitoramento bacteriológico como parte de um programa para reduzir a incidência das infecções por SE em lotes de aves comerciais (MCILROY *et al.*, 1989; MEAD & BARROW, 1990; GAST *et al.*, 1992).

A vacinação aumenta a concentração de anticorpos específicos (IgG e IgA) na gema de ovos, no soro sanguíneo e no jejuno de pintinhos provenientes de

reprodutoras vacinadas (METHNER & STEINBACH, 1997). Anticorpos são depositados na gema do ovo durante a sua formação (YAMAMOTO *et al.*, 1975). HOLT *et al.* (1996) avaliaram, *in vitro*, a multiplicação de SE em ovos de consumo proveniente de aves vacinadas contra o agente. Notaram que houve uma inibição significativa do crescimento de SE nos ovos provenientes das aves dos grupos que receberam vacinas inativadas em relação ao controle não vacinado. Tais resultados sugerem que a vacinação de poedeiras pode resultar na redução de ovos contaminados.

Uma menor produção de ovos contaminados, bem como uma progênie mais resistente ao desafio, são fundamentais no controle das salmonelas, já que o simples contato entre ovos e pintinhos infectados recém-eclodidos é capaz de contaminar aves livres dentro dos nascedouros. CASON *et al.* (1994) introduziram ovos, livres de *Salmonella*, em uma bandeja com ovos contaminados experimentalmente com *S. Typhimurium* (STM) dentro de um nascedouro. Logo após o nascimento, a STM foi isolada do trato entérico de 44% das aves provenientes dos ovos que eram inicialmente livres de *Salmonella*.

GORHAM *et al.* (1991) compararam os efeitos da infecção por SE em aves SPF (Livres de Patógenos Específicos) com um e sete dias de vida. As aves de ambos os grupos foram sacrificadas 42 dias após o desafio. As aves desafiadas no primeiro dia de vida apresentaram maior mortalidade e maiores percentuais de isolamentos de SE em tecidos intestinais (jejuno, duodeno, íleo e ceco) e nos órgãos avaliados, que aquelas desafiadas no 7º dia de vida. A transmissão vertical e a exposição precoce à SE são as principais razões do desenvolvimento da doença clínica por causa da alta suscetibilidade de aves recém eclodidas. O intestino colonizado pela microbiota e o sistema imune maduro protegem a ave da infecção diminuindo a morbidade, a mortalidade e o tempo de permanência de SE em aves mais velhas.

INOUE *et al.* (2008) avaliaram a imunidade passiva conferida por uma bacterina contra SE, comparando os efeitos do desafio na progênie de matrizes vacinadas e matrizes não vacinadas (controle). Quando o desafio foi realizado no 14º dia de vida das aves, não houve diferença considerável quanto à presença de SE no fígado e no baço das aves. No entanto, as amostras de conteúdo cecal das aves do grupo controle,

tinham um número significativamente maior de SE. Porém, quando as aves foram desafiadas no primeiro dia de vida, o re-isolamento de SE dos órgãos foi significativamente diminuído na progênie de aves vacinadas em comparação ao grupo controle.

Muitos dos dados que constam da literatura a respeito da avaliação de vacinas vivas, referem-se a estudos em animais de laboratório (IANARO *et al.*, 1995; DUNSTAN *et al.*, 1999; ZHANG-BARBER *et al.*, 1999). Em aves, pode-se encontrar alguns estudos também, que são bastante animadores (BARROW *et al.*, 1990b; METHNER *et al.*, 1994; METHNER & STEINBACH, 1997), incentivando pesquisas a respeito. As cepas que têm sido empregadas são mutantes de cepas “selvagens” defectivos em algum gene. Alteração essa, que deve ser permanente e permitir que a bactéria sobreviva por algum tempo no hospedeiro para provocar uma resposta imune (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2005).

Em aves, um importante papel dos linfócitos T γ/δ , como uma população representativa da imunidade mediada por células (IMC), foi demonstrado depois da infecção primária em aves jovens (BERNDT & METHNER, 2001). A IMC parece ser mais importante que a resposta humoral para a eliminação dos tecidos de cepas virulentas em aves, enquanto a resposta humoral, principalmente por IgA e os leucócitos polimorfonucleares parecem ser importantes na eliminação intestinal de *Salmonella* (NAGARAJA & RAJASHEKARA, 1999; BARROW & WALLIS, 2000). BABU *et al.* (2003) demonstraram que o percentual de linfócitos T detectados no sangue foi significativamente maior em aves vacinadas com vacinas vivas quando comparadas com vacinas inativadas. A importância da IMC na eliminação de SE dos tecidos foi investigado em aves por FARNELL *et al.* (2001), que reduziram a colonização de órgãos por SE inoculada oralmente em pintainhos, com a administração intraperitoneal de IFN- γ , substância capaz de estimular a imunidade celular (adaptativa e inata) e ativar os macrófagos, corroborando com LEE *et al.* (1983) que haviam demonstrado que a eliminação da infecção por *Salmonella* Typhimurium de galinhas estava correlacionada com a resposta mediada por células e não com altos níveis de anticorpos. Entretanto, a resposta humoral também se faz necessária para a obtenção da resposta imune

completa. Em aves bursectomizadas, incapazes de produzir linfócitos B, que dão origem aos anticorpos, após o desafio por SE, ocorreu aumento da excreção fecal e no conteúdo cecal de *Salmonella*, enquanto que nos órgãos internos, os resultados não diferiam entre os grupos de aves, indicando um importante papel da imunoglobulina (Ig) A, que foi encontrada em grande quantidade na bile das aves do grupo controle e é secretada diretamente na luz intestinal, impedindo a aderência da SE e a conseqüente invasão intestinal (ARNOLD & HOLT, 1995; DESMIDT *et al.*, 1998). A resposta humoral por linfócitos B e imunoglobulinas, é fundamental para restringir a invasão intestinal de *Salmonella* e sua posterior disseminação para os órgãos linfáticos e o fígado. Além disso, os anticorpos são responsáveis pela opsonização de antígenos, que leva ao melhor reconhecimento e destruição da bactéria pelos fagócitos (MASTROENI *et al.*, 2000; MITTRUCKER *et al.*, 2000).

Apesar das vacinas inativadas induzirem uma maior produção de anticorpos específicos, ainda existem controvérsias sobre o envolvimento da resposta imune humoral na proteção contra a infecção por *Salmonella*, com alguns estudos mostrando uma correlação positiva entre os anticorpos e a eliminação de *Salmonella* dos tecidos e outros mostrando nenhuma ligação (SIGWART *et al.*, 1989; HASSAN & CURTISS, 1990, 1994b).

Para mensurar a eficácia de uma vacina, em alguns experimentos avalia-se a sua habilidade em estimular a resposta imune humoral por anticorpos (GAST *et al.*, 1993; HASSAN & CURTISS, 1996), porém, foi verificado que a eliminação da infecção por *Salmonella* inicia-se junto com o desenvolvimento da imunidade celular (LEE *et al.*, 1983). O papel da IMC na resistência à *Salmonella* envolve ambas as imunidades, adquirida (Células-T) e componentes inatos (células NK, macrófagos, neutrófilos) assim como citocinas. (HIROSE *et al.*, 1999; LALMANACH AND LANTIER, 1999; NAIKI *et al.*, 1999).

A importância dos linfócitos T (CD4+) na produção dos fatores ativadores de macrófagos e na proteção contra patógenos intracelulares está comprovada (KAUFMANN, 1993; MCSORLEY *et al.*, 2000). Assim, um aumento na população de

linfócitos T (CD4+) pela imunização com a vacina viva atenuada pode conferir proteção contra infecção por organismos vivos (PIE *et al.*, 1997; THYGESEN *et al.*, 1997).

CAMPAGNARI *et al.* (2007) avaliaram a eficácia conferida por uma vacina viva comercial contra SE, na estimulação da IMC, através da quantificação de algumas citocinas. Células esplênicas, de aves vacinadas e não vacinadas, foram coletadas e cultivadas em meio próprio para avaliação *in vitro* da resposta imune. Os resultados mostraram um aumento na produção de IFN- γ , IL-8 e Óxido Nítrico (NO), nas células provenientes de aves vacinadas, indicando um aumento na resposta imune do hospedeiro, uma vez que estes fatores são importantes na estimulação da resposta imune mediada por células. No entanto, a avaliação *in vitro* não é o ideal para medir a eficácia de uma vacina.

Ao avaliar duas vacinas vivas (TAD) *Salmonella vac E* e (TAD) *Salmonella vac T*, GANTOIS *et al.* (2006) notaram um efeito somatório na resposta imune, quando foram utilizadas as duas vacinas juntas no mesmo programa vacinal. As amostras de baço só foram positivas após o enriquecimento e o resultado encontrado no grupo que recebeu a combinação destas duas vacinas, TAD *Salmonella vac E* / TAD *Salmonella vac T* (30% de amostras positivas) foi significativamente menor do que no grupo que recebeu somente a vacina TAD *Salmonella vac E* (43%) ou TAD *Salmonella vac T* (50%) e nas aves não imunizadas (80%). Este resultado também se refletiu nos ovos examinados. No grupo em que as aves não foram vacinadas, 27% dos ovos estavam contaminados por SE, enquanto que este percentual foi de 11% em ovos das aves do grupo que receberam apenas uma das vacinas e de 1% quando foram utilizadas a combinação das duas vacinas.

CERQUETTI & GHERARDI (2000) demonstraram que uma vacina viva atenuada contra SE conseguiu reduzir a colonização do ceco e a invasão de baço e fígado após o desafio por cepas de SE (O1, 9, 12) e SG (O1, 9, 12) e reduziu a colonização intestinal de uma cepa heteróloga de STM (O1, 4, 12).

BABU *et al.* (2004), testaram a eficácia de uma vacina viva, derivada de uma cepa mutante de STM e de uma bacterina em emulsão oleosa, em aves posteriormente desafiadas com SE. No grupo em que as aves receberam a vacina viva observou-se

redução de SE nos órgãos examinados e nas fezes. A vacina inativada estimulou a resposta imune humoral, mas não foi capaz de gerar uma resposta imune mediada por células. Após o desafio, ocorreu uma grande depleção no número de linfócitos B em todas as aves, mesmo assim, observou-se que a redução de SE foi maior no grupo de aves que recebeu a vacina viva. Isso sugere que a vacina viva produza fatores que possam compensar o déficit de linfócitos B e combater a infecção por SE nas aves. Esta teoria baseia-se no fato de que uma cepa viva de *Salmonella* Typhimurium induziu o aumento de IFN- γ , IL-12 e IL-2 (HARRISON *et al.*, 1997; JOHN *et al.*, 2002), os quais participam do processo de eliminação de *Salmonella* dos tecidos, até mesmo durante o parasitismo intracelular (DYBING *et al.*, 1999; VAN DEVENTER, 2000).

COOPER *et al.* (1994) investigaram a utilização da cepa atenuada de *Salmonella* Enteritidis Δ aroA, conhecida como CVL30, como uma cepa vacinal contra SE e STM. O atributo mais significativo desta cepa, como uma vacina viva administrada oralmente em aves, foi a prevenção e redução da invasão sistêmica pelas cepas patogênicas utilizadas no desafio, além da redução na excreção de SE nas fezes. As cepas vivas atenuadas de *Salmonella*, quando administradas por via oral, podem ocupar lugar na microbiota intestinal e competir com cepas homólogas selvagens durante os primeiros dias após a vacinação. Esta ação adicional da cepa vacinal ocorre durante um período crítico, quando a resposta imune é limitada.

A cepa SG 9R é uma cepa rugosa que foi originada da cepa lisa 9S (SMITH, 1956; GORDON & LUKE, 1959; GORDON *et al.*, 1959). A cepa 9R não possui os antígenos somáticos característicos da forma lisa de SG devido a algumas mudanças na conformação de seus açúcares terminais (LEE *et al.*, 2005). Dessa forma, a mudança na estrutura da bactéria afetou a virulência da cepa (GUPTA & MALLICK, 1976; FEBERWEE *et al.*, 2001a,b).

Vacinas vivas e inativadas, preparadas a partir da SG 9R, já foram utilizadas em programas de prevenção em alguns países (LEE *et al.*, 2005). No entanto, não foi observado nenhum sucesso significativo no uso das vacinas inativadas. É possível que a imunidade à SG não seja dependente de um mecanismo imune humoral, mas sim da imunidade mediada por células (WILSON, 1956).

A administração de diferentes sorovares na primeira e na segunda imunização, ou seja, a utilização de vacinas heterólogas em um mesmo protocolo de vacinação leva a um aumento na resposta dos linfócitos T CD8+ antígeno-específico (SEVIL DOMÈNECH *et al.*, 2008).

FEBERWEE *et al.* (2001a) encontraram evidências de que uma vacina viva contendo a cepa SG 9R contribuiu para a redução da infecção por SE. Neste estudo, 80 lotes de aves poedeiras que receberam a vacina foram monitorados com testes bacteriológicos e sorológicos. Dos lotes vacinados, 73 foram negativos para SE durante todo o período do experimento, enquanto que 214 de 1854 lotes de aves que não receberam a vacina foram positivos em testes sorológicos ao final do período de produção. Nenhuma evidência de contaminação da casca ou conteúdo do ovo pela cepa vacinal foi encontrada. Em outro estudo de campo, para acompanhar a possível disseminação da cepa vacinal de lotes vacinados para os lotes não vacinados, FEBERWEE *et al.* (2001b) não encontraram indicações da excreção fecal da cepa vacinal SG 9R.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Este projeto foi elaborado para estudar a atenuação de mutantes de SG contendo os genes *cobS* e *cbiA* inoperantes (SG $\Delta cobS\Delta cbiA$) e o potencial dessas bactérias como imunógenos em programas preventivos contra SE e SG.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar *in vivo*, a virulência residual do mutante de SG com deleção nos genes *cobS* e *cbiA*, analisando-se a mortalidade e a infecção sistêmica, em comparação com a cepa selvagem de SG, inoculando-os em aves.

Avaliar a imunogenicidade da cepa mutante de SG defectiva nos genes *cobS* e *cbiA* contra a infecção de aves por cepas patogênicas de SG e SE.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo dos mutantes

Os mutantes de SG contendo parte dos genes *cobS* e *cbiA* deletados, foram preparados conforme o trabalho de TURNER *et al.* (1998) e a metodologia contida no manual de técnicas de biologia molecular de SAMBROOK & RUSSEL (2001).

Os mutantes foram preparados por PAIVA *et al.*, 2007.

4.2. Teste genotípico da cepa vacinal SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ para a detecção da deleção nos genes *cobS* e *cbiA*

4.2.1. Primers

Os *primers* foram preparados com base no genoma de *Salmonella* Typhimurium (MCCLELLAND *et al.*, 2001).

Gene *cobS*

Primer 1: F 5' - gagatctagaacgaatctgctggttgcgct - 3'

Primer 4: R 5' – agtctagaacagaccagcagaaagatc - 3'

Gene *cbiA*

Primer 1: F 5' catctagaaaggcatcacgcatttattc - 3'

Primer 4: R 3' – tgtctagacagccagtgtgcaacattt - 5'

4.2.2. PCR

Para confirmar se a cepa utilizada para preparar o inóculo vacinal era SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ realizou-se a PCR para detectar a presença dos genes alterados.

Uma cepa de *S. Typhimrium* F98 com deleção nestes mesmos genes (STM F98 $\Delta cobS\Delta cbiA$) foi utilizada como controle positivo.

A solução empregada para a realização da PCR era composta de 50 μL , correspondendo a: 47,9 μL de solução X-mix, 0,6 μL de cada *primer* (1 e 4), 0,5 μL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA) e 0,4 μL de DNA (100ng/ μL)

As condições para a realização da PCR foram: 95°C por 3 minutos e 25 ciclos utilizando-se: 95°C por 20 segundos, 45°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Utilizou-se um período de extensão a 72°C de 5min. Após a reação, as amostras permaneceram a 4°C e era adicionado 6 μL de "loading buffer" em cada.

4.2.3. Eletroforese

As amostras produzidas na PCR, foram colocadas no gel de agarose e submetidas ao processo de eletroforese. O gel de agarose era composto de 180mL de TAE buffer, 1,8g de agarose e 16 μL de brometo de etídeo. Nos poços do gel foram colocadas as amostras (15 μL) e nos dois poços adjacentes às amostras foram colocados 8 μL do marcador de peso molecular. Então esse material foi submetido a uma corrente elétrica de 80V durante 3 horas, para a migração das amostras.

4.3. Ensaios *in vivo*

Esses ensaios seguiram os modelos adotados por BERCHIERI *et al.* (2001a, b). As aves foram criadas em bateria com água e ração *ad libitum*.

No momento da chegada das aves, foram coletadas amostras de sangue para testes sorológicos visando a detecção de anticorpos anti-*Salmonella* e suabes de fundo de caixa, conforme ZANCAN *et al.* (2000) para pesquisa de *Salmonella* spp. Os experimentos foram realizados após os testes realizados no momento da chegada das aves de um dia, apresentaram-se negativos para a pesquisa de *Salmonella* spp e anticorpos anti-*Salmonella*, respectivamente.

4.3.1. Cepas bacterianas

Foi utilizada uma cepa de SG, resistente ao ácido nalidíxico (Nal^r), com mutação dupla, contendo parte dos genes *cobS* e *cbiA* deletados de seu genoma (SG $\Delta cobS\Delta cbiA$). Para o desafio, nos experimentos de avaliação da mortalidade, infecção sistêmica e prevenção do tifo aviário foi utilizada uma cepa selvagem de SG resistente ao ácido nalidíxico (SGNal^r) e uma cepa de SE resistente ao ácido nalidíxico e à espectomicina (SENal^rSpec^r) para os estudos de avaliação do potencial de imunização cruzada contra a infecção por SE. As bactérias são mantidas pela bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da FCAV-Unesp de Jaboticabal, SP.

4.3.2. Preparo dos inóculos

As culturas, para cada inóculo, foram preparadas a partir de suas respectivas cepas (SGNal^r, SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ e SENal^rSpec^r), que foram semeadas em caldo Luria-Bertani (LB) (Invitrogen 12780-052) e incubadas por 24 horas a 37°C, em agitação (100rpm). Uma amostra de cada cultura foi diluída decimalmente em 0,9 mL solução salina, pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10. De cada diluição foi retirado 0,1mL, que era despejado em placas contendo ágar verde brilhante (Oxoid CM0263) contendo novobiocina (1µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VB Nal/Nov), que foram incubadas a 37°C/24h. O número de colônias por mililitro de caldo LB foi transformado em log₁₀

para apresentação dos resultados. As culturas continham aproximadamente 10^8 UFC/mL.

4.3.3 Aves

Foram utilizadas aves susceptíveis ao tifo aviário (BERCHIERI *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2005), de variedade vermelha (Hy-line Brown) e de variedade branca (Hy-line W36) de linhagem comercial, para postura de ovos de mesa e pintinhos com um dia de vida provenientes de incubatório comercial de aves de corte (COBB 500). As aves de postura foram alojadas em baterias de cria e recria, já os pintinhos de corte foram colocados em caixas de madeira teladas. As aves receberam aquecimento elétrico durante o período inicial, água e ração *ad libitum*.

4.4. Avaliação da infecção de aves por SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em comparação com a cepa de SG original

4.4.1. Experimento 01: Avaliação da mortalidade

Para a avaliação do comportamento do mutante obtido, este foi inoculado em aves comparativamente à cepa selvagem. Foram utilizadas aves de variedade vermelha de linhagem comercial para postura de ovos de mesa.

Para cada cepa foram utilizados dois grupos contendo cada um 30 aves.

Pintinhos de um grupo receberam 0,5 mL de uma cultura preparada em caldo LB, incubada a 37°C/24h em agitação e do outro, esta cultura diluída a 10^{-2} . O inóculo foi administrado por via oral, no quinto dia de vida.

As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se a mortalidade.

4.4.2. Experimento 02: Avaliação da infecção sistêmica

Para este ensaio, foram utilizadas 80 aves de variedade vermelha de linhagem comercial para postura de ovos de mesa. As aves foram divididas em dois grupos contendo 40 aves. Aves de um grupo foram infectadas com o inóculo (sem diluição) da cepa original e as do outro grupo com a cepa mutante, no quinto dia de vida. Dois, cinco, sete, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi), cinco aves de cada grupo, foram sacrificadas para a estimativa da presença de SGNal^r e SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em baço e fígado.

As amostras de baço e de fígado foram colocadas em solução salina, pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10, maceradas e diluídas decimalmente em 0,9 mL de PBS. De cada diluição retirou-se 0,1mL, que era despejado em placas contendo ágar verde brilhante (Oxoid CM0263) contendo novobiocina (1µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VB Nal/Nov), que foram incubadas a 37°C/24h. O número de colônias por grama de órgão foi transformado em log₁₀ para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10), era adicionado igual volume de caldo selenito (Oxoid CM395) contendo novobiocina (0,04%) (caldo SN), preparado em concentração dupla. O frasco era incubado a 37°C/24h e a seguir, seu conteúdo era semeado em ágar VB Nal/Nov, com incubação a 37°C/24h.

4.5. Avaliação do potencial do mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ como cepa vacinal sobre a cepas selvagens de SG e SE

4.5.1. Experimento 03: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ contra a infecção por SG

Este experimento foi realizado com aves de linhagem de postura comercial para ovos de mesa, variedade vermelha.

Os inóculos da cepa vacinal de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ e da cepa desafio de SGNal^f foram preparados conforme o procedimento descrito anteriormente no item 2.2.

Foram formados três grupos contendo 20 aves cada. As aves do grupo A foram vacinadas aos cinco dias de vida, do grupo B aos cinco e vinte e cinco dias de vida e as aves do Grupo C não receberam nada (controle). A dose vacinal consistia de 0,5mL da cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, inoculado por via oral, diretamente no papo. Aos 45 dias de vida, todas as aves foram desafiadas com 1,0 mL de inóculo, contendo a cepa selvagem de SGNal^f.

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

4.5.2. Experimento 04: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ contra a infecção por SE

Este experimento foi realizado com aves de linhagem de postura comercial para ovos de mesa, variedade branca.

Os inóculos da cepa vacinal de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ e da cepa desafio de SENal^rSpec^r foram preparados conforme o procedimento descrito anteriormente no item 4.3.2.

Foram formados três grupos contendo 40 aves cada. As aves do grupo A foram vacinadas aos cinco dias de vida, do grupo B aos cinco e vinte e cinco dias de vida e as aves do Grupo C não receberam nada (controle). A dose vacinal consistia de 0,5mL da cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, inoculado por via oral, diretamente no papo. Aos 45 dias de vida, todas as aves foram desafiadas com 1,0 mL de inóculo, contendo a cepa selvagem de SENal^rSpec^r.

Neste ensaio foram avaliados a excreção fecal e a infecção sistêmica da cepa utilizada no desafio.

A avaliação da excreção fecal foi feita pesquisando-se a presença de SENal^rSpec^r nas fezes, duas vezes por semana, durante quatro semanas, por meio da colheita de fezes cloacais com suabes estéreis de algodão. Os suabes foram colocados em tubos contendo 2 mL de caldo SN. Após agitação, foram semeados em ágar VB Nal/Nov. A seguir, as placas e tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Na ausência de crescimento em ágar VB Nal/Nov, semeava-se novamente os suabes enriquecidos em placas contendo ágar VB Nal/Nov com incubação a 37°C/24horas. Decorrido este período, era realizada a leitura das placas.

Para avaliar a infecção sistêmica, dois, cinco, sete, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi), 5 aves, de cada grupo, foram sacrificadas para a estimativa da quantidade de SE em baço, fígado e conteúdo cecal (BERCHIERI *et al.*, 2001a,b).

As amostras de baço, de fígado e de conteúdo cecal foram colocadas em solução salina pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10, maceradas (conteúdo cecal era homogeneizado) e diluídas decimalmente em 0,9 mL de PBS. De cada diluição foi retirado 0,1mL, que era despejado em placas de ágar VB Nal/Nov, as quais eram incubadas a 37°C/24h. O número de colônias por grama de órgão foi transformado em log₁₀ para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10), era adicionado igual volume de caldo SN, preparado em concentração dupla. O frasco era incubado a 37°C/24h e o seu conteúdo

era semeado em ágar VB Nal/Nov, com incubação a 37°C/24h. Decorrido este período, era realizada a leitura das placas.

4.5.3. Experimento 05: Prevenção da colonização intestinal e invasão dos órgãos por SE pela inoculação prévia de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em pintinhos de um dia de vida

Neste experimento foram utilizados 40 pintinhos com um dia de vida provenientes de incubatório comercial de aves de corte.

Os inóculos da cepa vacinal de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ e da cepa desafio de SENal^fSpec^f foram preparados conforme o procedimento descrito anteriormente no item 2.2.

As aves foram distribuídas em caixas de madeira teladas, formando dois grupos com duas repetições cada. No grupo A, cada repetição consistia de oito aves que receberam 0,1 mL da cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ no primeiro dia de vida, por via oral. No grupo B (controle), cada repetição tinha oito aves que não receberam nenhum inóculo. Em outra caixa, oito aves (semente) foram desafiadas no primeiro dia de vida, com a cepa de SENal^fSpec^f. No segundo dia de vida, duas aves (semente) foram colocadas em cada caixa (repetição), para proporcionar o desafio por meio do contato.

No quinto dia pós-infecção, todas as aves foram sacrificadas para a estimativa da presença de *Salmonella* no conteúdo cecal.

As amostras de conteúdo cecal foram colocadas em solução salina pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10, homogeneizadas e diluídas decimalmente em 0,9 mL de PBS. De cada diluição foi retirado 0,1mL, que era despejado em placas de ágar VB Nal/Nov, as quais eram incubadas a 37°C/24h. O número de colônias por grama de conteúdo cecal foi transformado em log₁₀ para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10), era adicionado igual volume de caldo SN, preparado em concentração dupla. O frasco era incubado a 37°C/24h e o seu conteúdo era semeado em ágar VB Nal/Nov, com incubação a 37°C/24h. Decorrido este período, era realizada a leitura das placas das amostras enriquecidas.

4.6. Análise estatística

Os dados relativos à mortalidade foram analisados pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (GREENWOOD & NIKULIN, 1996). O teste de comparação múltipla de Tukey foi utilizado na análise dos resultados obtidos nas contagens de SG e SE dos órgãos ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (DANIEL, 1991).

V. RESULTADOS

5.1. Teste genotípico da cepa vacinal SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ para a detecção da deleção nos genes *cobS* e *cbiA*

A Figura 1 contém a foto do gel de agarose com as bandas referentes ao genes íntegros e alterados.

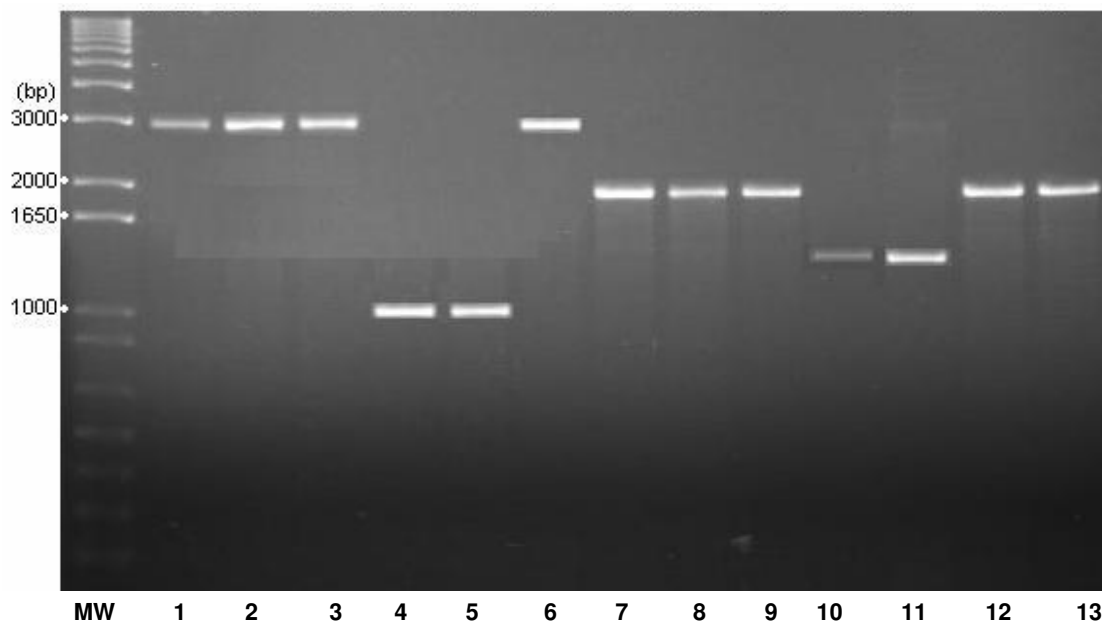


Figura 1. Eletroforograma em agarose 1%. MW: marcador de tamanho molecular (1kb plus DNA Ladder). 1 – 3, fragmento $\Delta cobS$ $Spec^r$ de SG (2964pb); 4 – 5, fragmento *cobS* (original) de SGNal^r (994pb); 6, Controle positivo com STM F98 $\Delta cobS$ $Spec^r$ (2964pb); 7 – 9, fragmento $\Delta cbiA$ Kan^r de SG (1930pb); 10 – 11, fragmento *cbiA* (original) de SGNal^r (1360pb); 12 – 13, Controle positivo com STM F98 $\Delta cbiA$ Kan^r (1930pb).

5.2. Avaliação da infecção de aves por SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em comparação com a cepa de SG original

5.2.1. Experimento 1: Avaliação da mortalidade

Na Tabela 1 estão presentes os dados referentes à mortalidade de aves que receberam os inóculos sem ser diluído e o diluído a 10^{-2} da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ e da cepa selvagem SGNal^r. Durante os 28 dias de observação, nos grupos de aves que receberam o mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, diluído ou não, a mortalidade foi nula. No grupo controle, a cepa de SGNal^r causou mortalidade em 83,3% das aves que receberam a cultura sem diluição e em 60% das aves que receberam a cultura diluída 100 vezes. No 28^º dpi, as aves remanescentes foram sacrificadas, para a realização do exame bacteriológico de fígado. SGNal^r ou SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ não foram recuperadas nas aves de seus respectivos grupos.

Tabela 1. Mortalidade de aves vermelhas comerciais para postura, desafiadas experimentalmente no quinto dia de vida com cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbIA$ em comparação com a cepa selvagem SGNal^r.

Cepa	Cultura	Mortalidade de aves (dpi) em grupos de 30 aves																												Total	%	Nº de aves restantes						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	22	28																							
SG Δcob	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 a	0	30
S $\Delta cbIA$	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 a	0	30	
SGNal ^r	N	-	-	-	2	5	9	7	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25 b	83,3	5		
	10 ⁻²	-	-	-	-	2	10	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18 b	60	12		

dpi: dias pós infecção; N: cultura sem diluição; Aves sacrificadas no 28º dpi. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (χ^2 , $p < 0,05$), considerando-se a mesma concentração do inóculo.

5.2.2. Experimento 2: Avaliação da infecção sistêmica

Os suabes de fundo de caixa e os testes sorológicos realizados no momento da chegada das aves de um dia, apresentaram-se negativos para a pesquisa de *Salmonella* spp e anticorpos anti-*Salmonella*, respectivamente.

Os resultados quanto à infecção sistêmica estão na Tabela 2. A quantidade de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em fígado e baço das aves foi significativamente menor do que a da cepa selvagem (SGNaI^r), no 5^o e 7^o dpi. Além de menor multiplicação, a cepa mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ foi encontrada no fígado das aves até no 7^o dpi, enquanto que a cepa selvagem, persistiu no fígado e no baço das aves do grupo controle até o 14^o dpi. A partir do 21^o dpi, a cepa mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ não foi encontrada em nenhum dos órgãos examinados e o grupo controle não tinha nenhuma ave para a inspeção devido à mortalidade.

Tabela 2. Número (Log_{10}) de células viáveis (UFC/g) de *Salmonella Gallinarum* em baço e fígado de aves vermelhas comerciais para postura, desafiadas no quinto dia de vida com cultura de SG $\Delta\text{cobS}\Delta\text{cbiA}$ ou com a cepa selvagem (SGNaI').

dpi	órgãos	SG $\Delta\text{cobS}\Delta\text{cbiA}$										SGNaI'													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	μ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	μ		
2	Baço	2	0	2,3	0	0	0,86a	2,69	0	3,71	2,47	4,04	2,58a	2	0	2,47	0	0	0,86a	2,69	0	3,71	2,47	4,04	2,58a
	Fígado	2	2	2,47	2	0	1,69a	2	0	3,14	2	3,25	2,08a	2	2	2,47	2	0	1,69a	2	0	3,14	2	3,25	2,08a
5	Baço	0	3,41	0	2,95	3,38	1,95b	6,07	5,59	5,76	6,11	6,2	5,94a	0	3,41	0	2,95	3,38	1,95b	6,07	5,59	5,76	6,11	6,2	5,94a
	Fígado	0	2,47	0	2,3	2,9	1,53b	6,07	5,07	6,04	7,07	6,07	6,06a	0	2,47	0	2,3	2,9	1,53b	6,07	5,07	6,04	7,07	6,07	6,06a
7	Baço	0	0	4,27	0	0	0,85b	7,07	4,71	5,87	4,72	4,77	5,43a	0	0	4,27	0	0	0,85b	7,07	4,71	5,87	4,72	4,77	5,43a
	Fígado	0	0	0	2	2	0,8b	6,96	5,36	6,14	4,72	6,41	5,92a	0	0	0	2	2	0,8b	6,96	5,36	6,14	4,72	6,41	5,92a
14	Baço	0	0	0	2	2	0,8a	4,14	0	5,68	0	0	1,96a	0	0	0	2	2	0,8a	4,14	0	5,68	0	0	1,96a
	Fígado	0	0	0	0	0	0	3	0	3,36	0	0	1,27a	0	0	0	0	0	0	3	0	3,36	0	0	1,27a
21	Baço	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	M	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	M
	Fígado	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	M	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	M
28	Baço	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	M	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	M
	Fígado	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	M	0	0	0	0	0	0	M	M	M	M	M	M

dpi: dias pós-infecção; 0: negativo, M: aves que não foram inspecionadas devido à mortalidade. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.3. Avaliação do mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ como cepa vacinal contra a infecção pelas cepas selvagens de SG e SE

5.3.1. Experimento 3: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ contra a infecção por SG

Os dados apresentados na Tabela 3 revelam que a cepa mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ conferiu proteção contra a cepa selvagem SGNal^r, reduzindo a mortalidade entre as aves vacinadas. A mortalidade foi de 15% entre as aves do grupo A, 25% entre as aves do grupo B e 75% entre as aves do grupo C (controle), que não receberam o inóculo da cepa mutante. A diferença entre a mortalidade das aves dos grupos A e B e a mortalidade das aves do grupo C (controle) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 3. Mortalidade de aves vacinadas oralmente com cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ e desafiadas oralmente com a cepa selvagem SGNal^f.

Vacinação (idade)	GRUPOS		
	A	B	C
	5 dias	5 e 25 dias	não vacinado
nº de aves mortas/total	3/20 ^a	5/20 ^a	15/20 ^b
% de mortalidade	15	25	75

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (χ^2 , $p < 0,05$).

5.3.2. Experimento 4: Proteção de aves utilizando SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ contra a infecção por SE

Para a avaliação da proteção das aves pela cepa de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ contra SE analisou-se a excreção fecal mediante exame de suabe de cloaca e a infecção sistêmica estimando-se a presença de SENal^rSpec^r em baço, fígado e conteúdo cecal.

Na Tabela 4 estão os resultados referentes à análise da excreção fecal de SENal^rSpec^r. No grupo B, no qual as aves receberam a cepa vacinal de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ aos 5 e 25 dias de vida, houve redução significativa ($p < 0,05$) da excreção fecal da cepa de SENal^rSpec^r utilizada no desafio. Os suabes cloacais foram realizados duas vezes por semana nas aves dos grupos A, B e C. O número de aves testadas diminuía conforme eram realizados os sacrifícios para a colheita das amostras de órgãos.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da avaliação da infecção sistêmica pela cepa de SENal^rSpec^r, utilizada no desafio das aves. A vacinação das aves com o mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, reduziu o número de SENal^rSpec^r em baço, fígado e ceco das aves dos grupos A e B, em comparação às aves do grupo C (controle). No 2º e 5º dpi, a contagem de SENal^rSpec^r no conteúdo cecal das aves do grupo C (controle) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que no grupo B e no 5º e 7º dpi a contagem de SENal^rSpec^r no fígado das aves dos grupos A e B também diferiu estatisticamente em relação ao grupo C (controle).

Tabela 4. Número de suabes positivos após a inspeção da cloaca de aves brancas para postura, para detecção de SENal^rSpec^r utilizada como cepa desafio após a vacinação de aves com cultura de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$.

GRUPOS									
vacinação (idade)	A			B			C		
	5 dias			5 e 25 dias			não vacinado		
dpi	D	E	T	D	E	T	D	E	T
2	16	12	28	11	8	19	11	10	21
5	17	11	28	5	5	10	14	13	27
8	0	3	3	0	0	0	2	7	9
12	0	1	1	0	0	0	0	3	3
15	1	1	2	0	0	0	1	1	2
19	0	1	1	0	0	0	0	0	0
22	0	1	1	0	0	0	0	1	1
26	0	2	2	0	0	0	0	0	0
TOTAL	34	32	66b	16	13	29a	28	35	63b

dpi: dias pós-infecção; D: Resultado da semeadura direta (0h); E: Resultado da semeadura após enriquecimento (24h); T: Total. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (χ^2 , $p < 0,05$).

Grupo A: vacinação com a cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ aos 5 dias de vida

Grupo B: vacinação com a cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ aos 5 e 25 dias de vida

Grupo C: controle(não vacinado).

Tabela 5. Contagem (Log_{10}) do número de células viáveis (UFC/g) da cepa desafio SENal^{Spec^r}, em baço, fígado e conteúdo cecal de aves brancas para postura, vacinadas oralmente com cultura de SG $\Delta\text{cobS}\Delta\text{cbiA}$.

dpi	Órgãos	GRUPOS																					
		A (5 dias)					B (5 e 25 dias)					C (não vacinado)											
		Aves					Aves					Aves											
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	μ								
2	Baço	2	2	0	0	0	0,8a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0a	2	0	2	0	2	1,2a
	Fígado	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0a	0	0	2	0	0	0,4a
	Ceco	2	3,64	4,07	2	2	2,74ab	2	0	2	2	2	2	2	2	2	1,6b	5,47	2	4,65	2	6,11	4,05a
5	Baço	0	0	2	2	2	1,2ab	0	0	0	0	2	0,4b	2	2	2	0,4b	2	2	2	2	2	2a
	Fígado	0	0	0	2	0	0,4b	0	0	0	0	2	0,4b	2	2	2	0,4b	2	2	2	2	2	2a
	Ceco	2	4,82	2	4,55	4,89	3,65ab	0	5,69	2	0	0	1,54b	2	6,62	7,07	6,2	6,27	6,2	6,27	6,27	5,63a	
7	Baço	2	2	0	0	0	1,2a	0	2	0	0	2	0,8a	2	2	2	0,8a	2	2	2	2	2	2a
	Fígado	0	2	0	0	0	0,4b	0	0	0	0	2	0,4b	2	2	2	0,4b	2	2	2	2	2	2a
	Ceco	0	0	0	2	2	0,8a	0	0	2	2	2	1,2a	2	2	2	1,2a	2	2	2	2	2	2a
14	Baço	0	0	2	0	0	0,4a	0	0	2	0	0	0,4a	0	2	0	0,4a	0	2	0	2	2	1,2a
	Fígado	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0a	0	0	0	0	2	0,8a
	Ceco	2	2	0	0	0	0,8a	0	0	2	0	0	0,4a	0	2	2	0,4a	0	2	2	2	2	1,6a
21	Baço	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0a	0	0	2	0	0	0,4a
	Fígado	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0a	0	0	0	0	0	0a
	Ceco	0	0	0	0	0	0a	2	0	0	0	0	0,4a	0	0	0	0,4a	0	0	0	0	0	0a
28	Baço	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0a	0	0	2	0	0	0,4a
	Fígado	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0	0	0a	0	0	0	0a	0	0	0	0	0	0a
	Ceco	0	0	0	0	0	0a	2	0	0	0	0	0,4a	2	0	0	0,4a	2	0	0	0	0	0,8a

dpi: dias pós-infecção; 0: Negativo; Médias (μ) seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Grupo A: vacinação com a cepa SG $\Delta\text{cobS}\Delta\text{cbiA}$ aos 5 dias de vida

Grupo B: vacinação com a cepa SG $\Delta\text{cobS}\Delta\text{cbiA}$ aos 5 e 25 dias de vida

Grupo C: controle (não vacinado).

5.3.3. Experimento 5: Prevenção da colonização intestinal e invasão dos órgãos por SE pela inoculação prévia de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em aves de um dia de vida

Na Tabela 6 encontram-se os resultados (Log_{10}) da contagem de SENal^rSpec^r no conteúdo cecal das aves. A média do número de células viáveis de SENal^rSpec^r no conteúdo cecal das aves do grupo A (vacinado com SG $\Delta cobS\Delta cbiA$) foi de 5,56 UFC/g e não diferiu da média (6,80 UFC/g) encontrada nas aves do grupo B (não vacinado) ($p < 0,05$).

Tabela 6. Número (Log_{10}) de células viáveis (UFC/g) de SENal^rSpec^r no conteúdo cecal de oito aves sacrificadas cinco dias após desafio por contato.

Aves									
Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	μ
A1	M	6,6	6,48	6,34	6,7	6,7	5,95	5,95	6,38
A2	6,34	5,34	6,41	6,3	6,36	2	6,48	6,11	5,66
$\mu(A)$	5,56 a (6,70-2,00)								
B1	8,11	6,47	6,57	6,6	7,38	7,3	6,54	6,84	6,97
B2	7,34	6,56	7,53	6,78	6,11	6,36	5,84	6,5	6,63
$\mu(B)$	6,80 a (8,11-5,84)								

Grupos A1 e A2: aves receberam o inóculo de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$; Grupos B1 e B2 (controle): aves não receberam o inóculo com SG $\Delta cobS\Delta cbiA$; M: ave não inspecionada devido a mortalidade. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

VI. DISCUSSÃO

Salmonella Gallinarum (SG) é um parasita intracelular, anaeróbico facultativo que provoca uma enfermidade característica em aves, o Tifo Aviário. Este sorotipo está fortemente associado ao sistema fagocítico-mononuclear e o desencadeamento da doença depende da capacidade bacteriana de sobreviver e replicar-se dentro de macrófagos do fígado e do baço (BARROW *et al.*, 1994; WIGLEY *et al.*, 2002). Ao invadir e colonizar os macrófagos do hospedeiro, *Salmonella* spp. utiliza vários fatores de virulência para superar os obstáculos, que são ativados com a internalização da bactéria (FIELDS *et al.*, 1986; RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1997; VAN IMMERSEEL *et al.*, 2004).

Após a invasão do organismo animal e das células fagocitárias, SG causa doença severa, caracterizada pela alta morbidade e mortalidade em aves (SHIVAPRASAD, 1997). Este comportamento não foi observado com a cepa mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ que tornou-se atenuada e não causou a doença. Conforme consta na Tabela 1, nos grupos em que as aves receberam o mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, não se observou mortalidade, enquanto que nos grupos controles, a mortalidade foi de 83,3% (25/30) quando utilizou-se o inóculo sem diluição e de 60% (18/30) quando o inóculo foi diluído a 10^{-2} , à semelhança de resultados observados em estudos anteriores sobre o Tifo Aviário (BARROW *et al.*, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Complementando os estudos a respeito da relação entre a cepa mutante e aves, foram feitos estudos a respeito da infecção sistêmica. Conforme pode-se observar na Tabela 2 a cepa mutante foi recuperada do fígado até o 7^o dpi, enquanto a cepa selvagem permaneceu neste órgão até o 14^o dpi, assim como foi descrito anteriormente por OLIVEIRA *et al.* (2005) com a infecção de aves de postura adultas, utilizando a mesma cepa de SG. A contagem bacteriana nos órgãos revelou uma menor quantidade de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em relação à cepa selvagem SG. Aos 21 dpi, SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ não foi encontrada nos órgãos examinados, enquanto que o grupo controle não possuía nenhuma ave, devido à mortalidade causada pela cepa selvagem. Assim sendo, pode-se afirmar que a deleção dos genes *cobS* e *cbiA* trouxe à cepa mutante transtornos

metabólicos que refletiram no seu comportamento *in vivo*, com relação ao crescimento e à virulência no organismo hospedeiro. A alteração metabólica de microrganismos pode levar ao comprometimento da sua sobrevivência no organismo hospedeiro. SHAH *et al.* (2007) verificaram situação similar quando tornaram o gene *metC* inoperante em uma cepa de SG. A incapacidade desta bactéria sintetizar metionina interferiu no seu crescimento nos órgãos invadidos (fígado e baço), diminuindo de forma significativa a sua virulência.

A via de biossíntese da cobalamina em *Salmonella* spp. pode ficar comprometida quando algum gene do operon *cob* torna-se inoperante, sendo incapaz de sintetizar esta molécula, se substâncias precursoras não forem encontradas no ambiente (GRABAU & ROTH, 1992). A cobalamina é uma molécula importante para *Salmonella* Typhimurium, cuja principal função seria atuar na degradação de fontes de carbono, como o propanediol e o tetrionato, para a obtenção de energia (JETER, 1990; AILION *et al.*, 1993; BOBIK *et al.*, 1999; PRICE-CARTER *et al.*, 2001). Portanto, essa substância exerce influência na multiplicação bacteriana e sua ausência pode levar à atenuação da bactéria (FIELDS *et al.*, 1986). Pelos resultados obtidos nesse trabalho nota-se a influência da cobalamina no metabolismo bacteriano de SG. No entanto, essa participação pode variar entre os sorotipos de *Salmonella* spp., já que em trabalho semelhante uma cepa de *Salmonella* Typhimurium com alteração de genes envolvidos na biossíntese de cobalamina continuou expressando a mesma virulência (BJÖRKMAN *et al.*, 1996).

Vale ressaltar que a cepa utilizada neste trabalho apresentou dois genes alterados, relacionados com a biossíntese da cobalamina, enquanto que mutantes de SG contendo alteração no gene *cobS* ou *cbiA*, individualmente, não tiveram a virulência diminuída da mesma maneira (PAIVA *et al.*, 2007). A deleção simples pode não ter sido suficiente para bloquear a biossíntese de vitamina B₁₂, talvez porque a bactéria utilize processo alternativo que não dependa daquela enzima, enquanto a alteração dupla conseguiu causar danos irreparáveis.

Segundo JETER *et al.* (1984), mutantes de *Salmonella* Typhimurium incapazes de sintetizar cobalamina caem em três classes fenotípicas: 1^a. Deleção na parte I do

operon *cob*: a bactéria sintetiza cobalamina só quando for fornecido *cobinamide*; 2º. Deleção na parte II do operon *cob*: a bactéria sintetiza cobalamina só quando for fornecido dimetil-benzimidazole (DMB); 3º. Quando a deleção ocorre na parte III do operon *cob*: os mutantes falham na síntese de cobalamina mesmo quando se fornece ambos os precursores (*cobinamide* e DMB). O gene *cbiA* localizado na parte I do operon *cob* é o primeiro local de leitura para iniciar a síntese da cobalamina e em *Salmonella Typhimurium* codifica uma amidase que atua em fase tardia da via biossintética (ROTH *et al.*, 1993). Assim, no mutante SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ foram eliminados um gene da parte I (*cbiA*) e um da parte III (*cobS*), quebrando a via de biossíntese da cobalamina.

Os genes que codificam enzimas para o metabolismo de carboidratos, nucleotídeos ou aminoácidos, são chamados de genes de manutenção e são conhecidos por participarem dos mecanismos de virulência, através da aquisição de nutrientes essenciais para o crescimento intracelular de *Salmonella enterica*. A cobalamina é importante quando atua como cofator em reações como as das enzimas homocisteína metil *transferase* (CAUTHEN *et al.*, 1966) e etanolamina amônia *liase* (SCARLETT & TURNER, 1976), responsáveis, respectivamente, pela síntese de metionina e degradação da etanolamina. Assim, o amplo espectro de atuação, sugere que esta molécula seja imprescindível, não por possuir apenas uma função essencial, mas por ser um catalisador de várias etapas do metabolismo bacteriano. De acordo com os resultados, a deficiência de cobalamina interferiu na multiplicação e persistência de SG, indicando que a atenuação está ligada à perda da capacidade de sobreviver dentro do sistema fagocítico-mononuclear.

SMITH (1956) verificou que uma cepa rugosa de SG (SG9R) havia perdido a capacidade de provocar o Tifo Aviário em aves e que poderia ser empregada como vacina. WIGLEY *et al.* (2005) observaram que a atenuação residia na diminuição do período de vida da bactéria no fígado e no baço das aves. Embora por processos distintos, mas em virtude de comportamento semelhante, pesquisou-se o emprego de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ como candidata a cepa vacinal, visando o controle da infecção de aves por SG e SE.

As vacinas vivas contra *Salmonella* spp. disponíveis atualmente, são preparadas à partir de cepas atenuadas. Embora se considere que estas vacinas sejam capazes de gerar uma forte resposta imune celular, algumas estimulando também a produção de anticorpos, a proteção conferida contra o sorotipo SE, é limitada (MASTROENI *et al.*, 2000).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3 a vacinação por via oral, com a cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, protegeu as aves contra o desafio com a cepa selvagem de SG. Em grupos de 20 aves, sobreviveram 17 aves naquele em que utilizou-se uma dose vacinal, 15 quando empregou-se 2 doses vacinais, permanecendo apenas 5 aves vivas após o desafio pela cepa selvagem de SG, diferindo dos grupos vacinados (χ^2 , $p < 0,05$). A resposta imune gerada pela aplicação de uma dose vacinal teve a mesma eficácia que a utilização de duas doses. Esses resultados sugerem que a cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ pode imunizar as aves por meio da inoculação oral, conseguindo diminuir a incidência de Tifo Aviário. Alguns resultados semelhantes foram relatados anteriormente com a utilização da cepa SG9R. Segundo BOUZOUBAA *et al.* (1989), uma cepa selvagem de SG que provocou a mortalidade em 60% de aves do grupo controle, não causou mortalidade no grupo de aves vacinadas com SG9R, embora tenha provocado lesões necróticas focais no fígado em até 55% das aves, à semelhança de relato anterior (SILVA *et al.*, 1981). Em experimento descrito por LEE *et al.* (2005), após o desafio com uma cepa patogênica de SG a mortalidade variou de 95 a 100% nos grupos controles, enquanto que nos grupos vacinados com SG9R essa variação foi 0 a 5%. Assim como SG9R, a cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ poderá ter uso promissor no controle do Tifo Aviário, com algumas vantagens como a ausência de lesões severas em órgãos e a possibilidade de diferenciá-la de outras cepas de SG. CHACANA & TERZOLO (2006) notaram que a vacinação com uma cepa atenuada de SE (*Salmonella* TAD E) foi capaz de proteger aves contra o sorotipo SG após a aplicação de três doses. Porém, a imunidade não foi duradoura e quando o desafio foi realizado em maiores intervalos de tempo, a mortalidade das aves vacinadas foi igual à do grupo controle. Portanto, a melhor proteção contra o Tifo Aviário é obtida quando utilizam-se vacinas preparadas a partir de cepas de SG.

Tendo-se em vista que os sorotipos Gallinarum e Enteritidis possuem composição antigênica semelhante, pertencendo ao sorogrupo D1 (O: 1, 9, 12), investigou-se a possibilidade de se utilizar a cepa de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ como vacina para controlar a infecção de aves por SE. Foram realizados dois experimentos para a avaliação da proteção contra uma cepa desafio de SE, sendo um com aves de postura de linhagem branca e o outro com pintinhos de corte.

No experimento com as aves de postura, após o desafio inspecionou-se a excreção fecal e a colonização de fígado, baço e ceco por SE. Os resultados referentes ao exame dos suabes cloacais (Tabela 4), demonstram uma redução na excreção fecal de SE no grupo em que as aves receberam duas aplicações da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, aos 5 e aos 25 dias (χ^2 , $p < 0,05$). Não houve diferença no número de suabes positivos entre o grupo das aves que receberam uma dose da cepa vacinal, aos cinco dias e o grupo controle (χ^2 , $p > 0,05$). SILVA *et al.* (1981) relataram a redução de 20% na excreção fecal de STM em aves vacinadas por via oral ou subcutânea com a cepa SG9R. Anos mais tarde, BARROW *et al.* (1991), notaram que não ocorreu redução da excreção fecal de uma cepa de SE, utilizada para desafiar as aves após a vacinação com SG9R. No presente estudo, envolvendo a utilização da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, a excreção fecal de SE foi reduzida em cerca de 55% quando as aves receberam duas doses da cepa vacinal e nenhuma ave excretou a cepa desafio após o 5º dpi. Enquanto a excreção de SE foi observada durante toda a fase experimental pós desafio (22º dpi), nas aves do grupo onde se aplicou uma dose da cepa vacinal e do grupo controle (sem vacinação) (Tabela 4). Esses resultados são animadores, tendo-se em vista que BETANCOR *et al.* (2005) também observaram a redução da excreção fecal de SE, em aves vacinadas (duas doses) com cepa atenuada de SE, mas com a presença da bactéria nas fezes por período mais longo, de 15 dias.

Conforme consta na Tabela 5, houve redução na quantidade de SE recuperada no fígado das aves vacinadas com uma dose de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ a partir do 5º e 7º dpi, enquanto que no grupo em que as aves receberam duas doses vacinais, a redução foi significativa no conteúdo cecal nos 2º e 5º dpi, no fígado nos 5º e 7º dpi e no baço no 5º dpi. Assim, pode-se afirmar que a cepa vacinal foi capaz de reduzir a infecção de aves

por SE, quando foram utilizadas duas doses. Esses resultados são animadores, tendo-se em vista que, as vacinas vivas disponíveis são incapazes de impedir completamente a instalação de SE no ceco e a colonização dos órgãos das aves, sendo às vezes expressiva na proteção conferida contra a infecção sistêmica (BARROW *et al.*, 1991; COOPER *et al.*, 1994; GANTOIS *et al.*, 2006).

Vacinas contendo outros sorotipos de *Salmonella* para proteger aves contra SE também já foram avaliadas. HASSAN & CURTISS (1994b), utilizaram uma cepa atenuada *Salmonella* Typhimurium Δ *cya* Δ *crp* visando inibir a presença de sorotipos de *Salmonella* dos grupo B, C, D e E em aves. Em aves vacinadas na 2ª e 4ª semana e desafiadas por SE na sexta semana de vida, a proteção contra a colonização do ceco foi fraca, já a redução da quantidade de SE recuperada nos órgãos foi melhor quando foram utilizadas cepas pouco invasivas para desafiar as aves.

CERQUETTI & GHERARDI (2000) utilizaram uma cepa atenuada de SE para vacinar aves nos primeiros dias vida. A cepa vacinal conferiu boa proteção contra os sorotipos SE e SG, quando o desafio foi realizado 14 dias após a aplicação da última dose imunizadora, mas não foi capaz de proteger contra o desafio por STM. Esta cepa apresentou algumas características que podem desfavorecer a sua utilização à campo. Foi necessário aplicar quatro doses vacinais, o que aumenta o estresse das aves e o custo da vacinação para os produtores. Após a última dose, as aves excretaram a cepa vacinal no ambiente por até duas semanas. A cepa SG Δ *cobS Δ *cbiA* possui algumas características vantajosas quando considera-se seu uso como vacina. A inoculação de apenas uma dose, administrada por via oral, foi eficaz contra SG. Outra vantagem que SG Δ *cobS Δ *cbiA* tem sobre as demais cepas vacinais disponíveis, principalmente contra SE, baseia-se no fato de que mesmo após a sua inoculação oral, a excreção fecal e a conseqüente contaminação do ambiente são inexpressivas, além da necessidade de poucas aplicações (duas) para uma proteção efetiva contra o sorotipo heterólogo.**

Em um estudo a campo, FEBERWEE *et al.* (2001a) relacionaram a redução de infecções por SE em lotes de aves poedeiras comerciais à utilização da vacina SG9R, em conjunto com a aplicação de um programa de biosseguridade, incluindo outras medidas sanitárias que diminuem o risco de infecções por SE. No presente trabalho, os

inóculos utilizados para desafiar as aves continham grande quantidade de bactéria, que dificilmente seria encontrada em condições normais a campo. As condições em que os experimentos foram executados propiciavam a constante re-infecção das aves devido à alta contaminação no ambiente dentro dos infectórios. O uso da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ em granjas avícolas ainda não foi testado, mas os resultados dos ensaios realizados indicam que SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ poderá ser uma importante ferramenta para combater infecções por SG e SE.

Face aos resultados favoráveis ao uso da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ como vacina, investigou-se seu emprego para evitar a colonização cecal de aves por SE no início da vida, na forma de exclusão competitiva. Já foi relatado que cepa de *Salmonella* Typhimurium consegue inibir a colonização cecal de aves por cepas homólogas (BERCHIERI JR & BARROW, 1990). COOPER *et al.* (1994), conseguiram impedir a colonização cecal de aves recém nascidas por SE, aplicando oralmente um inóculo contendo uma cepa atenuada de SE no primeiro dia de vida. No experimento em que pintinhos de corte receberam SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ no primeiro dia de vida, não ocorreu inibição de SE que foi inoculada por via oral no segundo dia de vida, a qual colonizou e se multiplicou no ceco das aves de ambos grupos. A quantidade de SE encontrada no conteúdo cecal dos pintinhos do grupo controle e do grupo vacinado, sacrificados no 5º dpi, foi elevada e não diferiu entre si (Tabela 6). Assim sendo, a cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ não impediu a colonização cecal pela cepa desafio, como fez a cepa atenuada de SE (COOPER *et al.*, 1994). METHNER *et al.* (2001) analisaram a utilização de uma cepa de STM atenuada para impedir a colonização cecal de pintinhos desafiados por uma cepa patogênica homóloga no 3º dia de vida, sem sucesso. A colonização do intestino por uma cepa “vacinal” de *Salmonella* seria uma forma de proteger aves recém eclodidas e aves recém vacinadas contra a infecção por cepas patogênicas, pois durante este período, a resposta imune ainda é limitada. Porém, esta ação parece estar distante da capacidade das cepas vacinais disponíveis, incluindo-se a SG $\Delta cobS\Delta cbiA$. Cepas atenuadas de SE mostraram melhores resultados; no entanto, são excretadas no ambiente, o que é uma característica indesejável para uma vacina. A proteção do trato

intestinal das aves durante este período parece ser exercida, mais satisfatoriamente, pelo método de exclusão competitiva (METHNER *et al.*, 2001; STERZO *et al.*, 2005).

A cepa atenuada SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ mostrou-se capaz de proteger aves contra o desafio pela cepa patogênica de SG e também foi eficaz em reduzir a infecção por SE quando inoculada duas vezes em aves de postura. Destarte, os resultados obtidos na presente pesquisa são promissores e deverão nortear futuros estudos visando a aplicação da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ como vacina no controle da infecção de aves por SG e SE, em condições experimentais controladas, bem como estendê-los para pesquisas aplicadas a campo.

VII. CONCLUSÕES

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

- A cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ tornou-se atenuada e não causou mortalidade em aves.
- A aplicação de uma ou duas doses da cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ é capaz de proteger parcialmente aves contra o desafio por uma cepa selvagem de SG.
- A vacinação com duas doses de SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ causou redução de SE nos órgãos, no conteúdo cecal e na excreção fecal, desta forma, a proteção conferida pela cepa vacinal deve ser classificada como parcial.
- A cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ possui vantagens, como a completa atenuação, a improvável excreção pelas fezes, a imunogenicidade contra SG e SE e a possibilidade de ser detectada e diferenciada por técnicas moleculares.

VIII. REFERÊNCIAS

ADRIAENSEN, C.; DE GREVE, H.; TIAN, J. Q.; DE CRAEYE S.; GUBBELS, E.; EECKAUT, V., VAN IMMERSEEL F.; DUCATELLE R.; KUMAR M.; HERNALSTEENS, J. P. A live *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vaccine allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. **Infect. Immun.**, Brussels, v. 75, n. 5, p. 2461-2468, 2007.

AILION, M.; BOBIK, T. A.; ROTH, J. R. Two global regulatory systems (Crp and Arc) control the cobalamin/propanediol regulon of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Salt Lake City, v. 175, n. 22, p. 7200-7208, 1993.

ANDERSON, P. J.; LANGO, J.; CARKEET, C.; BRITTEN, A.; KRÄUTLER, B.; HAMMOCK, B.D.; ROTH, J.R. One pathway can incorporate either adenine or dimethylbenzimidazole as an α -axial ligand of B₁₂ cofactors in *Salmonella enterica*. **J. Bacteriol.**, Davis, v. 190, n. 4, p. 1160-1171, 2008.

ANDERSSON, D. Kinetics of cobalamin repression of the *cob* operon in *Salmonella typhimurium*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Uppsala, v. 125, n. 1, p. 89-94, 1995.

ANDERSSON, D. I.; ROTH, J. R. Mutations affecting regulation of cobinamide biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Salt Lake City, v. 171, n. 12, p. 6726-6733, 1989a.

ANDERSSON, D. I.; ROTH, J. R. Redox regulation of the genes for cobinamide biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Salt Lake City, v. 171, n. 12, p. 6734-6739, 1989b.

ARNOLD, J. W.; HOLT, P. S. Response to *Salmonella enteritidis* infection by the immunocompromised avian host. **Poult. Sci.**, Athens, v. 74, n. 4, p. 656–665, 1995.

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

BABU U.; SCOTT M.; MYERS M. J.; OKAMURA, M.; GAINES D.; YANCY H.F.; LILLEHOJ, H.; HECKERT, R. A.; RAYBOURNE, R.B. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocytemediated immunity in laying hens. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Laurel, v. 91, n. 1, p. 39-44, 2003.

BARBOUR, E. K.; WAYNE, W. M.; NABBUT, N. H.; POSS, P. E.; BRINTON, M. K. Evaluation of bacterins containing three predominant phage types of *Salmonella enteritidis* for prevention of infection in egg-laying chickens. **Am. J. Vet. Res.**, Beirut, v. 54, n. 8, p. 1306-1309, 1993.

BARROW, P. A.; HASSAN, J. O.; BERCHIERI, A. Reduction in fecal excretion of *Salmonella typhimurium* strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S. typhimurium* organisms. **Epidemiol. Infect.**, Berkshire, v. 104, n. 3, p. 413-426, 1990b.

BARROW, P. A.; HUGGINS, M. B.; LOVELL, M. A. Host specificity of *Salmonella* infections in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infect. Immun.**, Huntingdon, v. 62, n. 10, p. 4602-4610, 1994.

BARROW, P. A.; HUGGINS, M. B.; LOVELL, M. A.; SIMPSON, J. M. Observations of the pathogenesis of experimental *Salmonella* Typhimurium infection of chickens. **Res. Vet. Sci.**, Compton, v. 42, n. 2, p. 239-252, 1987.

BARROW, P. A.; LOVELL M. A.; BERCHIERI, A. Immunization of laying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4 with live, attenuated vaccines. **Vet. Rec.**, Berkshire, v. 126, n. 10, p. 241-242, 1990a.

BARROW, P. A.; LOVELL M. A.; BERCHIERI, A. The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **Avian Pathol.**, Cambridgeshire, v. 20, n. 4, p. 681-692, 1991.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. L.; BARBER, L. Z. Growth suppression in early stationary phase nutrient broth cultures of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in genus specific and not regulated by sigma. **J. Bacteriol.**, Berkshire, v. 178, n. 11, p. 3072-3076, 1996.

BARROW, P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A. Intestinal colonization in the chicken by foodpoisoning *Salmonella* serotypes; Microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathol.**, Houghton, v. 17, n. 3, p. 571-588, 1988.

BARROW, P. A.; WALLIS, T. S. Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In: Wray, C. (Ed.) *Salmonella in domestic animals*. CAB International, Oxford, 2000, v. 1, p. 323-339.

BAUMLER, A. J.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, Texas, v. 287, n. 5450, p. 50-52, 2000.

BERCHIERI JR, A. ; BARROW, P. A. Further studies on the inhibition of colonization on the chicken alimentary tract with *Salmonella typhimurium* by pre-colonization with an avirulent mutant. **Epidemiol. Infect.**, Huntingdon, v. 104, n. 3, p. 427-441, 1990.

BERCHIERI JR., A.; BARROW, P.A.; MURPHY, C. K. Vertical transmission of *Salmonella* Gallinarum, S. Pullorum and S. Enteritidis in commercial brown-eggs layers. *Salmonella and Salmonellosis Symposium*, Ploufragan, France, 1997, p. 293-294.

BERCHIERI JR., A.; OLIVEIRA, G. H.; PINHEIRO, L. A. S.; BARROW, P. A. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hen lines. **Braz. J. Microbiol.**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 50-52, 2000.

BERCHIERI, JR. 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 Pathol.**, Berkshire, v. 30, n. 3, p. 221-231, 2001a.

BERCHIERI JR., A.; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C. K.; BARROW, P. A. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian Pathol.**, Berkshire, v. 30, n. 4, p. 297-310, 2001b.

BERNDT, A.; METHNER U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Jena, v. 78, n. 2, p. 143-161, 2001.

BETANCOR, L.; SCHELOTTO, F.; FERNANDEZ, M.; PEREIRA, M.; RIAL, A.; CHABALGOITY, J.A. An attenuated *Salmonella* Enteritidis strain derivative of the main genotype circulating in Uruguay is an effective vaccine for chickens. **Vet. Microbiol.**, Montevideo, v. 107, n. 1-2, p. 81-89, 2005.

BJÖRKMAN, J.; RHEN, MIKAEL.; ANDERSSON, D. I. *Salmonella typhimurium* cob mutants are not hiper-virulent. **FEMS Microbiol. Lett.**, Uppsala, v. 139, n. 2-3, p. 121-126, 1996.

BOBIK, T. A.; AILION, M.; ROTH J. R. A single regulatory gene integrates control of vitamin B12 synthesis and propanediol degradation. **J. Bacteriol.**, Salt Lake City, v. 174, n. 7, p. 2253-2266, 1992.

BOBIK, T. A.; HAVEMANN, G. D.; BUSCH R. J.; WILLIAMS, D. S.; ALDRICH, H. C. The propanediol utilization (pdu) operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B(12)-dependent 1, 2-propanediol degradation. **J. Bacteriol.**, Gainesville, v. 181, n. 19, p. 5967-5975, 1999.

BOUZOUBAA K.; NAGARAJA K. V.; KABBAL F. Z.; NEWMAN J. A.; POMEROY B. S. Feasibility of using proteins from *Salmonella gallinarum* vs. 9R live vaccine for the prevention of Fowl Typhoid in chickens. **Avian Dis.**, Rabat, v. 33, n. 3, p. 385-391, 1989.

BOUZOUBAA, K.; NAGARAJA, K. V.; NEWMAN, J. A.; POMEROY, B. S. Use of membrane proteins from *Salmonella Gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. **Avian Dis.**, Rabat, v. 31, n. 4, p. 699-704, 1987.

BUCHMEIER, N. A.; HEFFRON, F. Intracellular survival of wildtype *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. **Infect. Immun.**, La Jolla, v. 57, n. 1, p. 1-7, 1989.

BYRD, J. A.; DELOACH, J. R.; CORRIER, D. E.; NISBET, D. J.; STANKER, L. H. Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. **Avian Dis.**, Texas, v. 43, n. 1, p. 39-47, 1999.

CALDWELL, D. J.; HARGIS, B. M.; CORRIER, D. E.; VIDAL, L.; DELOACH, J. R. Evaluation of persistence and distribution of *Salmonella* serotype isolation from poultry farms using drag-swab sampling. **Avian Dis.**, Texas, v. 39, n. 3, p. 617-621, 1995.

CAMPAGNARI, E.; ROSSI, G.; FRANCIOSI, C.; GIRELLI, D.; GIOVANARDI, D.; RICCI, A.; BIANCHI, E.; PRANDINI, F.; PESENTE, P.; TORRIANI, S. *In vitro* evaluation of live attenuated vaccines against *Salmonella enteritidis*: cell-mediated immune response. **Ital. J. Anim. Sci.**, Bologna, v. 6, p. 301-304, 2007.

CASON, J. A.; BAILEY, J. S.; COX, N. A. Transmission of *Salmonella typhimurium* during hatching of broiler chicks. **Avian Dis.**, Athens, v. 38, n. 3, p. 583–588, 1994.

CAUTHEN, S. E.; FOSTER M. A.; WOODS, D. D. Methionine synthesis by extracts of *Salmonella typhimurium*. **Biochem. J.**, Oxford, v. 98, n. 2, p. 630-635, 1966.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (2007). *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2005. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.
<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2005/SalmonellaAnnualSummary2005.pdf>

CERQUETTI, M. C.; GHERARDI, M. M. Orally administered attenuated *Salmonella enteritidis* reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. **Vet. Microbiol.**, Buenos Aires, v. 76, n. 2, p. 185-192, 2000.

CHACANA P. A.; TERZOLO, H. R. Protection conferred by a live *Salmonella enteritidis* vaccine against Fowl Typhoid in laying hens. **Avian Dis.**, Buenos Aires, v. 50, n. 2, p. 280-283, 2006.

COGAN, T. A.; HUMPHREY, T. J. The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. **J. Appl. Microbiol.**, Bristol, v. 94, Suppl. 1, p. S114-S119, 2003.

COLLINS, F. M.; MACKANESS, G. B.; BLANDEN R. V. Infection-immunity in experimental salmonellosis. **J. Exptl. Med.**, Adelaide, v. 124, n. 4, p. 601- 619, 1966.

COLLINS, F. M.; MILNE, M. Heat-labile antigens of *Salmonella enteritidis* II: mouse protection studies. **J. Bacteriol.**, Adelaide, v. 92, n. 3, p. 549–557, 1966.

COLLINS, F. M. Recall of immunity in mice vaccinated with *Salmonella enteritidis* or *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Adelaide, v. 95, n. 6, p. 2014–2021, 1968.

COLLINS, F. M. Vaccines and cell-mediated immunity. **Bacteriol. Rev.**, Adelaide, v. 38, n. 4, p. 371–402, 1974.

COOPER, G. L., VENABLES, L. M., WOODWARD, M. J., HORMAECHE, C. E. Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella enteritidis* *aroA* live oral vaccine candidate. **Infect. Immun.**, Cambridge, v. 62, n. 11, p. 4747-4754, 1994.

COOPER, G. L. Salmonellosis infection in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines – a review. **Vet. Bull.**, Weybridge, v. 64, n. 2, p. 123-143, 1994.

CURTISS III, R.; HASSAN, J. O. Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, St. Louis, v. 54, n. 1-4, p. 365-372, 1996.

CURTISS III, R.; KELLY, S. M.; HASSAN, J. O. Live oral avirulent *Salmonella* vaccines. **Vet. Microbiol.**, St. Louis, v. 37, n. 3-4, p. 397-405, 1993.

DANIEL, W. W. Analysis of variance in biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences, 5th ed. In: Georgia State University and John Wiley and Sons, New York, 1991.

DARJI, A.; GUZMAN, C. A.; GERSTEL, B.; WACHHOLZ, P.; TIMMIS, K. N.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, T.; WEISS, S. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. **Cell.**, Braunschweig, v. 91, n. 6, p. 765–775, 1997.

DAVIES, R. H.; BRESLIN, M. Persistence of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty freerange chicken farm. **Environ. Microbiol.**, Addlestone, v. 5, n. 2, p. 79–84, 2003.

DAVISON, S.; BENSON, C. E.; HENZLER, D. J.; ECKROADE, R. J. Field observations with *Salmonella enteritidis* bacterins. **Avian Dis.**, Pennsylvania, v. 43, n. 4, p. 664-669, 1999.

DESMIDT M.; DUCATELLE R.; MAST J.; GODDEERIS B. M.; HAESEBROUCK F. Role of the humoral immune system in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection in chickens. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Merelbeke, v. 63, n. 4, p. 355-367, 1998.

DUGUID, J. P.; NORTH R. A. E. Eggs and *Salmonella* food-poisoning: an evaluation. **J. Med. Microbiol.**, Leeds, v. 34, n. 2, p. 65-72, 1991.

DUNSTAN, S. J.; SIMMONS, C. P.; STRUGNELL, R. A. Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var. Typhimurium. **Infect. Immun.**, Melbourne, v. 67, n. 10, p. 5133-5141, 1999.

DYBING, J. K.; WALTERS, N.; PASCUAL, D. W. Role of endogenous interleukin-18 in resolving wild-type and attenuated *Salmonella typhimurium* infections. **Infect. Immun.**, Bozeman, v. 67, n. 12, p. 6242-6248, 1999.

EJIDOKUN, O. O.; KILLALEA, D.; COOPER, M. HOLMYARD, S.; CROSS, A.; KEMP, C. Four linked outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection: The continuing egg threat. **Commun. Dis. Public Health**, Dudley, v. 3, n. 2, p. 95-100, 2000.

ESCALANTE-SEMERENA, J. C.; JOHNSON, M. G.; ROTH J. R. The CobII and CobIII regions of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic operon of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 174, n. 1, p. 24–29, 1992.

ESCALANTE-SEMERENA, J. C.; ROTH, J.R. Regulation of cobalamin biosynthetic operons in *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 169, n. 5, p. 2251–2258, 1987.

ESCALANTE-SEMERENA, J. C.; SUH, S. J.; ROTH, R. cobA function is required for both de novo cobalamin biosynthesis and assimilation of exogenous corrinoids in *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 172, n. 1, p. 273-280, 1990.

FARNELL, M. B.; EL HALAWANI, M.; YOU, S.; MC ELROY A. P.; HARGIS, B. M.; CALDWEE, D.J. In vivo biologic effects of recombinant turkey-interferon-gamma in neonatal leghorn chicks: protection against *Salmonella enteritidis* organ invasion. **Avian Dis.**, College Station, v. 45, n. 2, p. 473-478, 2001.

FEBERWEE, A.; DE VRIES, T.S.; HARTMAN, E. G.; WIT, J. J.; ELBERS, A.R.W.; DE JONG, W.A. Vaccination against *Salmonella enteritidis* in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on a live *Salmonella gallinarum* 9R strain: evaluation of efficacy, safety, and performance of serologic *Salmonella* test. **Avian Dis.**, Arnsbergstraat, v. 45, n. 1, p. 83-91, 2001a.

FEBERWEE, A.; HARTMAN, E. G.; DE WIT, J. J.; DE VRIES, T. S. The spread of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine strain under field conditions. **Avian Dis.**, Arnsbergstraat, v. 45, n. 4, p. 1024-1029, 2001b.

FIELDS, P. I.; SWANSON, R. V.; HAIDARIS, C. G.; HEFFRON F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, La Jolla, v. 83, n. 14, p. 5189-5193, 1986.

FORSHELL, L. P.; WIERUP M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, Uppsala, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; TIMBERMONT, L.; BOYEN, F.; BOHEZ, L.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; VAN IMMERSEEL F. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella vac*® E and TAD *Salmonella vac*® T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. **Vaccine.**, Merelbeke, v. 24, n. 37-39, p. 6250-6255, 2006.

GAST, R. K. Serotype-Specific and Serotype-Independent Strategies for Preharvest Control of Food-Borne *Salmonella* in Poultry. **Avian Dis.**, Athens, v. 51, n. 4, p. 817-828, 2007.

GAST, R. K.; BEARD C. W. Production of *Salmonella enteritidis* contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Dis.**, Athens, v. 34, n. 2, p. 438– 446, 1990.

GAST, R. K.; STONE, H. D.; HOLT, P. S.; BEARD, C. W. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella enteritidis*. **Avian Dis.**, Athens, v. 36, n. 4, p. 992–999, 1992.

GAST, R. K.; STONE, H. D.; HOLT, P. S. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterin for reducing faecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. **Avian Dis.**, Athens, v. 37, n. 4, p. 1085–1091, 1993.

GEORGE, A.; NAIR, R.; RATH, S.; GHOSH, S. N.; KAMAT, R. S. Regulation of cell-mediated immunity in mice immunized with *Salmonella enteritidis*. **J. Med. Microbiol.**, Parel, v. 23, n. 3, p. 239-246, 1987.

GEORGE, A.; SHROFF, K. E.; RATH, S.; GHOSH, S. N.; SENGUPTA, S. R.; KAMAT, R. S. Route-related variation in the immunogenicity of killed *Salmonella enteritidis* vaccine: role of antigen presenting cells. **Microbiol. Immunol.**, Parel, v. 33, n. 6, p. 479-488, 1989.

GERMANIER, R. Immunity in experimental salmonellosis. III. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.**, Bern, v. 5, n. 5, p. 792-797, 1972.

GORDON, R. F.; GARSIDE, J. S.; TUCKER J. F. The use of living attenuated vaccines in the control of fowl typhoid. **Vet. Rec.**, Austin, v. 71, p. 300-305, 1959.

GORDON, W. A. M.; LUKE, D. A note on the use of the 9R fowl typhoid vaccine in poultry breeding flocks. **Vet. Rec.**, v. 71, 145, p. 926-927, 1959.

GORHAM, S. L.; KADAVIL, K.; LAMBERT H.; VAUGHAN, E.; PERT, B.; ABEL, J. Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens. **Avian Pathol.**, Maryland, v. 20, n. 3, p. 433-437, 1991.

GRABAU C.; ROTH, J. R. A *Salmonella typhimurium* cobalamin-deficient mutant blocked in 1-Amino-2-Propanol synthesis. **J. Bacteriol.**, Salt Lake City, v. 174, n. 7, p. 2138-2144, 1992.

GREENWOOD, P.E.; NIKULIN, M.S. In John Wiley & Sons (Ed.) A Guide To Chi-Squared Testing. New York, p. 280, 1996.

GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. **Environ. Microbiol.**, Athens, v. 3, n. 7, p. 421-430, 2001.

HARRISON, J. A.; VILLARREAL-RAMOS, B.; MASTROENI, P.; DEMARCO DE HORMAECHE, R.; HORMAECHE, C. E. Correlates of protection induced by live Aro-*Salmonella typhimurium* vaccines in the murine typhoid model. **Immunology**, Newcastle, v. 90, n. 4, p. 618–625, 1997.

HASSAN, J. O.; CURTISS III, R. Control of colonization by virulent *Salmonella typhimurium* by oral immunization of chickens with avirulent Δ cya Δ crp *S. typhimurium*. **Res. Microbiol.**, St. Louis, v. 141, n. 7-8, p. 839-850, 1990.

HASSAN, J. O.; CURTISS III, R. Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent *Salmonella typhimurium* strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes. **Infect. Immun.**, St. Louis, v. 62, n. 12, p. 5519–5527, 1994a.

HASSAN, J. O.; CURTISS III, R. Virulent *Salmonella typhimurium* induced lymphocyte depletion and immunosuppression in chickens. **Infect. Immun.**, St. Louis, v. 62, n. 5, p. 2027–2036, 1994b.

HASSAN, J. O.; CURTISS III, R. Effect of vaccination of hens with an avirulent strain of *Salmonella typhimurium* on immunity of progeny challenged with wild-type *Salmonella* strains. **Infect. Immun.**, St. Louis, v. 64, n. 3, p. 938–944, 1996.

HAYES, S.; NYLEN, G.; SMITH, R.; SALMON, R. L.; PALMER, S. R. Undercooked hens eggs remain a risk factor for sporadic *Salmonella* Enteritidis infection. **Communic. Dis. Pub. Health**, Cardiff, v. 2, n. 1, p. 66-67, 1999.

HIROSE, K.; NISHIMURA, H.; MATSUGUCHI, T.; YOSHIKAI, Y. Endogenous IL-15 might be responsible for early protection by natural killer cells against infection with an avirulent strain of *Salmonella choleraesuis* in mice. **J. Leukoc. Biol.**, Nagoya, v. 66, n. 3, 382-390, 1999.

HOLT, P. S.; STONE, H. D.; GAST, R. K.; PORTER JR., R. E. Growth of *Salmonella enteritidis* (SE) in egg contents from hens vaccinated with an SE bacterin. **Food Microbiol.**, Athens, v. 13, n. 6, p. 417-426, 1996.

IANARO, A.; XU, D.; O'DONNELL, C. A.; DI-ROSA, M.; LIEW, F. Y. Expression of TGF- β in attenuated *Salmonella typhimurium*: oral administration leads to the reduction of inflammation, IL-2 and IFN- γ , but enhancement of IL-10, in carrageenin-induced oedema in mice. **Immunology**, Glasgow, v. 84, n. 1, p. 8-15, 1995.

INOUE, A. Y.; BERCHIERI JR., A.; BERNARDINO, A.; PAIVA, J. B.; STERZO, E. V. Passive immunity of progeny from broiler breeders vaccinated with oil-emulsion bacterin against *Salmonella* Enteritidis. **Avian Dis.**, Campinas, v. 52, n. 4, p. 567-571, 2008.

IUCHI S.; CAMERON D. C.; LIN, E. C. C. A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Boston, v. 171, n. 2, p. 868-873, 1989.

IUCHI S.; LIN, E. C. C. *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Boston, v. 85, n. 6, p. 1888-1892, 1988.

JETER, R. M. Cobalamin dependent 1,2-propanediol utilization by *Salmonella typhimurium*. **J. Gen. Microbiol.**, Lubbock, v. 136, n. 5, p. 887-896, 1990.

JETER, R. M.; OLIVERA, R. B.; ROTH, J. R. *Salmonella typhimurium* synthesizes cobalamin (vitamin B₁₂) de novo under anaerobic growth. **J. Bacteriol.**, Salt Lake City, v. 159, n. 1, p. 206-213, 1984.

JOHN, B.; RAJAGOPAL, D.; PASHINE, A.; RATH, S.; GEORGE, A.; BAL, V. Role of IL-12-independent and IL-12-dependent pathways in regulating generation of the IFN-

gamma component of T cell responses to *Salmonella typhimurium*. **J. Immunol.**, New Delhi, v. 169, n. 5, p. 2545-2552, 2002.

JONES, M. A.; WIGLEY, P.; PAGE, K. L.; HULME, S. D.; BARROW, P. A. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. **Infect. Immun.**, Berkshire, v. 69, n. 9, p. 5471-5476, 2001.

KAISER, P.; ROTHWELL L.; GALYOV E. E.; BARROW P. A.; BURNSIDE J.; WIGLEY P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. **Microbiol.**, Leicester, v. 146, n. 12, p. 3217-3226, 2000.

KAWAKAMI, M.; OSAWA, N.; MITSUHASHI, S. Experimental salmonellosis. VII. Comparison of the immunizing effect of live vaccine and materials extracted from *Salmonella enteritidis*. **J. Bacteriol.**, Maebashi, v. 92, n. 6, p. 1585-1589, 1966.

KAUFMANN S. H. E. Immunity to intracellular bacteria. **Ann. Rev. Immunol.**, Ulm, v. 11, p. 129-163, 1993.

KELLER, L. H.; BENSON, C. E.; KROTEK, K.; ECKROADE, J. *Salmonella enteritidis* colonisation of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. **Infect. Immun.**, Kennett Square, v. 63, n. 7, p. 2443-2449, 1995.

KINDE, H.; READ, D. H.; ARDANS, A.; BREITMEYER, R. E.; WILLOUGHBY, D.; LITTLE, H. E.; KERR, D.; GIREESH, R.; NAGARAJA, K. V. Sewage effluent: likely source of *Salmonella enteritidis*, phage type 4 infection in a commercial chicken layer flock in southern California. **Avian Dis.**, Davis, v. 40, n. 3, p. 672-676, 1996a.

KINDE, H.; READ, D. H.; CHIN, R. P.; BICKFORD, A. A.; WALKER, R. L.; ARDANS, A.; BREITMEYER, R. E.; WILLOUGHBY, D.; LITTLE, H. E.; KERR, D.; GARDNER, I. A. *Salmonella enteritidis*, phage type 4 infection in a commercial layer flock in southern California: bacteriologic and epidemiologic findings. **Avian Dis.**, Davis, v. 40, n. 3, p. 665-671, 1996b.

LALMANACH, A. C.; LANTIER, F. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. **Microb. Infect.**, Nouzilly, v. 1, n. 9, p. 719–726, 1999.

LEE, G. M.; JACKSON, G. D. F.; COOPER, G. N. The role of serum and biliary antibodies and cell-mediated immunity in the clearance of *S. Typhimurium* from chickens. **Vet. Immunol Immunopathol.**, Kensigton, v. 2, n. 3, p. 233-252, 1981.

LEE, G. M.; JACKSON, G. D. F.; COOPER, G. N. Infection and Immune responses in chickens exposed to *Salmonella Typhimurium*. **Avian Dis.**, Kensigton, v. 27, n. 3, p. 577-583, 1983.

LEE, Y. J.; MO, I. P.; KANG, M. S.; Safety and efficacy of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in young laying chickens. **Avian Pathol.**, Daegu, v. 34, n. 4, p. 362-366, 2005.

LIBBY, S. J.; LESNICK M.; HASEGAWA P.; WEIDENHAMMER E.; GUINEY D. G. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. **Cell. Microbiol.**, Raleigh, v. 2, n. 1, p. 49-58, 2000.

LI, J.; SMITH, N. H.; NELSON, K.; CRICHTON, P. B.; OLD, D. C.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile *Salmonellae*. **J. Med. Microbiol.**, Pennsylvania, v. 38, n. 2, p. 129-139, 1993.

LISTER, S. A. *Salmonella enteritidis* infection in broilers and broiler breeders. **Vet. Rec.**, Norwich, v. 123, n. 13, p. 350, 1988.

LUNDRIGAN, M. D.; KADNER, R. J. Altered cobalamin metabolism in *Escherichia coli* *btuR* mutants affects *btuB* gene regulation. **J. Bacteriol.**, Charlottesville, v. 171, n. 1, p. 154-161, 1989.

MAGGIO-HALL, L. A.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. In vitro synthesis of the nucleotide loop of cobalamin by *Salmonella typhimurium* enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Madison, v. 96, n. 21, p. 11798–11803, 1999.

MAGGIO-HALL, L. A.; CLAAS, K. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. The last step in coenzyme B₁₂ synthesis is localized to the cell membrane in bacteria and archaea. **Microbiology**, v. 150, n. 5, p. 1385-1395, 2004.

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

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S. W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SUN, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, D.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R. K. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, San Diego, v. 413, n. 6858, p. 852-856, 2001.

MCILROY, S. G.; MCCRACKEN, R. M.; NEILL, S. D.; O'BRIEN, J. J. Control, prevention and eradication of *Salmonella enteritidis* infection from broiler and broiler breeder flocks. **Vet. Rec.**, Belfast, v. 125, n. 22, p. 545-548, 1989.

MCSORLEY, S. J.; COOKSON B. T.; JENKINS M. K. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. **J. Immunol.**, Minneapolis, v. 164, n. 2, p. 986-993, 2000.

MEAD, G. C.; BARROW, P.A. *Salmonella* control in poultry by competitive exclusion or immunization. **Lett. Appl. Microbiol.**, Huntingdon, v. 10, n. 6, p. 221-227, 1990.

MEAD P. S.; SLUTSKER L.; DIETZ V.; MCCRAIG L. F.; BRESEE J. S.; SHAPIRO C.; GRIFFIN P. M.; TAUXE R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 5, n. 5, p. 607-625, 1999.

METHNER, U.; BERNDT, A.; STEINBACH, G. Combination of competitive exclusion and immunization with an attenuated live *Salmonella* vaccine strain in chickens. **Avian Dis.**, Jena, v. 45, n. 3, p. 631-638, 2001.

METHNER, U.; STEINBACH, G.; MEYER, H. The effectiveness of *Salmonella* immunization of broiler breeders on the *Salmonella* colonization of the animals and their progeny after experimental oral infection. **Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.**, Berlin, v. 107, n. 6, p. 192-198, 1994.

METHNER, U.; STEINBACH, G. Efficacy of maternal *Salmonella* antibodies and experimental oral infection of chicks with *Salmonella enteritidis*. **Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.**, Jena, v. 110, n. 10, p. 373-377, 1997.

MEYER, H.; BARROW, P. A.; PARDON, P. *Salmonella* immunisation in animals. In: **Proceedings of the international symposium on *Salmonella* and salmonellosis**. Ploifragan, France. Sept. 15–17, 1992, pp.345–74.

MITTRUCKER, H. W.; RAUPACH, B.; KOHLER, A.; KAUFMANN, S. H. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. **J. Immunol.**, Berlin, v. 164, n. 4, p. 1648-1652, 2000.

NAGARAJA, K. V.; RAJASHEKARA G. Vaccination against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* infection: dilemma and realities. In: Wray C, Wray A (Eds). **Salmonella in domestic animals**. Oxford: CABI International, 1990.

NAIKI, Y., NISHIMURA, H., KAWANO, T., TANAKA, Y., ITOHARA, S., TANIGUCHI, M., YOSHIKAI, Y. Regulatory role of peritoneal NK1.1+ alpha beta T-cells in IL-12 production during *Salmonella* infection. **J. Immunol.**, Nagoya, v. 163, n. 4, p. 2057-2063, 1999.

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

O'BRIEN, J. D. P. *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. **Vet. Rec.**, , v. 122, n. 9, p. 214, 1988.

OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, A. C. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Braz. J. Microbiol.**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 51-56, 2005.

OSAWA, N.; KAWAKAMI, M.; KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Experimental Salmonellosis VIII. Postinfective immunity and its significance for conferring cellular immunity. **J. Bacteriol.**, Maebashi, v. 93, n. 5, p. 1534-1540, 1967.

PAIVA, J. B.; PENHA FILHO, R. A. C.; BERCHIERI JR., A. Estudo sobre a prevenção da infecção de aves por mutante de *Salmonella* Gallinarum *cobS⁻cbiA⁻*. In: Congresso de produção, comercialização e consumo de ovos, 5., 2007, Indaiatuba-SP. **Anais...** São Paulo: Associação Paulista de Avicultura, 2007, p. 62-63.

PASCOPELLA, L.; GHORI, B. N.; MONACK, D.; FALKOW, S.; SMALL, P. L. Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. **Infect. Immun.**, Montana, v. 63, n. 11, p. 4329-4335, 1995.

PIE, S.; TRUFFA-BACHI, P.; PLA, M.; NAUCIEL, C. Th1 response in *Salmonella typhimurium*-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. **Infect. Immun.**, Paris, v. 65, n. 11, p. 4509-4514, 1997.

PINHEIRO L. A. S.; OLIVEIRA G. H.; BERCHIERI JR., A. Experimental *Salmonella enterica* serovar Pullorum infection in two commercial varieties of laying hens. **Avian Pathol.**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 129-133, 2001.

POPPE, C. *Salmonella* infections in domestic fowl. In C. Wray & A. Wray (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. Wallingford: CABI Publishing, 2000.

PRICE-CARTER, M.; TINGEY, J.; BOBIK, T. A.; ROTH, J. R. The alternative electron acceptor tetrathionate supports B₁₂-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. **J. Bacteriol.**, Salt Lake City, v. 183, n. 8, p. 2463-2475, 2001.

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

RICHTER-DAHLFORS, A. A.; BUCHAN, A. M.; FINLAY, B. B. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. **J. Exp. Med.**, Vancouver, v. 186, n. 4, p. 569-580, 1997.

RICHTER-DAHLFORS, A. A.; RAVNUM, S.; ANDERSSON, D. I. Vitamin B₁₂ repression of the *cob* operon in *Salmonella typhimurium*: translational control of the *cbiA* gene. **Mol. Microbiol.**, Uppsala, v. 13, n. 3, p. 541-553, 1994.

RODRIGUE, D. C.; TAUXE, R. V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic?. **Epidemiol. Infect.**, Atlanta, v. 105, n. 1, p. 21-27, 1990.

RONDON, M. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. The *poc* locus is required for 1,2-propanediol-dependent transcription of the cobalamin biosynthetic (*cob*) and propanediol utilization (*pdu*) genes of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 174, n. 7, p. 2267-2272, 1992.

ROSU V.; CHADFIELD M. S.; SANTONA A.; CHRISTENSEN J. P.; THOMSEN L. E.; RUBINO S.; OLSEN J. E. Effects of *crp* deletion in *Salmonella enterica* serotype Gallinarum. **Acta Vet. Scand.**, Sassari, v. 49, n. 14, 2007. Disponível em: <<http://www.actavetscand.com/content/49/1/14>>. Acesso em: 25 mar. 2008.

ROTH, J. R.; LAWRENCE, J. G.; RUBENFIELD, M.; KIEFFER-HIGGINS, S.; CHURCH, G. M. Characterization of the cobalamin (Vitamin B₁₂) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Salt Lake City, v. 175, n. 11, p. 3303-3316, 1993.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 2001, vols 1,2,3.

SCARLETT, F. A.; TURNER, J. M. Microbial metabolism of amino alcohols. Ethanolamine catabolism mediated by coenzyme B₁₂-dependent ethanolamine ammonia-lyase in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. **J. Gen. Microbiol.**, V. 95, n. 1, p. 173-176, 1976.

SEVIL DOMÈNECH, V. E.; PANTHEL, K.; WINTER, S. E.; RÜSSMANN, H. Heterologous prime-boost immunizations with different *Salmonella* serovars for enhanced antigen-specific CD8 T-cell induction. **Vaccine**, Munich, v. 26, n. 15, p. 1879-1886, 2008.

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

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl Typhoid and Pullorum Disease. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SIGWART, D. F.; STOCKER, B. A. D.; CLEMENTS, J. D. Effect of a *purA* mutation on efficacy of *Salmonella* live vaccine vectors. **Infect. Immun.**, New Orleans, v. 57, n. 6, p. 1858-1861, 1989.

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

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

SOERJADI-LIEM, A. S.; CUMMING, R. B. Studies on the incidence of *Salmonella* carriers in broiler flocks entering a poultry processing plant in Australia. **Poult Sci.**, St. Leonards, v. 63, n. 5, p. 892-895, 1984.

STERZO E. V.; PENHA FILHO, R. A. C.; PAIVA, J. B.; BERCHIERI JR, A. Time required to protect the intestinal tract of chicks against *Salmonella enterica* serovar

Enteritidis using competitive exclusion. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 119-122, 2005.

THYGESEN, P.; CHRISTENSEN, H. B.; HOUGEN, H. P.; RYGAARD, J. Transfer of primed CD4+OX40- T lymphocytes induces increased immunity to experimental *Salmonella typhimurium* infections in rats. **APMIS.**, Copenhagen, v. 105, n. 5, p. 410-413, 1997.

TIMMS, L. M.; MARSHALL, R. N.; BRESLIN, M. F. Laboratory and field-trial assessment of protection given by *Salmonella enteritidis* PT4 inactivated, adjuvant vaccine. **Br. Vet. J.**, Weybridge, v. 150, n. 1, p. 93-102, 1994.

TIMMS, L. M.; MARSHALL, R. N.; BRESLIN, M. F. Laboratory assessment of protection given by an experimental *Salmonella enteritidis* PT4 inactivated adjuvant vaccine. **Vet. Rec.**, Weybridge, v. 127, n. 25-26, p. 611-614, 1990.

TORAYA, T.; HONDA, S.; FUKULI S. Fermentation of 1,2-propanediol and 1,2-ethanediol by some genera of Enterobacteriaceae, involving coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase. **J. Bacteriol.**, Kyoto, v. 139, n. 1, p. 39-47, 1979.

TURNER, A. K.; BARBER, L. Z.; WIGLEY, P.; MUHAMMAD, S.; JONES, M. A.; LOVELL, M. A.; HULME, S.; BARROW, P. A. Contribution of proton-translocating proteins to the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Gallinarum, and Dublin in chickens and mice. **Infect. Immun.**, Berkshire, v. 71, n. 6, p. 3392-3401, 2003.

VAN DEVENTER, S. J. H. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. **Intensive Care Med.**, Amsterdam, v. 26, Supp. 1, p. S98-S102., 2000.

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, I.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P. A. Vaccination and early protection

against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiol. Infect.**, Ghent, v. 133, n. 6, p. 959-978, 2005.

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

VOETSCH, A. C.; VAN GILDER, T. J.; ANGULO, F. J.; FARLEY, M. M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P. R.; DENEEN, V. C.; TAUXE R. V. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 38, Suppl. 3, p. S127–S134, 2004.

WARREN, M. J.; RAUX, E.; SCHUBERT, H. L.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 19, n. 4, p. 390-412, 2002.

WEINING, K. C.; SCHULTZ, U.; MUNSTER, U.; KASPERS, B.; STAEHEL, P. Biological properties of re-combinant chicken interferon- γ . **Eur. J. Immunol.**, Freiburg, v. 26, n. 10, p. 2440-2447, 1996.

WIGLEY P., HULME, S., POWERS, C., BEAL R., SMITH, A., BARROW., P. Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. **Vet. Res.**, Liverpool, v. 1, n. 2, 2005. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/1/2>>. Acesso em: 15 nov. 2008.

WILSON, J. E. Fowl typhoid the effect of vaccination on the natural and experimental disease. **Vet. Rec.**, London, v. 68, p. 664-668, 1956.

YAMAMOTO, H.; WATANABE, H.; SATO, G.; IKEMORI, Y; MIKAMI, T. Identification of immunoglobulin in chicken eggs and their antibody activity. **Jap. J. Vet. Res.**, Kyoto, v. 23, n. 3, p. 131-140, 1975.

ZANCAN, F. B.; BERCHIERI, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. *Salmonella* spp. investigation in transport box of day old birds. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 230-232, 2000.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; BARROW, P. A. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine**, Berkshire, v. 17, n. 20-21, p. 2538-2545, 1999.

ZHANG-BARBER, L; TURNER, A. K.; MARTIN, G.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; BARROW, P A. Influence of genes encoding proton-translocating enzymes on suppression of *Salmonella typhimurium* growth and colonization. **J. Bacteriol.**, Berkshire, v. 179, n. 22, p. 7186-7190, 1997.