

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

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE BACTERINAS
COMERCIAIS NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR
Salmonella Enteritidis EM GALINHAS DE POSTURA
COMERCIAL.**

Aline Mesquita Galvão Moura

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária - Área de concentração em Patologia Animal

Jaboticabal- São Paulo- Brasil

2007

DADOS CURRRICULARES DA AUTORA

ALINE MESQUITA GALVÃO MOURA - nascida em 02 de maio de 1977, em Bebedouro - SP. Médica Veterinária, formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP/Jaboticabal em 2002. Fez residência na área de Ornitopatologia, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/UNESP/Botucatu, de março de 2003 a fevereiro de 2005. Em março de 2005 iniciou o curso de mestrado na FCAV/UNESP/Jaboticabal em Medicina Veterinária na área de Patologia Animal, terminando o mesmo no ano de 2007.

SUMÁRIO

Assunto	Página
Lista de Tabelas.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1- Introdução.....	1
2- Revisão de Literatura.....	3
2.1- Morfologia e Classificação do Gênero <i>Salmonella</i>	3
2.2- Epidemiologia e Patogenia.....	4
2.3- Prevenção e Controle.....	7
2.4- Imunidade para <i>Salmonella</i>	9
2.5- Efeito da Vacinação.....	11
3- Objetivo.....	14
4- Material e Métodos.....	15
4.1- Amostra Bacteriana.....	15
4.2- Preparo do Inóculo de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	15
4.3- Bacterinas utilizadas.....	15
4.4- Aves utilizadas.....	15
4.5- Delineamento Experimental.....	16
4.6- Exames Laboratoriais.....	17
4.6.1- Avaliação da presença de SE nas aves.....	17
4.6.2- Avaliação da excreção fecal.....	17
4.6.3- Análise dos ovos.....	18
4.7- Análise Estatística.....	18
5- Resultados.....	19
6- Discussão.....	26
7- Conclusões.....	32
8- Referências.....	33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Média do número (Log_{10}) de células viáveis de SE Nal/Spec^r em baço, fígado, ceco e ovário de aves sacrificadas dois dias após o desafio.....19
- Tabela 2.** Pesquisa de SE Nal/Spec^r em fígado, conteúdo cecal e ovário das aves sacrificadas após 4 suabes de cloaca consecutivos com resultados negativos para SENal/ Spec^r21
- Tabela 3.** Inspeção da cloaca de aves comerciais mediante utilização de suabe para detecção de SE Nal/Spec^r.....23
- Tabela 4.** Análise dos ovos provenientes de poedeiras vacinadas com três diferentes produtos comerciais e, submetidas a três desafios com SE Nal/Spec^r.....25

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE BACTERINAS COMERCIAIS NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *Salmonella* Enteritidis EM GALINHAS DE POSTURA COMERCIAL.

RESUMO

Devido ao grande número de casos de toxinfecção alimentar e aos prejuízos sócio-econômicos causados pela *Salmonella* Enteritidis aos seres humanos, tornam-se necessário estudos sobre a prevenção e controle desta bactéria nos plantéis avícolas. Assim, o objetivo deste trabalho foi a análise do emprego de bacterinas inativadas oleosas contra *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) em aves de postura comercial, visando prevenir a excreção fecal e a contaminação dos ovos. Foram utilizadas três formulações de bacterinas comerciais de SE em emulsão oleosa. As aves foram vacinadas na oitava e décima sexta semana de idade e foi mantido um grupo de aves sem vacinação (controle). Na vigésima semana de idade, treze aves de cada tratamento foram desafiadas com uma dose oral de aproximadamente 10^9 células viáveis de SE fagotipo 4 (resistente ao ácido nalidíxico e a espectomicina), sendo que este procedimento foi repetido na vigésima quinta e trigésima primeira semanas de idade. A eficácia das vacinas empregadas foi conferida através de exames laboratoriais, para pesquisa de SE no conteúdo cecal, baço, ovário e ovos. A vacinação conferiu proteção parcial contra colonização de SE no ceco e contra eliminação da bactéria nas fezes e nos ovos, portanto, recomenda-se que o uso das bacterinas seja complementado com outras formas de controle para SE.

Palavras- chave: *Salmonella* Enteritidis, bacterinas, galinhas de postura.

EVALUATION OF THE EFFICACY OF COMMERCIAL BACTERINS IN THE CONTROL OF THE INFECTION FOR *Salmonella* Enteritidis IN THE LAYING HENS.

ABSTRACT

Due to the great number of outbreaks of food poisoning and the socio-economic issues caused to the human beings by the *Salmonella* Enteritidis, it becomes necessary the study on the prevention and control of this bacterium in the poultry flocks. Thus, the objective of this work was the analysis of the use of bacterins against *Salmonella* Enteritidis infection in commercial birds, aiming to prevent the fecal excretion and the contamination of eggs. Have been used three *Salmonella* Enteritidis oil-emulsion commercial bacterins formulations. The laying hens were vaccinated in the eighth and sixteenth weeks old and one group of birds was kept as nonvaccinated control. On twentieth weeks ago, thirteen birds of each treatment were challenged with an oral dose of approximately 10^9 viable cells of phage type 4 *Salmonella* Enteritidis (resistant to the acid nalidixic and the espectomicin), this procedure was repeated in the twentieth fifth and thirtieth first weeks ago. The efficacy of employed vaccines was conferred through laboratorial examinations, for research of SE from fecal samples, spleen, ovary and eggs. The vaccination conferred partial protection against caecal colonization and against shedding of SE in the feces and eggs, therefore, it is recommended that the use of the killed bacterins be complemented with other forms of SE control.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, bacterins, laying hens.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil vem conquistando novos e exigentes mercados, sendo, atualmente, o maior exportador e terceiro produtor mundial de carne de aves (ABEF 2006). Esta condição se deve à utilização de modernas técnicas utilizadas na avicultura, entre as quais se destaca o manejo durante a criação e a nutrição das aves (DICKEL, 2004); deve-se também, à oferta de produtos avícolas de alta competitividade e confiabilidade de segurança alimentar (SONCINI, 2003). Nesse sentido, tem havido grandes avanços nos processos de produção e nas medidas sanitárias aplicadas às aves, particularmente no controle de agentes infecciosos, tais como, a *Salmonella*.

As salmoneloses aviárias são causadas por bactérias do gênero *Salmonella*, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, e compreendem microrganismos patogênicos para o homem e animais (GAST, 1997; BERCHIERI JÚNIOR, 2000). Dentre as salmonelas, destaca-se a *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE), causadora de toxinfecções alimentares em seres humanos, através do consumo, principalmente, de produtos alimentícios de origem avícola, como carne, ovos e seus derivados.

A partir da década de 1990, no Brasil, a S. Enteritidis (SE) passou a ser o sorotipo mais identificado nos casos de toxinfecção alimentar em seres humanos. Nos Estados Unidos, entre 1985 e 1995, foram relatados 582 surtos provocados por SE, relacionados com 24.000 doentes, 2.200 internações e 70 mortes, incluindo crianças e idosos (DICKEL, 2004).

A complexa epidemiologia da *Salmonella* na cadeia da produção de aves envolve a transmissão vertical, via ovo, desencadeando o nascimento de pintos infectados. Envolve, também, a transmissão horizontal, com a contaminação do ambiente e da ração, além da existência de diferentes espécies animais que constituem reservatórios da bactéria.

A prevenção e controle da SE constitui uma tarefa árdua, mas extremamente necessária. As medidas utilizadas para a redução da bactéria nas

aves e no ambiente de criação constituem-se em: biosseguridade; aquisição de aves, rações e matérias-primas livres de *Salmonella*; uso de ácidos orgânicos e peletização da ração; administração de produtos de exclusão competitiva e imunização com vacinas vivas ou inativadas oleosas (bacterinas).

De acordo com a instrução normativa atual (Brasil,2003), é liberado o uso de bacterinas contra *Salmonella* Enteritidis (SE) em reprodutoras comerciais. As aves matrizes podem ser controladas para SE e *Salmonella* Typhimurium, mas devem ser livres de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Já as linhagens puras e avozeiros não podem ser vacinadas e devem ser livres dos quatro sorotipos de *Salmonella* descritos acima.

A vacinação é um método de prevenção eficaz no controle da SE em aves (TIMMS et al; 1990,1994; GAST et al. 1992,1993; BARBOUR et al.1993). Contudo a aplicação de uma estratégia de vacinação eficiente requer um rigoroso conhecimento e entendimento da epidemiologia da infecção provocada por *Salmonella* em aves, juntamente com o entendimento da eficácia e potencial das vacinas utilizadas (VAN IMMENSEEL *et al.*, 2005). É necessário a análise do benefício da vacina, o que envolve custo da vacina, da mão de obra, medida de índices zootécnicos e da excreção fecal e contaminação dos ovos.

Diante das considerações referidas, elaborou-se o presente trabalho com o objetivo de analisar a utilização de bacterinas inativadas comerciais contra *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em aves de postura comercial, visando a prevenir a excreção fecal e a contaminação dos ovos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MORFOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO *SALMONELLA*

Os microrganismos do gênero *Salmonella* são bacilos curtos de 0,7 a 1,5 x 2,5 µm, Gram-negativos, não esporulados. Em sua grande maioria, são móveis com flagelos peritríquios, embora alguns sorotipos, como *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, sejam imóveis. A temperatura de crescimento está entre 5 e 45°C, sendo ideal a 37°C e o pH entre 4 e 9, sendo ideal em torno de 7. As salmonelas crescem em meio de cultura para enterobactérias. Em ágar sangue, formam colônias de 2-4 mm de diâmetro, elevadas, com bordas lisas e arredondadas. As culturas de *Salmonella* mantêm-se viáveis por longos períodos em meios que contenham peptona (HOLT, 1994; GAST, 1997).

São bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, possuem habilidade para metabolizar nutrientes, catabolizando D-glicose ou outros carboidratos, com exceção de lactose e sacarose, com produção de ácido e gás. São catalase positiva e oxidase negativa como todos os membros da família Enterobacteriaceae. Não fermentam malonato, não hidrolisam a uréia, não produzem indol; utilizam citrato como fonte de carbono, reduzem nitrato a nitrito e podem produzir ácido sulfídrico (DICKEL, 2004).

Na classificação recomendada por POPOFF *et al.* (1996), os sorotipos de *Salmonella*, cerca de 2.500, pertencem a duas espécies: *Salmonella enterica* com seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) e *Salmonella bongori*, que contém menos de 10 sorotipos e que são extremamente raros. Os sorotipos são caracterizados com base em antígenos somáticos (O) e flagelares (H). A *Salmonella enterica*, subespécie *enterica*, apresenta o maior número de sorotipos (RODRIGUES, 2005). Dentre estes, cerca de 80 a 90 são os mais comuns em casos de infecção dos seres humanos e animais. Alguns deles, podem infectar as aves, causando ou não o paratifo aviário e, por meio de produtos alimentícios de origem avícola, estarem associados a casos de toxinfecção alimentar em humanos (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

2.2 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA

As salmonelas, incluindo-se a *Salmonella* Enteritidis (SE), além de causarem o paratifo aviário são também os principais agentes de toxinfecção alimentar em seres humanos, por intermédio da ingestão de alimentos de origem animal contaminados. As salmonelas são carreadas por uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo animais silvestres, domésticos e o ser humano. Informações sobre a incidência e distribuição dos sorotipos em populações de animais domésticos é essencial para o entendimento da relação parasita-hospedeiro, dentro e entre os reservatórios de agentes das salmoneloses humana e animal (GAST, 1997).

Os alimentos de origem animal são os principais responsáveis pela infecção humana, entre eles, aqueles de origem avícola (SANTOS et al. 2000; OLIVEIRA e SILVA, 2000), destacando-se ovos e seus derivados (RODRIGUE et al., 1990; HUMPHREY, 1994), principalmente a maionese caseira (DUARTE e SILVA, 2002).

Segundo SIMÕES et al. (2001), ovos, seus derivados e pratos contendo os mesmos mal cozidos, foram os principais responsáveis por 115 surtos alimentares por SE ocorridos na região de Campinas-SP, sendo que a maionese caseira e a cobertura de bolos foram responsáveis por 57% e 15% dos casos, respectivamente.

A primeira evidência do envolvimento de SE com infecção originada do consumo de alimentos preparados com ovos, ocorreu em um grande surto nos Estados Unidos em 1986, relacionado a uma massa comercial congelada e recheada com uma mistura de queijo, condimentos esterilizados e ovos crus (SILVA E DUARTE, 2002).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de SE em aves, com sinais clínicos e mortalidade, foi apresentado por pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP) em 1990 (FERREIRA et al., 1990). Estudos epidemiológicos, incluindo a fagotipagem e sonda complementar de rRNA, sugerem que a entrada

de SE no Brasil, deveu-se à importação de material genético avícola contaminado, provavelmente no final da década de 80 (SILVA E DUARTE, 2002).

Na Europa, a proporção de casos de SE sobre o total de salmoneloses humanas aumentou de 9,9% em 1985 para 26,1% em 1994 e; entre 1993 e 1994, este sorotipo esteve associado a 83% dos surtos relacionados ao consumo de ovos (BOYCE et al., 1996).

A infecção por SE em aves é importante devido aos problemas relacionados à saúde pública, implicações na saúde animal e nas exportações (AMENT *et al.*, 1993). Em um surto ocasionado por SE em 1482 indivíduos, na Inglaterra e no País de Gales, segundo ROBERTS e SOCKETT (1994), 73% dos custos devido à toxinfecção alimentar por SE estavam diretamente associados com diagnóstico, tratamento e faltas ao trabalho.

HUMPHREY et al. (1991a), trabalhando com aves infectadas por *Salmonella*, constataram que cinco delas, com resultados de exames de fezes negativos para a presença da bactéria, produziram ovos positivos, sugerindo que a glândula da casca, ou outra parte do oviduto, pode ter sido o sítio da infecção. Vários trabalhos verificaram que ovos são contaminados durante a formação ou passagem pelos órgãos reprodutivos, como oviduto e vagina de aves infectadas por SE (MIYAMOTO et al., 1997; OKAMURA et al., 2001).

GAST e BEARD (1990) observaram uma correlação entre fezes positivas de galinhas infectadas artificialmente com SE PT 13a e a contaminação da casca dos ovos. Resultados similares foram encontrados por BARROW e LOVELL (1991), os quais, trabalhando com aves adultas infectadas oralmente com SE, detectaram 0,31% e 5,86% de ovos positivos para SE. Nos primeiros, somente o conteúdo foi analisado e nos restantes, além do conteúdo, a casca também foi analisada. Isto sugere que estes, provavelmente, tornaram-se contaminados durante a passagem através da cloaca, e não de infecção resultante do ovário.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que as principais fontes de infecção de lotes de aves comerciais são pintos oriundos de lotes de matrizes infectadas, infecção cruzada no incubatório e contaminação ambiental na granja (OPITZ et al, 1992).

ZANCAN et al. (2000) detectaram *Salmonella* em 77% das caixas de transporte de pintos com um dia de idade, de linhagem de aves reprodutoras pesadas e 44% de linhagem de aves poedeiras comerciais, sendo encontrado o sorotipo Enteritidis em 50% dessas caixas. GAMA et al., (2003) também investigaram a presença de *Salmonella* em amostras de mecônio colhidas de caixas de transporte de pintainhas para postura comercial e encontraram *Salmonella* Enteritidis em 129 das 614 amostras analisadas.

A *Salmonella*, após invadir o tecido linfóide, incluindo placas de Peyer e tonsilas cecais em aves (ZHANG-BARBER et al.1999), na mucosa intestinal, migra da submucosa para vasos linfáticos, sendo ingerida por células fagocíticas do sistema imune (HORMAECHE et al., 1993). A seguir, alcança a corrente sanguínea e reside em fígado, baço e medula óssea; nesse estágio ocorre a multiplicação, que dependerá do sorotipo de *Salmonella* e da resistência genética do hospedeiro (HORMAECHE et al., 1993).

GAST e BEARD (1990c), após inoculação oral de 10^9 células de *Salmonella* Enteritidis em galinhas, encontraram as seguintes amostras positivas para SE: 60% cecais, 53% de fígados, 49% de baços, 19% de ovários e 17% de ovidutos.

Alguns sorotipos de *Salmonella* como Enteritidis e Typhimurium (ST) são extremamente invasivos. Causam extensa colonização intestinal com excreção fecal e provocam doença sistêmica envolvendo o sistema retículo endotelial (BARROW, 1995). Segundo ZHANG-BARBER et al. (1999), a epidemiologia da SE e ST pode ser complexa, pois estes sorotipos geralmente colonizam o trato digestivo de animais sem causar doença, ou podem aparecer em certas circunstâncias, como em aves jovens que apresentam sistema imunológico imaturo, ou em períodos de estresse, como extremos de temperatura e pico de postura.

Os sinais da infecção por salmonelas paratíficas em aves jovens são: sonolência, diarreia, asas caídas e refugagem (BERCHIERI JÚNIOR, 2000). Em aves adultas, raramente se observam sinais clínicos, mas as aves podem apresentar queda na produção de ovos em função de alterações de ovário e

oviduto que podem se apresentar atrofiados ou com folículos irregulares, hemorrágicos e necróticos (BLAXLAND et al. 1982; GAST, 1994; BERCHIERI JR. 2000).

Conforme GAST (1997), a contaminação de ovos por *Salmonella* pode provocar mortalidade embrionária e mortalidade em aves recém-nascidas, sem que ocorra a manifestação de sinais clínicos. Estes diminuem com a idade e são raramente observados em aves com mais de duas semanas de vida, no entanto poderá ocorrer aumento da taxa de mortalidade e retardo no crescimento (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

2.3 PREVENÇÃO E CONTROLE

Os programas de prevenção e controle com as infecções provocadas por salmonelas paratíficas contemplam várias medidas coordenadas aplicadas simultaneamente (GAST, 1997), com o objetivo de evitar a transmissão vertical e horizontal da bactéria (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

Segundo McILROY et al. (1989), o risco de transmissão vertical pode ser minimizado pela monitoria de lotes de matrizes testados por métodos bacteriológicos e sorológicos, resultando em aves livres de *Salmonella*; pela aquisição de linhagens de aves de produção mais resistentes à infecção por *Salmonella* (BUMSTEAD, 2000); por medidas como a eliminação de aves portadoras da bactéria; por tratamento dos ovos ainda no galpão e cuidados na incubação de ovos sujos e trincados (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

A biossegurança e o manejo sanitário das aves constituem-se em importantes programas para redução de salmonelas no ambiente. Conforme GAST (1997), um dos métodos empregados é a limpeza e desinfecção do galpão, através do uso de desinfetantes químicos. Porém, nem todos são eficientes e dependem, por exemplo, de como se comportam na presença de grandes quantidades de material orgânico (BERCHIERI & BARROW, 1996). Aliado a isso, salienta-se o controle de roedores, presentes nos galpões de aves e responsáveis

por importante papel na epidemiologia da infecção por *Salmonella*, ao contaminar o ambiente e transmitir a bactéria para aves e ovos (HENZLER & OPITZ, 1992).

Procedimentos específicos visando ao controle de salmonelas em rações de aves incluem a peletização e aplicação de ácidos orgânicos (SILVA, 2005). Segundo GAMA (2001), como a peletização da ração é realizada em temperatura superior a 60° C, o processo pode eliminar a *Salmonella* da ração, desde que não ocorra recontaminação pelo manuseio, por ratos ou insetos. IBA & BERCHIERI (1995), verificaram que a mistura de ácido fórmico e propiônico na ração de aves foi eficaz no controle de *Salmonella* Typhimurium em ração contaminada artificialmente.

O uso indiscriminado de antibióticos e a adição de promotores de crescimento em rações animais contribuíram para a emergência da resistência entre cepas de *Salmonella* e de outras bactérias (BERCHIERI JÚNIOR & BARROW, 1998). Além disso, segundo BARROW (1999), após a retirada do agente terapêutico, pode ocorrer um período no qual as aves podem se tornar suscetíveis à infecção por *Salmonella*, porque a microbiota normal, por si própria inibitória para *Salmonella*, também é afetada pelo uso do antibiótico.

A exclusão competitiva consiste na inoculação oral do conteúdo cecal de aves adultas saudáveis em pintinhos recém-nascidos, acelerando o processo de instalação da microbiota intestinal desejável (NURMI & RANTALA, 1973). Desse modo, dificulta-se que microrganismos patogênicos se instalem na mucosa intestinal, sendo este método importante no controle da infecção por salmonelas em aves com microbiota intestinal imatura ou debilitada (antibioticoterapia).

Outra medida para prevenção e controle da *Salmonella* consiste na vacinação de aves suscetíveis (GAST, 1997). Atualmente, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de analisar a eficácia do uso de vacinas vivas (BARROW et al., 1991; HASSAN e CURTISS III., 1997) e inativadas (TIMMS et al., 1990; GAST et al., 1993; NAKAMURA et al., 1994; MIYAMOTO et al., 1999; WOODWARD et al., 2002). Isso resulta na aplicação deste método de controle, que pode ser utilizado de maneira segura e eficaz como parte do programa de

prevenção da infecção em aves e contaminação dos ovos por SE (GAST et al. 1992).

2.4 IMUNIDADE PARA *SALMONELLA*

Respostas imunes para *Salmonella* dependem da espécie hospedeira e do sorotipo infectante. Muito do que se conhece sobre a imunidade contra *Salmonella* advém de estudos sobre a infecção experimental de camundongos por *Salmonella* Typhimurium e as informações obtidas são extrapoladas para infecções causadas por *Salmonella* Enteritidis em aves (VAN IMMENSEEL et al., 2005).

Imunoglobulina A (IgA), leucócitos e linfócitos associados à mucosa, constituem-se na primeira linha de defesa contra infecções causadas por *Salmonella* Enteritidis (SHEELA et al., 2003). A secreção de IgA limita a colonização da mucosa intestinal por SE, prevenindo a aderência e subsequente invasão e multiplicação da bactéria no intestino (SHROFF et al., 1995).

Na pesquisa realizada por SHEELA et al. (2003), verificou-se que no pico de secreção de IgA, ocorrido 28 dias pós inoculação oral de SE em aves, houve uma redução de lesões na mucosa intestinal, sugerindo que esta imunoglobulina pode ter um importante papel no controle da infecção por SE no intestino.

DESMIDT et al. (1998), após desafio experimental via oral de SE em poedeiras, verificaram que nas aves do grupo controle houve uma redução da excreção fecal da bactéria associada a um pico de IgA no lúmen intestinal, quando comparadas ao grupo de aves bursectomizadas. Isto indica um efeito protetor desta imunoglobulina contra colonização intestinal. Resultados similares foram obtidos na pesquisa de BROWNELL et al. (1970), trabalhando com *S. Typhimurium*.

Segundo SHEELA et al., (2003), a infecção via oral por SE provocou aumento nos títulos de imunoglobulina G séricas específicas, mas não induziu a uma proliferação significativa de células mononucleares do sangue e do baço,

sugerindo que a infecção através desta via não é capaz de ativar linfócitos periféricos ou circulantes específicos para SE.

Vários estudos mostram a importância da resposta inata do hospedeiro nas infecções por *Salmonella*. Em camundongos, as células polimorfonucleares têm um importante papel na resistência a infecções por *Salmonella* (HARGIS et al., 1999; FIERER, 2001). Em frangos de corte, granulócitos heterofílicos acumulam-se na mucosa cecal 18 horas após a infecção por SE (VAN IMMERSSEEL et al., 2005).

O controle de infecções primárias com vacinas contendo cepas mortas de *Salmonella* estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e IFN- γ (OKAMURA et al., 2004). Pesquisas com camundongos, demonstraram que a IL-1 e a IL-6 podem apresentar um importante papel na resposta do hospedeiro contra *Salmonella* (KLIMPEL et al., 1995). Por outro lado, a IL-8 recruta leucócitos polimorfonucleares para o sítio primário da infecção (KOGUT, 2002).

O IFN- γ ativa macrófagos e induz à produção de óxido nítrico (NO) (OKAMURA et al., 2004), o qual forma peroxinitrito, um potente oxidante com propriedades anti-microbianas (ALAM et al., 2002); Além de melhorar a expressão de MHC-II pelos macrófagos (KASPERS et al., 1994). O MHC-II são moléculas que apresentam antígenos peptídicos às células T helper ou T auxiliares (T CD4+), estes peptídeos são derivados de salmonelas fagocitadas pelos macrófagos (JANEWAY et al., 2002).

Os macrófagos estimulados pelo IFN- γ ativam a enzima óxido nítrico-sintase que catalisa a produção de óxido nítrico (ON) a partir de L-arginina. O ON é tóxico para muitas bactérias, especialmente as bactérias que residem dentro de macrófagos, como *Salmonella* e *Listeria* (KASPERS et al., 1994). Porém, é importante salientar que existem mecanismos de evasão da *Salmonella* contra a ação do sistema imune do hospedeiro. Existem dois sistemas de secreção tipo III, SPI1-TTSS e SPI2-TTSS, o primeiro participa das etapas iniciais da infecção, como a invasão das células epiteliais da mucosa intestinal pela *Salmonella*, o segundo, promove a sobrevivência e proliferação da bactéria dentro dos

macrófagos (ARROYAVE, 2005). A resistência à fagocitose é também uma razão pela qual as bactérias intracelulares tendem a causar infecções crônicas que podem durar anos, muitas vezes recidivar ou recrudescer após uma cura aparente, e são difíceis de erradicar (JANEWAY et al., 2002).

A imunidade mediada por células é considerada mais importante que a resposta humoral na proteção contra *Salmonella* (VAN IMMERSEEL et al., 2005), atuando na lise da célula infectada (DESMIDT et al., 1998). A resposta mediada por células também é responsável pelo “clearance” tecidual de cepas virulentas de *Salmonella* em aves, enquanto que para o “clearance” intestinal destacam-se as respostas de IgA e leucócitos polimorfonucleares (NAGARAJA & RAJASHEKARA, 1999; BARROW & WALLIS, 2000).

Devido ao fato das salmonelas realizarem uma fase do ciclo de vida dentro das células de seus hospedeiros, principalmente células do baço e fígado (SHEELA et al., 2003; DE BUCK et al., 2004), a resposta humoral sozinha não é capaz de debelar a infecção (DESMIDT et al., 1998). O processo de “clearance” do organismo infectado, realizado através de mecanismos imune dependentes de anticorpos como a opsonização e fagocitose, ocorre quando as salmonelas são liberadas extracelularmente (ROITT, 2003).

Resultados de pesquisa realizada por SHEELA et al. (2003) sugeriram que a infecção oral de aves com *Salmonella* não pode induzir resposta imune que seja efetiva no controle da infecção. Assim, a bactéria persiste nas aves por um grande período de tempo, sem ser eliminada pelo sistema imune (DUNLAP et al., 1991).

2.5 EFEITO DA VACINAÇÃO

Os critérios para uma vacina ideal contra as salmonelas, incluem a proteção efetiva sistêmica e de mucosa e a eficácia na redução da contaminação ambiental e dos ovos. E, ainda, deve oferecer baixo risco à saúde humana e animal, compatibilidade com outras medidas de controle e ser economicamente viável (PRITCHARD et al., 1978)

O objetivo da vacinação contra as salmonelas é impedir a aderência no intestino, a multiplicação e excreção da bactéria pelo organismo de aves infectadas, e também a redução da colonização de órgãos, incluindo fígado, baço e ovário. Assim, aves apropriadamente vacinadas podem suportar uma infecção e eliminar pelas fezes a bactéria, mais rapidamente e efetivamente do que aves não imunizadas (SCHARR, 2003).

Respostas imunes para *Salmonella* dependem do sorotipo, da espécie do hospedeiro infectado e da formulação da bacterina utilizada. Sorotipos espécie-hospedeiro não específicos, como a SE (RODRIGUES, 2005), são aqueles que geralmente provocam gastroenterite em várias espécies hospedeiras e podem induzir doença sistêmica (VAN IMMERSSEEL *et al.*, 2004). Segundo VAN IMMERSSEEL *et al.* (2004), bacterinas autógenas, contendo cepa morta da bactéria, têm sido usadas com sucesso variável no controle de infecções causadas por estes sorotipos.

Pesquisas como a de TIMMS *et al.* (1990) comprovam que aves imunizadas com bacterina contendo cepa de SE em emulsão oleosa e inativada com formalina, apresentam redução dos sinais clínicos, mortalidade e lesões em órgãos, quando comparadas ao grupo de aves controle, sendo que ambos foram desafiados experimentalmente com SE.

Estudos relacionados com a eficácia de bacterinas para o controle de SE em aves são extremamente necessários, pois, as vacinas vivas não são liberadas para uso comercial nos Estados Unidos, Brasil e em muitos outros países (BARROW, 1999; Brasil, 2003). Isso devido aos riscos associados ao uso de cepas vivas atenuadas, tais como reversão da virulência da bactéria (BARROW & LOVELL, 1991., DE BUCK *et al.*, 2004) e imunossupressão das aves vacinadas (EISENSTEIN *et al.*, 1984., LEE *et al.*, 1985., HASSAN e CURTISS III., 1994., ARNOLD e HOLT., 1995).

A eficácia de uma vacina é avaliada pelo nível de colonização intestinal e sistêmica do agente patogênico, bem como por taxas de morbidade e mortalidade do hospedeiro infectado, pós-vacinação e infecção experimental, assim como o nível de proteção das vacinas depende da cepa desafio, da via de administração,

da dose infectante, idade, espécies ou linhagens de aves utilizadas (VAN IMMERSSEEL *et al.*, 2004).

A qualidade e eficácia das bacterinas estão relacionadas com a cepa da bactéria utilizada e com o procedimento de inativação, além do meio de cultura e do adjuvante utilizados no preparo da vacina (BARBOUR *et al.*, 1993).

Várias pesquisas avaliaram a eficácia de vacinas inativadas. GAST *et al.* (1992) evidenciaram que, após desafio de SE, poedeiras vacinadas com bacterina oleosa, inativada em acetona e contendo SE fagotipo 13 a, apresentaram menor isolamento da bactéria de baço, ovário e oviduto. Todavia a proporção da eliminação de SE nas fezes não diferiu estatisticamente do grupo de aves vacinadas (59,8%) e não vacinadas (58,8%). Resultados similares foram encontrados por BARROW *et al.* (1990), os quais também notaram que aves vacinadas com bacterina continuaram a excretar *S. Typhimurium* pelas fezes.

GAST *et al.* (1993) estudando o uso de bacterina oleosa preparada com SE fagotipo 13a e inativada em acetona, isolaram 58% de amostras de fezes positivas para a presença de SE em poedeiras vacinadas e 81% no grupo de aves não vacinadas. Provaram, assim, que o uso da vacinação poderia reduzir o nível de contaminação ambiental e a transmissão horizontal dentro e entre os lotes.

BARBOUR *et al.* (1993) analisaram seis formulações de bacterinas contendo os fagotipos 8, 13^a e 23 de SE, preparadas com diferentes métodos de inativação e natureza de adjuvantes. Concluíram que, após desafio experimental de SE, aves vacinadas com bacterina inativada com 20% de acetona e contendo adjuvante incompleto modificado de Freund, foram protegidas contra eliminação de SE nas fezes por até 7 dias; enquanto nos outros tratamentos este período de proteção foi de apenas 3 dias pós- desafio.

NAKAMURA *et al.* (1994) imunizaram poedeiras com bacterina contendo SE fagotipo 4, inativada em 1% de formalina e preparada com adjuvante incompleto de Freund. Verificaram que, após desafio experimental com SE, isolaram menor número de bactérias de conteúdo cecal, de baço e de fígado das aves vacinadas quando comparadas às do grupo controle.

MIYAMOTO et al. (1999) avaliaram a eficácia da bacterina oleosa (Layermune SE[®]) na redução da contaminação de ovos. Verificaram que aves vacinadas e desafiadas com SE por via vaginal apresentaram isolamento da bactéria de somente 8% dos ovos, comparados a 15,8% no grupo de aves não vacinadas.

DAVISON et al.(1999) trabalharam com 11 lotes de poedeiras comerciais vacinadas com bacterina autógena e/ ou bacterina comercial (Layermune SE[®]) contra SE. Através de análises mensais, durante o período de vida das aves, os pesquisadores verificaram que, apesar do uso da vacina, 63,6% e 100% dos lotes apresentaram amostras ambientais e cultura de órgãos positivos para SE, respectivamente.

LIU et al.(2001) pesquisaram aves vacinadas, via oral ou intramuscular, com cepa de SE fagotipo 4, inativada em 1% de formalina e encapsulada em microesferas biodegradáveis. Verificaram que, após desafio oral com SE, ocorreu uma significativa diminuição da eliminação fecal e colonização de órgãos em relação ao grupo de aves não vacinadas.

WOODWARD et al. (2002), trabalharam com aves vacinadas com bacterina comercial preparada com SE fagotipo 4 e desafiadas via endovenosa com cepa de SE. Verificaram nestas aves, além de redução dos sinais clínicos, o isolamento de 12% de ovos positivos para a bactéria, em relação a 39% de aves do grupo controle.

3.OBJETIVO

Analisar a utilização de três bacterinas contra *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) em aves de postura comercial, avaliando a eficácia através da análise da colonização de órgãos internos, como fígado, baço, ceco e ovário, da excreção fecal e da contaminação dos ovos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra bacteriana

Utilizou-se uma cepa mutante de *Salmonella* Enteritidis pertencente ao fagotipo 4, resistente ao ácido nalidíxico e a espectomicina (SE Nal/Spec), mantida pelo laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp-Campus de Jaboticabal, estado de São Paulo.

4.2 Preparo do inóculo de *Salmonella* Enteritidis

O inóculo consistiu de 2 mL da cultura da cepa de SE Nal/Spec, semeada em caldo nutriente (DIFCO 0003-17) e incubada a 37° C por 24 horas, sob agitação. Esta cultura continha aproximadamente $3,4 \times 10^9$ UFC/mL.

4.3 Bacterinas utilizadas

Foram utilizadas três bacterinas comerciais V1, V2 e V3, na dosagem e recomendações prescritas pelos laboratórios fabricantes. Todas as vacinas foram mantidas sobre refrigeração, na temperatura entre 2 e 6°C e no momento do uso estavam na temperatura ambiente, entre 20 a 30°C.

4.4 Aves utilizadas

Foram utilizadas 400 pintinhas brancas, com um dia de idade, da linhagem W-36, provenientes do incubatório comercial de aves para postura da Hy-Line do Brasil. O manejo das aves e o programa nutricional e profilático foram realizados conforme as recomendações para a linhagem utilizada. As pintinhas com um dia de idade foram alojadas no aviário da FCAV, onde receberam aquecimento, ração e água *ad libitum*, também foram pesadas e amostras de mecônio presentes no fundo das caixas de transporte foram analisadas para pesquisa de *Salmonella* sp (Zancan et al.,2000).

4.5 Delineamento experimental

Inicialmente, no aviário da FCAV, as quatrocentas pintinhas com um dia de idade foram alojadas no galpão de cria em 20 gaiolas suspensas contendo 20 aves cada e permaneceram até a oitava semana de idade. Na oitava semana, todas as aves foram divididas em quatro grupos contendo 100 aves cada, sendo que aves de três tratamentos (V1, V2 e V3) foram vacinadas com a primeira dose das bacterinas oleosas comerciais doadas por diferentes laboratórios, e o grupo de aves restantes, não vacinadas, constituiu-se no grupo controle (C). Posteriormente, as aves foram transferidas para o galpão de recria.

No galpão de recria, as aves foram divididas em 80 gaiolas contendo 5 aves cada e na décima sexta semana de vida, as aves receberam a segunda dose das três bacterinas comerciais testadas, logo em seguida, as aves foram transferidas para o galpão de postura, onde permaneceram em gaiolas contendo 8 aves cada, sendo 2 aves por repartição.

Na vigésima semana de vida, treze aves de cada tratamento foram retiradas do galpão de postura e transferidas para gaiolas individuais de produção em ambiente controlado, onde foram desafiadas com 2 mL de cultura de *Salmonella* Enteritidis, preparada conforme o item 4.2 e inoculada via intraesofágica com ajuda de uma cânula esofágica. Outros dois desafios foram realizados na vigésima quinta e trigésima primeira semana de vida das aves.

No segundo dia pós-inoculação e duas vezes por semana, foram feitos suabes de cloaca para pesquisa de *Salmonella*.

No segundo dia após o desafio, foram sacrificadas três aves de cada tratamento para estimativa da presença de *Salmonella* Enteritidis no fígado, baço e conteúdo cecal. O ovário também foi colhido para análise microbiológica, assim como todos os ovos produzidos.

Em cada desafio, após a detecção de quatro suabes de cloaca consecutivos, com resultados negativos da presença de *Salmonella* Enteritidis (SE), as 10 aves remanescentes de cada tratamento foram sacrificadas para pesquisa de *Salmonella* em fígado, conteúdo cecal e ovário.

4.6 Exames laboratoriais

4.6.1 Avaliação da presença de SE nas aves

No segundo dia após cada desafio, três aves de cada grupo foram sacrificadas para colheitas de amostras de fígado, baço e conteúdo cecal para estimativa do número de SE Nal/Spec. As amostras foram pesadas, e as de fígado e baço foram maceradas em graal com pistilo, antes do procedimento de diluição decimal. Em seguida, adicionou-se solução salina tamponada (PBS) pH 7,4 na razão de 1:10 e foram feitas diluições decimais em PBS pH 7,4. De cada diluição, 0,1 mL foi dispensado em ágar VB/Nal/Spec para contagem do número de colônias (UFC/g), e transformado em \log_{10} . Na ausência de crescimento da bactéria, foi adicionado caldo SN em dupla concentração aos frascos, sendo, posteriormente, incubados a 37°C/24h e plaqueados em ágar VB/Nal/Spec, também incubados a 37°C/24h.

O ovário também foi colhido e colocado em jarra contendo caldo SN, e incubado a 37° C/ 24 h. Posteriormente, a cultura do caldo SN foi cultivada em ágar VB Nal/Spec.

As amostras do conteúdo cecal e do fígado das dez aves restantes de cada desafio foram colhidas com suabes, os quais foram colocados em tubos contendo caldo SN, seguindo-se a rotina de exame prescrita anteriormente. Da mesma forma, o ovário também foi processado conforme descrição prévia.

4.6.2 Avaliação da excreção fecal

A avaliação da excreção fecal foi feita utilizando-se suabes de algodão estéreis que foram introduzidos na cloaca das aves. Levados ao laboratório, os suabes foram imersos em caldo selenito/novobiocina (SN) (OXOID CM 395), agitados e imediatamente semeados em ágar verde brilhante (OXOID CM 263), contendo ácido nalidíxico e espectomicina (VB Nal/Spec). O suabe dentro do tubo contendo caldo SN e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Na ausência de crescimento em placas, o suabe correspondente foi novamente semeado em ágar VB/Nal/Spec e incubado a 37°C por 24 horas.

4.6.3 Análise dos ovos

Os ovos foram colhidos diariamente, depois de cada desafio e durante dezesseis dias após a inoculação da SENal/Spec. Foram examinados individualmente em recipientes de plástico, quebrados e agitados para promover a homogeneização de seus componentes. Logo após, os frascos foram incubados a 37°C/24h. Após a incubação, a mistura foi semeada, com auxílio de suabe de algodão estéril, em ágar VB/Nal/Spec e incubada a 37°C/24h.

4.7 Análise estatística

Os resultados relacionados à contagem de células viáveis de SENal/Spec (\log_{10}) do fígado, baço, conteúdo cecal e ovário foram submetidos ao teste F e as médias de cada tratamento comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade. Os dados referentes à excreção fecal foram analisados pelo teste não paramétrico do qui-quadrado.

5. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a média do número (Log_{10}) de células viáveis de SE Nal/Spec^r isoladas dos seguintes órgãos: baço, fígado e ceco de aves sacrificadas dois dias após desafio intra-esofágico da bactéria. Observa-se que, em todos os tratamentos e em todos os desafios, o número de colônias de SE isoladas do baço e fígado das aves não foram estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre si. Todavia, com relação as amostras cecais, no terceiro desafio, as aves que receberam a vacina V1 apresentaram uma menor contagem significativa ($p < 0,05$) da bactéria em comparação com os outros tratamentos. Da mesma forma, o tratamento V3 apresentou menor número de células viáveis de SENal/Spec no primeiro desafio em relação ao terceiro desafio.

Tabela 1: Média do número (Log_{10}) de células viáveis de SE Nal/Spec^r em baço, fígado, ceco e ovário de aves sacrificadas dois dias após o desafio.

Órgãos	Desafio	Tratamentos			
		V1	V2	V3	C
Baço	1	2,33 Aa	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa
	2	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa
	3	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	2,67 Aa
Fígado	1	2,33 Aa	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	2,30 Aa
	2	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa
	3	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	< 2,00 Aa	2,33 Aa
Ceco	1	3,36 Aa	2,33 Aa	< 2,00 Ab	3,19 Aa
	2	2,53 Aa	2,59 Aa	3,07 Aab	3,67 Aa
	3	2,67 Ba	3,57 ABa	3,43 ABa	4,50 Aa

A - B, a - b: Médias seguidas de letras distintas (linhas e colunas, respectivamente) diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

A Tabela 2 representa a pesquisa de SE NaI/Spec^f em fígado, conteúdo cecal e ovário de aves tratadas (V1, V2 e V3) e não tratadas (C), sacrificadas após 4 suabes de cloaca consecutivos negativos para isolamento de SE. Observa-se que, apesar de serem encontrados duas e três amostras cecais positivas, no segundo e terceiro desafios respectivamente e, uma amostra de fígado positiva no terceiro desafio, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e em nenhum dos desafios pelo teste do Qui-quadrado.

Tabela 2: Pesquisa de SE NaI/Spec^f em fígado, conteúdo cecal e ovário das aves sacrificadas após 4 suabes de cloaca consecutivos com resultados negativos para SENaI/Spec.

Desafio	Aves	V1			V2			V3			C		
		F	C	O	F	C	O	F	C	O	F	C	O
1º	1 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2º	Aves ^c												
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
T 2		-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
3º	Aves ^d												
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
T 3		-	-	-	1	2	-	-	-	-	1	-	-

F = Fígado; C = Conteúdo cecal; O = Ovário; T 1 = Total de positivos do 1º desafio; T 2 = Total de positivos do 2º desafio; T 3 = Total de positivos do 3º desafio; ^a = aves sacrificadas com 24 dias pós-infecção submetidas a jejum alimentar de 24 horas; ^b = aves sacrificadas com 22 dias pós-infecção; ^c = aves sacrificadas com 17 dias pós-infecção; ^d = aves sacrificadas com 15 dias pós-infecção; não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e os desafios pelo Chi-Square Test

A Tabela 3 representa a análise da excreção fecal de SENal/Spec nos diferentes tratamentos após desafio experimental com SE. Verifica-se que, no primeiro desafio, as aves tratadas com a vacina V3 não apresentaram eliminação de SENal/Spec pelas fezes, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do grupo controle, ao contrário das aves dos demais tratamentos. Em relação ao segundo e terceiro desafios, nenhum dos tratamentos diferiram estatisticamente do grupo de aves que não receberam vacina (C).

Tabela 3: Inspeção da cloaca de aves comerciais mediante utilização de suabe para detecção de SE Nal/Spec^f.

Dpi	1º Desafio									2º Desafio									3º Desafio																				
	V			V			V			C			V			V			V			C																	
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3															
	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T															
2	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	2	3	0	0	0	0	2	2	0	1	1	0	2	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0			
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Tota l	1 ^{ab}			4 ^a			0 ^b			5 ^a			0 ^a			2 ^a			1 ^a			2 ^a			0 ^a			3 ^a			0 ^a			0 ^a					
Obs¹	50			50			50			50			50			50			50			50			50			50			50			50					
%²	2			8			0			10			0			4			2			4			0			6			0			0					

D: Resultado positivo no plaqueamento direto em ágar VB Nal/Spec; **E:** Resultado positivo após enriquecimento em caldo selenito-novabiocina/42°C/24h; **T:** Total, soma dos resultados D+E; **Dpi:** dias pós infecção; Número de aves por tratamento = 10; ^{ab}= letras diferente na mesma linha diferem entre si (p< 0,05) pelo Chi-Square Test. ¹ = número total de observações (suabes de cloaca); ² = percentagem de suabes de cloaca contaminados.

A Tabela 4 contém os resultados referentes à análise de ovos positivos para *Salmonella* Enteritidis (SE) provenientes de aves vacinadas (V1, V2 e V3) e de aves do grupo controle (C). Pelos dados contidos na tabela 4 observa-se que, no primeiro desafio, as aves que receberam a vacina V3 apresentaram um percentual significativamente menor (1,59%, $p < 0,05$) que as aves do grupo controle (6,56%, $p < 0,05$). No segundo desafio, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Por outro lado, no terceiro desafio, todos os grupos tratados apresentaram porcentagem significativamente menor ($p < 0,05$) do que o grupo controle.

Tabela 4: Análise dos ovos provenientes de poedeiras vacinadas com três diferentes produtos comerciais e, submetidas a três desafios com SE NaI/Spec^f.

Dpi	1° Desafio				2° Desafio				3° Desafio			
	V1	V2	V3	C	V1	V2	V3	C	V1	V2	V3	C
1º	1	5	1	5	3	3	0	3	2	1	1	4
2º	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3º	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	0	1
4º	0	1	0	0	2	1	3	3	0	0	0	1
5º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6º	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8º	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
10º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16º	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Pos. 1	3 ^{ab}	7 ^{ab}	2 ^b	8 ^a	5 ^a	5 ^a	4 ^a	8 ^a	2 ^b	2 ^b	1 ^b	8 ^a
Obs. 2	123	136	126	122	125	126	121	124	145	149	145	133
%³	2,44	5,15	1,59	6,56	4,00	3,97	3,31	6,45	1,38	1,34	0,69	6,02

¹ = Número de amostras positivas; ² = número total de observações; ³ = porcentagem de ovos contaminados; ^{ab} = letras diferente na mesma linha diferem entre si (p < 0,05) pelo Chi-Square Test.

6. DISCUSSÃO

Várias medidas de controle de SE em aves são utilizadas nos plantéis avícolas; dentre elas, a vacinação com bacterinas tem sido uma importante medida para a prevenção de infecções causadas por salmonelas em aves (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2005). A vacina ideal e eficaz contra infecção por SE deveria impedir a colonização intestinal da bactéria, a disseminação para órgãos internos, a eliminação de SE através das fezes e ovos, bem como induzir uma resposta imune mediada por células e por anticorpos (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2005).

Como no Brasil, a utilização de bacterinas contra SE em aves matrizes foi liberada em novembro de 2003 pela Instrução Normativa 78 do Programa Nacional de Sanidade Avícola do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a estratégia de aplicação destas vacinas requer um conhecimento detalhado e profundo sobre a eficácia deste método de controle.

Após a infecção oral em poedeiras, a SE coloniza o trato intestinal, invade órgãos internos, e pode se depositar nos ovos (GAST & BEARD, 1990; GAST *et al.*, 2004), podendo assim se disseminar verticalmente via ovo, desencadeando o nascimento de pintos infectados ou espalhar horizontalmente pela criação, infectando outras aves e, através dos ovos, os seres humanos.

Desta forma, investigações a respeito da eficácia de vacinas na proteção de galinhas contra *Salmonella* Enteritidis, podem se basear em análises sorológicas como pesquisa de anticorpos no soro de aves vacinadas e infectadas

experimentalmente (MIYAMOTO et al., 1999, BABU et al., 2004). Como também bacteriológica, através da análise qualitativa e/ou quantitativa, ou seja, através da pesquisa ou contagem da bactéria em órgãos como fígado, baço, ceco e ovário, além de fezes e ovos, utilizando-se caldos e meios de cultura em placa seletivos para isolamento de *Salmonella* (TIMMS et al., 1990; GAST et al., 1992, 1993; NAKAMURA et al., 1994; MIYAMOTO et al., 1999; WOODWARD et al., 2002; BABU et al., 2004).

Seguindo esses conceitos, os resultados dos exames realizados no presente trabalho compararam a eficiência de três bacterinas comerciais contra *Salmonella* Enteritidis, frente a três desafios experimentais por SE em poedeiras comerciais.

O ceco é o principal local de multiplicação de SE no organismo da ave, enquanto que o baço e o fígado constituem-se nos principais órgãos não-intestinais, onde a bactéria pode ser encontrada (GORHAM et al., 1991). NAKAMURA et al. (1994) imunizaram poedeiras com bacterina contra SE e verificaram que, uma semana após o desafio, isolaram menor número de SE de fígado e baço das aves vacinadas em comparação ao grupo controle. GAST et al. (1992) evidenciaram que, após desafio com SE, poedeiras vacinadas com bacterina oleosa inativada contra SE apresentaram menor isolamento da bactéria em baço, ovário e oviduto, no sétimo e vigésimo oitavo dia após a inoculação.

Embora tenha se encontrado resultados favoráveis aos efeitos da vacina na redução de SE no ceco de aves do grupo **V1** no segundo dia após o terceiro desafio, não se pode constatar proteção contra a invasão dos órgãos em nenhum

dos grupos vacinais, pois na pesquisa de SENal/Spec no final dos desafios, algumas aves vacinadas apresentaram isolamento positivo da bactéria em fígado e ceco. Resultados semelhantes foram obtidos por DAVISON *et al.*, 1999, os quais verificaram que lotes de aves vacinadas apresentaram cultura de órgãos positiva para SE e com resultados estatísticos similares ao lote de aves não vacinadas.. No presente estudo, não foi encontrado o isolamento de níveis máximos de contaminação de SE em fígado e baço, como verificados 3 dias após a infecção em pesquisa realizada por VAN IMMERSEL *et al.*, (2002). MIYAMOTO *et al.*, 1999, também concluiu que o uso de bacterinas poderia reduzir apenas parcialmente a disseminação de SE para órgãos internos e colonização da cloaca. Portanto, as bacterinas utilizadas neste trabalho não impediram a infecção sistêmica da bactéria inoculada.

No presente trabalho verificou-se que somente as aves do tratamento **V3**, no primeiro desafio, não eliminaram SE pelas fezes (Tabela 3), diferindo estatisticamente do grupo de aves controle ($p < 0,05\%$), mas não do **V1**. BARBOUR *et al.* (1993) também encontraram resultados semelhantes ao comparar o uso de seis diferentes bacterinas em aves de postura desafiadas com SE. Sendo que o número de suabes fecais positivos para SE, em dois grupos vacinais diferiu, e em outros quatro não do grupo controle no sétimo dia após o desafio. Segundo os mesmos autores, essa diferença parece estar relacionada à natureza do adjuvante, à cepa da bactéria e ao método de inativação da SE empregado na produção da vacina. WOODWARD *et al.* (2002) trabalharam com aves vacinadas com uma bacterina comercial, desafiadas via endovenosa com

cepa de SE verificando, nestas aves, o isolamento de SE em 9,2 % dos suabes cloacais, em relação a 37,2% de aves do grupo controle; ao contrário de GAST *et al.* (1992), que não obtiveram diferenças na eliminação de SE em aves vacinadas e não vacinadas com bacterinas e desafiadas oralmente com SE. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho no segundo e terceiro desafios. Outro trabalho de GAST *et al.* (1993), verificou um maior isolamento de SE de amostras fecais ocorrido em todos os tratamentos, na primeira semana após o desafio oral de SE, o que está de acordo com o presente trabalho, no qual a bactéria também foi isolada nos primeiros sete dias após os desafios. Percebe-se que os resultados da excreção fecal de SE encontrados nos trabalhos com bacterinas contra SE, são variados; fatores como idade das aves na vacinação e no desafio, vias de inoculação e de imunização interferem nas taxas de excreção da *Salmonella* Enteritidis (GAST *et al.*, 1990; GAST *et al.*,1992; HUMPHREY, *et al.*, 1991; MIYAMOTO *et al.*, 1999; TIMMS *et al.*,1990; WOODWARD *et al.*,2002), bem como, fatores estressantes aplicados às aves, como retirada de água, ração, exposição à altas temperaturas externas (NAKAMURA *et al.*, 1994) e período de muda das aves (HOLT *et al.*, 2003).

No presente estudo não foi possível a obtenção de informações referentes aos componentes utilizados na produção das vacinas. Mas sabe-se que a inclusão de adjuvantes e imunomoduladores nas fórmulas vacinais pode aumentar a quantidade e qualidade da resposta imune (MUIR *et al.*, 2000). Todavia, pode se deduzir ainda que, fatores relacionados com a produção das vacinas estiveram implicados nas diferenças de excreção de SE encontradas

entre os grupos vacinais. É importante salientar que, a diminuição da eliminação de SE pelas fezes pode controlar o nível de contaminação ambiental e a transmissão horizontal da bactéria dentro e entre os lotes pode ser marcadamente reduzida, como também a contaminação dos ovos (GAST *et al.*, 1993).

Os resultados da pesquisa de SE em ovos (Tabela 4) demonstraram um efeito positivo da vacina administrada ao grupo **V3** no primeiro desafio e em todos os grupos vacinais no terceiro desafio. Concordando com GAST *et al.*(1992), que avaliando a proteção de uma bacterina em aves de postura vacinadas e desafiadas em diferentes idades, obteve uma menor porcentagem de ovos positivos para SE nas aves que receberam a primeira dose da vacina na vigésima terceira semana de vida em comparação com o grupo não vacinado, aliado a isso, os ovos positivos para SE foram detectados nas aves não vacinadas, nos primeiros dez dias após desafio experimental da bactéria, semelhantemente aos resultados encontrados no presente estudo.

Embora não se tenha conseguido eliminar completamente a SE das aves vacinadas com as bacterinas, pôde-se considerar que as mesmas, principalmente a administrada ao grupo **V3**, diminuiu a contaminação dos ovos ao longo da avaliação. O que é relevante, pois o consumo de ovos contaminados tem sido considerado como a principal causa de toxinfecções alimentares em seres humanos (HUMPHREY, 2006).

Os resultados da excreção fecal e eliminação de SE em ovos no presente estudo mostraram-se semelhantes no primeiro e segundo desafios. GAST e BEARD (1990) também observaram uma correlação entre fezes positivas de

galinhas infectadas artificialmente com SE e a contaminação da casca dos ovos. Dados similares foram encontrados por BARROW e LOVELL (1991), os quais, trabalhando com aves adultas infectadas oralmente com SE, detectaram 0,31% e 5,86% de ovos positivos para SE, sendo que nos primeiros, somente o conteúdo foi analisado e nos restantes, além do conteúdo, a casca também foi analisada, sugerindo que estes, provavelmente tornaram-se contaminados durante a passagem através da cloaca, e não de infecção resultante do ovário. Como a metodologia empregada para analisar os ovos no presente trabalho avaliou a casca juntamente com os componentes internos, parte da SE isolada dos ovos pode ser oriunda da casca. Portanto a diminuição da excreção fecal de *Salmonella* Enteritidis e a correta desinfecção da casca dos ovos, reduz as toxinfecções alimentares.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, percebe-se que a vacinação de poedeiras comerciais com as bacterinas testadas, não foi capaz de promover uma proteção total das aves frente aos desafios por *Salmonella* Enteritidis. Assim, recomenda-se que o uso das bacterinas em poedeiras ou em matrizes comerciais seja complementado com outras formas de controle, como a desinfecção, o monitoramento bacteriológico, o uso de produtos de exclusão competitiva e de ácidos orgânicos; medidas empregadas com bons resultados na redução da *Salmonella* Enteritidis nas aves e no ambiente das granjas. Ainda, é necessário uma profunda análise da relação custo- benefício quando se opta pelo uso das bacterinas, fatores relacionados ao manejo empregado durante a vacinação, custo da vacina e aos índices zootécnicos das aves, também devem ser avaliados.

7. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais adotadas no presente trabalho, pode-se concluir que:

1. Não se pode constatar proteção total contra a invasão dos órgãos pela bactéria em nenhum dos grupos vacinais
2. As vacinas não protegeram contra eliminação de fezes positivas para SE.
3. Em dois dos desafios, os resultados da excreção fecal e eliminação de SE em ovos mostraram-se estatisticamente semelhantes, demonstrando que os ovos foram contaminados pelas fezes cloacais e não de infecção resultante do ovário.
4. Com base nos parâmetros analisados, o uso das bacterinas é eficaz quando complementado com outras formas de controle para SE.

8. REFERÊNCIAS

ALAM, M. S.; AKAIKE, T.; OKAMOTO, S.; KUBOTA, T.; YOSHITAKE, J.; SAWA, T.; MIYAMOTO, Y.; TAMURA, F.; MAEDA, H. Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 6, p. 3130-3142, 2002.

AMENT, A. J. H. A.; JANSEN, J.; VAN DER GIESSEN, A.; NOTERMANS, S. Cost-benefit analysis of a screening strategy for *Salmonella* Enteritidis in poultry. **Veterinary Record**, London, v. 15, n. 1, p. 33-37, 1993.

ARNOLD, J. W.; HOLT, P. S. Response to *Salmonella enteritidis* infection by the immunocompromised avian host. **Poultry Science**, Champaign, v. 74, n. 4, p. 656-665, 1995.

ARROYAVE, W.H. Infecção de aves por *Salmonella enterica* sorovar *Gallinarum*. Estudos clínico anatomopatológico e hematológico. In: Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Jaboticabal, 2005.

BARBOUR, E. K.; FREDERICHS, W. M.; NABBUT, N. H.; POSS, P. E. Evaluation of bacterin containing three predominant phage types of *Salmonella* Enteritidis for prevention of infection in egg-laying chickens. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, n. 8, p. 1306-1309, 1993.

BARROW, P. A. Immunity to *Salmonella* and other bacteria. In: DAVISON, T. F.; MORRIS, T. R.; PAYNE, L. N. **Poultry immunology**. Berkshire: Carfax Publishing Company, 1995. p. 243-263. (Poultry Science Symposium Series,24).

BARROW, P. A. Salmonella infections in poultry – problems and new thoughts on the possibilities of control. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, v. 1, p. 9-16, 1999.

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**. Oxford: CAB International, 2000, p.323-339, 2000.

BARROW, P. A.; HASSAN, J. O.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Reduction in faecal excretion of *Salmonella typhimurium* strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S. typhimurium* organisms. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 104, n. 3, p. 413-426, 1990.

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

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses Aviárias, In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**, Campinas: FACTA, 2000. Cap. 4.1, p. 185-195.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; BARROW, P. A. Reduction in incidence of experimental fowl typhoid by incorporation of a commercial formic acid preparation into poultry feed. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, n. 3, p. 339-341, 1996.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; BARROW, P. A. O desenvolvimento da microbiota intestinal em pintos de corte: prós e contras. In: CONFERENCIA APINCO DE

CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas, **Anais...Campinas**, FACTA, 1998, p. 183-190.

BLAXLAND, J. D.; CULLEN, G. A.; GORDON, R. F.; JORDAN, F. T. W. Diseases caused by bacteria, micoplasmas and chlamydia. In: R. F.; F. T. W. (Ed.). **Poultry Diseases**. 2 ed. London: Bailliere – Tindall, 1982. cap. 2, p. 9-75.

BOYCE, T. G.; KOO, D.; SWERDLOW, D. L.; GOMEZ, T. M.; SERRANO, B.; NICKEY, L. N.; HICKMAN-BRENNER, F. W.; MALCOLM, G. B.; GRIFFIN, P. M. Recurrent outbreaks of *Salmonella* Enteritidis Infections in a Texas restaurant: phage type 4 arrives in the United States. **Epidemiology Infection**, Cambridge, v. 117, p. 29-34, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa nacional de sanidade avícola. Instrução Normativa 78, **Diário Oficial da União**, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília- DF, 5 de novembro de 2003.

BROWNELL, J. R., SADLER, W. W., FANELLI, M. J. Role of bursa of Fabricius in chicken resistance to *Salmonella typhimurium*. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.14, n. 1, p.142-152, 1970.

BUMSTEAD, N. Mecanismos genéticos de resistência a doenças. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas, **Anais...**, Campinas, FACTA, 2000, p. 25-30.

DAVISON, S.; BENSON, C. E.; HENZLER, D. J.; ECKOROAD, R. J. Field observations with *salmonella enteritidis bacterins*. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 43, n. 4, p. 664-669, 1999.

DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 233-245, 2004.

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

DICKEL, E. L. **Utilização da microbiologia convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate**, 2004, f. 133. (Tese de Doutorado) em Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DUNLAP, N. E.; BENJAMIN, W. H.; MCCALL, R. D.; TILDEN, A. B.; BRILES, D. E. A safe- site for *Salmonella* Typhimurium is within splenic cells during the early phase of infection in mice. **Microbiology Pathology**, Chandigarh, v. 10, p. 297-310, 1991.

EISENSTEIN, T. K.; KILLAR, L. M.; STOCKER, B. A.; SULTZER, B. M. Cellular immunity induced by avirulent *Salmonella* in LPS-defective C3H/HeJ mice. **Journal Immunology**, Baltimore, v. 133, p. 958-961, 1984.

FERREIRA, A. J. P.; ITO, N. M. K.; BENEZ, S. M. Infecção natural e experimental por *Salmonella* Enteritidis em pintos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1990, Campinas, Anais..., Campinas, FACTA, 1990, p. 171.

FIERER, J. Polymorphonuclear leukocytes and innate immunity to *Salmonella* infections in mice. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, p. 1233-1237, 2001.

GAMA, N. M. S. Q. **Salmonella spp em aves de postura comercial**. 2001. 60 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

GAMA, N. M. S. Q.; BERCHIERI JUNIOR, A. ; FERNANDES, S. A. Occurrence of *Salmonella* sp in laying hens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 15-21, 2003.

GAST, R. K.; BEARD, C. W. Production of *Salmonella* Enteritidis contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 34, p. 438-446, 1990.

GAST, R.K. Understanding *Salmonella* Enteritidis in Laying chickens: the contributions of experimental infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 1-2, p. 107-116, 1994.

GAST, R. K.; PORTER JÚNIOR, R. E.; HOLT, P. S. Applying tests specific yolk antibodies to predict contamination by *Salmonella* Enteritidis in eggs from experimentally infected laying hens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 41, n. 1, p. 195-202, 1997.

GAST, R. K.; STONE, H. D.; HOLT P. S. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella* Enteritidis by laying hens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 37, n. 4, p. 1085-91, 1993.

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

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

HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J.; KOGUT, M. H. **Immunoprophylaxis of chicks against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals**. Ames Iowa State University Press, 1999, p. 413-418.

HASSAN, J. O.; CURTISS III, R. Virulent *salmonella typhimurium*-induced lymphocyte depletion and immunosuppression in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 5, p. 2027-2036, 1994.

HASSAN, J. O.; CURTISS III, R. Efficacy of a live avirulent *Salmonella typhimurium* vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 41, n. 4, p. 783-791, 1997.

HENZLER, D. J.; OPITZ, H. M. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farms. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 36, n. 3, p. 625-631, 1992.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's: manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wikins, 1994, p. 186-187.

HOLT, P.S.; GAST, R.K.; KELLY-AEHLE, S. Use of a live attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccine to protect hens against *Salmonella* Enteritidis infection while undergoing molt. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 47, n. 3, p. 656-661, 2003.

HORMAECHE, C.; VILLAREAL, B.; MASTROENI, P.; DOUGAN, G.; CHADFIELD, S.N. Immunity mechanisms in experimental salmonellosis. In: CABELLO, F.; HORMAECHE, C.; MASTROENI, P.; BORINA, L. **The biology of *Salmonella***, Elmsford, 1993. p. 223-235 (Serie A Life Sciences, 2445).

HUMPHREY, T. J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 1-2, p. 31-40, 1994.

HUMPHREY, T. J.; CHART, H.; BASKERVILLE, A.; ROWE, B. The influence of age on the response of SPF hens to infections with *Salmonella* Enteritidis PT4. **Epidemiology Infection**, Cambridge, v. 106, n. 1, p. 33-43, 1991.

IBA, A. M.; BERCHIERI JR, A. Studies on the use of a formic acid-propionic acid mixture (Bio-addTM) to control experimental *Salmonella* infection in broiler chickens. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 24, n. 2, p. 303-311, 1995.

JANEWAY JÚNIOR, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. Mecanismos de reconhecimento e efetores da imunidade adaptativa. In: _____, *Imunobiologia, o sistema immune na saúde e na doença*, 5.ed, cap. 1, Porto Alegre: Artmed, 2002, p. 49.

KASPERS B.; LILLEHOJ H. S.; JENKINS M. C.; PHARR G. T. Chicken interferon mediated induction of major histocompatibility complex class II antigens on

peripheral blood monocytes. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v. 44, n.1, p. 71-84, 1994.

KLIMPEL , G. R.; ASUNCION, M.; HAITHCOAT, J.; NIESEL, D. W. Cholera toxin and *Salmonella typhimurium* induce different cytokine profiles in the gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n. 2, p. 1134-1137, 1995.

KOGUT, M. H. Dynamics of a protective avian inflammatory response: the role of an IL-8 like cytokine in the recruitment of heterophils to the site of organ invasion by *Salmonella* Enteritidis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 159-172, 2002.

LEE, J. C.; GIBSON, C. W.; EISENSTEIN, T. K. Macrophage-mediated mitogenic suppression induced in mice of the C3H lineage by a vaccine strain of *Salmonella typhimurium*. **Cellular Immunology**, San Diego, v. 91, n. 1, p. 75-91, 1985.

LIU, W.; YANG, Y.; CHUNG, N.; KWANG, J. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella enteritidis* after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 45, n. 4, p. 797-806, 2001.

McILROY, S. G.; McCracken, R. M.; NEILL, S. D.; O'BRIEN, J. J. Control, prevention and eradication of *Salmonella* Enteritidis infection in broiler and broiler breeder flocks. **Veterinary Record**, London, v. 125, n. 22, p. 545-548, 1989.

MIYAMOTO, T.; BABA, E.; TANAKA, T.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 41, n. 2, p. 296-303, 1997.

MIYAMOTO, T.; KITAOKA, D.; WITHANAGE, G. S.; FUKATA, T.; SASAI, K.; BABA, E. Evaluation of the efficacy of *Salmonella* Enteritidis oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 43, n. 3, p. 497-505, 1999.

NAGARAJA, K. V.; RAJASHEKARA, G. Vaccination against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection: dilemma and realities. In: SAEED A. M, (Ed.) *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals. Ames Iowa State University Press, 1999, p. 397-404.

NAKAMURA, M.; NAGAMINE, N.; TAKASHI, T.; SUZUKI, S.; SATO, S. Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 38, n.4, p. 717- 724, 1994.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, p. 210-211, 1973.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 45, n. 1, p. 61-69, 2001.

OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H. J.; RAYBOURNE, R. B.; BABU, U. S.; HECKERT, R. A. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella* enteritidis vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN-gamma. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious diseases**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 255-272, 2004.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, 2000.

OPITZ, H. M.; SINGER, J. T.; HENZLER, D. J. Epidemiologia de salmonellas em ponedoras. **Industria Avícola**, Mount Morris, v. 49, p. 16-18, 1992.

PRITCHARD D. G.; NIVAS S. C.; YORK M. D.; POMEROY B. S. Effect of gale mutant *Salmonella* Typhimurium on experimental salmonellosis in chickens. **Avian Diseases.**, Kennet Square, v. 22, p. 562-575, 1978.

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

ROBERTS, J. A.; SOCKETT, P. N. The socio-economic impact of human *Salmonella* Enteritidis infection. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, p. 117-29, 1994.

RODRIGUE D. C.; TAUXE R. V.; ROWE B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? **Epidemiology and infection**, Cambridge, v. 105, p.21-27, 1990.

RODRIGUES, D, P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Campinas, Anais..., Campinas, FACTA, 2005, p. 223-228.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Imunidade às bactérias, In:_____ **Imunologia**, 6. ed. Local: Editora Manole, 2003, 481 p.

SHARR, H. Controle de Salmonela na União Européia. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, Campinas, Anais..., Campinas, FACTA, 2003, p. 357-368.

SHEELA, R. R.; BABU, U.; MU, J.; ELANKUMARAN, S.; BAUTISTA, D. A.; RAYBOURNE, R. B.; HECKERT, R. A.; SONG, W. Immune responses against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in virally immunosuppressed chickens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, p. 670-679, 2003.

SHROFF, K. E.; MESLIN, K.; CEBRA, J. J. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n. 10, p. 3904-3913, 1995.

SILVA, E.N. Medidas gerais de controle de salmonelas em frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Campinas, Anais..., Campinas, FACTA, 2005, p. 229-237.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, p. 85-100, 2002.

SIMÕES, M.; MARQUES, E. G. L.; ROCHA, M. M. M.; PRANDI, M. A. G.; PISANI, B. Surtos alimentares por *Salmonella* Enteritidis ocorridos na região de Campinas no período de março de 1995 a março de 2001. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2001, Foz do Iguaçu, p.143.

SONCINI, R. A.; BACK, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: erradicação ou controle por vacinação? In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas, Anais..., Campinas, FACTA, 2001, p. 21-30.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINI, K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo , v. 38, n. 2, p. 119-127, 1996.

TIMMS, L. M.; MARSHAL, R. N.; BRESLIN, M. F. Laboratory assessment of protection given by an experimental *Salmonella Enteritidis* PT4 inactivated, adjuvant vaccine. **The Veterinary Record**, London, v. 127, n. 25-26, p. 611-614, 1990.

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

VAN IMMERSEEL F, DE BUCK J, DE SMET I, HAESEBROUCK F, DUCATELLE R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella Enteritidis* strain. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p.355-364, 2002.

VAN IMMERSEEL, F.; BUCK, J.; PASMANS, F.; BOHEZ, L.; BOYEN, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chicken early post hatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 11, p. 1911-1916, 2004.

VAN IMMERSEL, 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. **Epidemiology Infection**, Cambridge, v. 133, n. 6, p. 959-978, 2005.

WOODWARD, M. J.; GETTINGBY, G.; BRESLIN, M. F.; CORKISH, J. D.; HOUGHTON, S. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 31, n. 4, p. 383-392, 2002.

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

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

