

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

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE AVES DE POSTURA (*Gallus
gallus domesticus*) POR CEPAS DE *Salmonella enterica*
SOROVAR GALLINARUM (SG), SGNal^r, SG Δ cobS e
SG Δ cobS Δ cbiA: ANATOMOPATOLOGIA, HEMOGRAMA E
PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO**

Kleber Ormande Garcia

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

- Fevereiro de 2010 -

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

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE AVES DE POSTURA (*Gallus
gallus domesticus*) POR CEPAS DE *Salmonella enterica*
SOROVAR GALLINARUM (SG), SGNal^r, SG Δ cobS e
SG Δ cobS Δ cbiA: ANATOMOPATOLOGIA, HEMOGRAMA E
PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO**

Kleber Ormande Garcia

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Berchieri Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. José Jurandir Fagliari

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 de 2010 -

G216i Garcia, Kleber Ormande
Infecção experimental de aves de postura (*Gallus gallus domesticus*) por cepas de *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum (SG), SGNal^r SGΔcobS e SGΔcobSΔcbiA: Anatomopatologia, hemograma e perfil bioquímico sérico / Kleber Ormande Garcia. -- Jaboticabal, 2010
viii, 77 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2001
Orientador: Ângelo Berchieri Júnior
Co-orientador: José Jurandir Fagliari
Banca examinadora: José Jurandir Fagliari, Antonio Carlos Alessi, Raimundo Souza Lopes
Bibliografia

1. *Salmonella*-mutante. 2. Proteínas de fase aguda. 3. Tifo aviário. 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

KLEBER ORMANDE GARCIA – Nascido em 16 de outubro de 1977, natural de Santo André, Estado de São Paulo, formou-se em Medicina Veterinária em fevereiro do ano de 2008, pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP/Jaboticabal. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da FAPESP de agosto de 2006 a julho de 2007, tendo desenvolvido o trabalho “Hemograma, perfil bioquímico e proteinograma sérico, inclusive proteínas de fase aguda, de aves de postura experimentalmente infectadas por *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum”. Realizou estágio curricular na Perdigão Agroindustrial na cidade de Jataí-GO, no período de agosto de 2007 a fevereiro de 2008, atuando na área de sanidade e extensão na integração de frangos de corte da empresa. Ingressou no mestrado em março de 2008, na FCAV/UNESP/Jaboticabal no programa de Medicina Veterinária na área de Patologia Animal, com ênfase em ornitopatologia e salmoneloses aviárias.

Email: klebergarcia7@hotmail.com

“Se você acredita que pode, ou se acredita que não pode,
de qualquer forma você está certo...”

Henry Ford

Dedico

A meus pais Antonio Francisco Garcia e Orotilde Ormande Garcia
e à minha irmã Leila Maria Garcia por serem a base da minha formação e caráter,
pessoas que amo e tenho grande admiração.
Com certeza, esta homenagem é um mínimo diante de tudo que fizeram por mim...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela concretização deste trabalho, por ser meu guia nas tribulações da vida e simplesmente pela oportunidade de viver neste misterioso planeta, onde há tanto para se descobrir e entender...

Aos professores José Jurandir Fagliari e Ângelo Berchieri Júnior pela orientação, paciência, amizade e sugestões, que me fizeram crescer tanto profissional como pessoalmente;

Aos professores José Jurandir Fagliari, Antonio Carlos Alessi, Raimundo Souza Lopes e Karin Werther pelo apoio e sugestões para a melhoria na dissertação;

Aos irmãos e parceiros na pós-graduação Moreno, Dunga, Cauby, Jessé, Naim, Pixe, Mala, Chacal e Gracinha pela convivência nesse período, que através de muitas conversas, com momentos de consenso e discórdia, me fizeram crescer pessoalmente;

À velha República Magnata, minha morada durante a graduação, onde se encontram os parceiros Zé Piqueno e Bocó e onde muitos outros viveram por um tempo, contribuindo para a história dessa querida República;

A todo pessoal dos laboratórios de Clínica e Cirurgia Veterinária e de Ornitopatologia pelo apoio e contribuição na parte experimental do trabalho;

À FAPESP, pelo suporte financeiro, permitindo a concretização desta dissertação;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,

OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
III. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Taxonomia de <i>Salmonella</i>	4
3.2. Importância das salmoneloses em avicultura.....	4
3.3. <i>Salmonella</i> Gallinarum e sua importância em avicultura.....	5
3.3.1. Epidemiologia e Patogenia.....	6
3.3.2. Alterações hematológicas.....	9
3.3.3. Alterações anatomopatológicas.....	11
3.4. Relação entre síntese de Cobalamina e o potencial de virulência das salmonelas.....	12
3.5. Medidas preventivas para o controle das salmoneloses aviárias...	14
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Preparação dos mutantes e de SGNalr.....	16
4.2. Preparação dos inóculos.....	16
4.3. Característica das aves.....	17
4.4. Procedimento experimental.....	17
4.5. Avaliação clínica.....	18
4.6. Análises laboratoriais.....	18
4.7. Colheita de sangue.....	19

4.7.1. Hemograma.....	20
4.7.2. Perfil bioquímico sérico.....	20
4.8. Exame bacteriológico.....	21
4.9. Exame macroscópico.....	21
4.10. Exame histopatológico.....	21
4.11. Análise Estatística.....	22
V. RESULTADOS.....	23
5.1. Avaliação clínica.....	23
5.2. Hemograma.....	26
5.2.1. Eritrograma.....	26
5.2.2. Leucograma.....	28
5.3. Perfil bioquímico sérico.....	31
5.4. Exame bacteriológico.....	38
5.5. Exame macroscópico.....	40
5.7. Exame histopatológico.....	44
VI. DISCUSSÃO.....	47
VII. CONCLUSÕES.....	62
VIII. REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Esquema das coletas de material biológico dos grupos experimentais de aves de postura de uma variedade vermelha expostas à infecção experimental por SGNal ^r ΔcobS (G1), SGNal ^r (G2), SGNal ^r ΔcobSΔcbiA (G3) e grupo controle (G4).....	18
Tabela 2 - Número de mortes naturais de aves vermelhas expostas à infecção experimental por <i>S. Gallinarum</i> ΔcobS, Nal ^r e ΔcobSΔcbiA nos 15 dias após a infecção.....	23
Tabela 3 - Média da contagem de hemácias, do hematócrito, de hemoglobina, de volume corpuscular médio (VCM), de hemoglobina corpuscular média (HCM) e de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de aves de postura experimentalmente infectadas por <i>Salmonella</i> Gallinarum Nal ^r , ΔcobS e ΔcobSΔcbiA.....	27
Tabela 4 - Médias das contagens de leucócitos, linfócitos, heterófilos, monócitos, basófilos e eosinófilos de aves de postura de uma variedade vermelha experimentalmente infectadas por <i>S. Gallinarum</i> Nal ^r , ΔcobS e ΔcobSΔcbiA.....	29
Tabela 5 - Médias dos teores séricos de albumina, magnésio, cálcio, fósforo e ácido úrico de aves de postura de uma variedade vermelha experimentalmente infectadas por <i>S. Gallinarum</i> Nal ^r , ΔcobS e ΔcobSΔcbiA.....	32
Tabela 6 - Médias dos teores séricos de colesterol, triglicerídeos, creatinina, fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) de aves de postura de uma variedade vermelha experimentalmente infectadas por <i>S. Gallinarum</i> Nal ^r , ΔcobS e ΔcobSΔcbiA.....	33
Tabela 7 - Média e desvio-padrão dos teores séricos de proteína total e das frações protéicas obtidas por fracionamento em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de aves de postura experimentalmente infectadas por <i>S. Gallinarum</i> Nal ^r	35
Tabela 8 - Resultados dos exames de suabes obtidos do fígado de aves de postura de uma variedade vermelha expostas à infecção experimental por SGNal ^r ΔcobS, SGNal ^r e SGNal ^r ΔcobSΔcbiA.....	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Aspecto das fezes das aves do G1 no sétimo dia após a infecção mostrando coloração amarelo esverdeada e presença de sangue.....	24
Figura 2 - Aspecto das fezes das aves do G2 no sétimo dia após a infecção com características semelhantes às fezes das aves do G1.....	24
Figura 3 - Aspecto das aves do G1 no quinto dia após a infecção. À esquerda, nota-se ave morta no lado inferior esquerdo e à frente, ave em mau estado, não respondendo a estímulos. À direita, observa-se duas aves apáticas, encorujadas e com penas eriçadas, sintomatologia típica da infecção por <i>Salmonella Gallinarum</i>	25
Figura 4 - Aspecto da aves do G2 no quinto dia após a infecção, onde observa-se no lado inferior direito uma ave morta e à frente, duas aves apresentando sintomatologia semelhante às aves do G1.....	25
Figura 5 - Número médio de leucócitos (LT), heterófilos (HT) e linfócitos (LF) do grupo de aves inoculadas com a cepa SGNal ^r Δ <i>cobS</i> (Grupo 1) e do grupo de aves inoculadas com a cepa SGNal ^r (Grupo 2) 24 horas antes (1 DAI) e após a infecção (1 DPI) e três (3 DPI), cinco (5 DPI), sete (7 DPI) e dez (10 DPI) dias após a infecção.....	30
Figura 6 - Concentração sérica média de haptoglobina, das proteínas de 90.000 e 99.000Da e de transferrina em aves de postura experimentalmente infectadas por SGNal ^r Δ <i>cobS</i> (G1), SGNal ^r (G2), SGNal ^r Δ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> (G3) e das aves do grupo controle (G4) 24 horas antes (1 DAI) e após a infecção (1 DPI) e três (3 DPI), cinco (5 DPI), sete (7 DPI), dez (10 DPI) e quinze (15 DPI) dias após a infecção.....	36
Figura 7 - Concentração sérica média de IgA e IgG de cadeias pesada e leve em aves de postura de uma variedade vermelha experimentalmente infectadas por SGNal ^r Δ <i>cobS</i> (G1), SGNal ^r (G2), SGNal ^r Δ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> (G3) e das aves do grupo controle (G4) 24 horas antes (1 DAI) e após a infecção (1 DPI) e três (3 DPI), cinco (5 DPI), sete (7 DPI), dez (10 DPI) e quinze (15 DPI) dias após a infecção.....	37

- Figura 8 – Aspecto macroscópico de aves no quinto dia após a infecção. À esquerda, uma ave do G3 apresentando fígado normal, sendo comparada com ave do G1, à direita, mostrando fígado com coloração alterada e aumento de tamanho..... 41
- Figura 9 – Aspecto macroscópico de bursa de Fabricius de aves no sétimo dia após a infecção mostrando atrofia do órgão em aves do G1 e G2, quando comparado ao G3 e G4..... 41
- Figura 10 - Aspecto macroscópico das aves no sétimo dia após a infecção evidenciando o fígado. No G1, o órgão apresenta-se com aumento de tamanho, coloração amarelo-esverdeada e pontos necróticos esbranquiçados espalhados por todo parênquima e no G2 está, da mesma forma, aumentado, com pontos necróticos, porém a coloração é marrom ou bronzeada. Nas aves de G3 e G4, o órgão encontra-se sem alterações..... 42
- Figura 11 - Apresentação de baço de aves no sétimo dia após a infecção mostrando esplenomegalia do órgão das aves do G1 e G2, quando comparado ao G3 e G4..... 43
- Figura 12 - Fotomicrografia de corte histológico do fígado de aves no quinto dia após a infecção. Observa-se, em ave do G1, infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica e em ave do G2, necrose multifocal com presença de infiltrado inflamatório (setas). As aves de G3 e G4 não apresentam alterações. (HE, Obj. 40x)..... 45
- Figura 13 - Fotomicrografia de corte histológico do coração de aves no quinto dia após a infecção. Aves de G1 e G2 apresentam infiltrado inflamatório misto, com destaque para G1, onde se observa forte infiltrado inflamatório (setas). As aves de G3 e G4 não apresentam alterações (HE, Obj. 40x)..... 45
- Figura 14 - Fotomicrografia de corte histológico da bursa de Fabricius de aves no sétimo dia após a infecção. Nas aves de G1 e G2 observa-se infiltrado inflamatório (setas). As aves de G3 e G4 não apresentam alterações. (H.E, Obj. 40x)..... 46
- Figura 15 - Fotomicrografia de corte histológico do baço de aves no sétimo dia após a infecção. Nas aves de G1 e G2, observa-se necrose multifocal (setas). As aves de G3 e G4 não apresentam alterações. (H.E, Obj. 40x)..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ado-CBL** – Coenzima B12
- AST** – Aspartato aminotransferase
- CBL** – Cobalamina
- CbiA** – Ácido cobirínico a,c-diamido sintetase
- CHCM** – concentração de hemoglobina corpuscular média
- CN-CBL** – Cianocobalamina
- CobS** – Adenosilcobalamina-5'-P sintase
- DAI** – Dia anterior à infecção
- DPI** – Dias após a infecção
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- GGT** – Gama glutamiltransferase
- HCM** – hemoglobina corpuscular média
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- PNSA** – Programa Nacional de Sanidade Avícola
- SD** – Salmonella Dublin
- SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
- SE** – *Salmonella* Enteritidis
- SFM** – Sistema fagocítico mononuclear
- SG** – *Salmonella* Gallinarum
- SGNa^r** – *Salmonella* Gallinarum resistente ao ácido nalidíxico
- SGΔcobS** – *Salmonella* Gallinarum com deleção do gene cobS
- SGΔcobSΔcbiA** – *Salmonella* Gallinarum com deleção dos genes cobS e cbiA
- SP** – *Salmonella* Pullorum
- SPI** – Ilha de patogenicidade das salmonelas
- STM** – *Salmonella* Typhimurium
- TTSS** – Sistema de secreção tipo III
- VCM** – volume corpuscular médio

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE AVES DE POSTURA (*Gallus gallus domesticus*)
POR CEPAS DE *Salmonella enterica* SOROVAR GALLINARUM (SG), SGNal^r,
SG Δ cobS e SG Δ cobS Δ cbiA: ANATOMOPATOLOGIA, HEMOGRAMA E PERFIL
BIOQUÍMICO SÉRICO**

RESUMO – Este trabalho objetivou avaliar a anatomopatologia, o hemograma e o perfil bioquímico sérico de aves de postura inoculadas por *Salmonella* Gallinarum (SG) contendo os genes *cobS* e *cbiA* inoperantes (SG Δ cobS Δ cbiA) que mostrou ser avirulenta em trabalhos anteriores, comparando-a com cepas virulentas SGNal^r e SG Δ cobS, para mostrar se SG Δ cobS Δ cbiA pode ser componente de vacina contra cepas selvagens de SG e S.Enteritidis. 280 pintainhas foram distribuídas em 4 grupos (G); G1 (SG Δ cobS), G2 (SGNal^r), G3 (SG Δ cobS Δ cbiA) e G4 (controle). Com exceção do G4, os grupos receberam 0,2 mL de suas respectivas cepas contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL de inóculo, aos 5 dias de idade. A eutanásia foi realizada 24h antes (1DAI) e após a inoculação (1DPI), e 3 (3DPI), 5 (5DPI), 7 (7DPI), 10 (10DPI) e 15 (15DPI) dias após a administração do inóculo, sacrificando-se, em cada momento, dez aves de cada grupo. As aves foram sacrificadas, obtendo-se amostras de sangue utilizadas para os exames hematológicos e bioquímicos. Fragmentos de fígado, baço, timo, bursa de Fabricius, rins e coração foram destinados aos exames histológicos. As aves inoculadas com a cepa SG Δ cobS tiveram comportamento semelhante às aves inoculadas por SGNal^r, porém com algumas respostas diferentes nos exames hematológicos e bioquímicos. As aves inoculadas com a cepa SG Δ cobS Δ cbiA tiveram comportamento semelhante ao grupo controle, entretanto foi verificada alterações brandas em alguns parâmetros, mostrando que estudos futuros devem ser feitos, verificando se as alterações constatadas não irão interferir no desempenho de aves vacinadas com a cepa SG Δ cobS Δ cbiA.

PALAVRAS-CHAVE: atenuação, histopatologia, leucograma, mutante, proteínas de fase aguda, tifo aviário

EXPERIMENTAL INFECTION OF COMMERCIAL LAYERS (*Gallus gallus domesticus*) USING *Salmonella enterica* SEROVAR GALLINARUM (SG), SGNal^r, SG Δ cobS AND SG Δ cobS Δ cbiA STRAINS: ANATOMOPATHOLOGY, HEMOGRAM AND BLOOD SERUM COMPONENTS

SUMMARY - The aim of the present study was to evaluate anatomopathology, hemogram and blood serum components of commercial layers experimentally inoculated with SG Δ cobS Δ cbiA, which is a *Salmonella* Gallinarum (SG) strain it shows attenuation of the virulence in previous research and it was compared with high virulence SGNal^r and SG Δ cobS strains in order to show if SG Δ cobS Δ cbiA has potential to be use as a vaccine against SG and *S. Enteritidis* wild strains. 280 commercial layers were divided into 4 groups (G); G1 (SG Δ cobS), G2 (SGNal^r), G3 (SG Δ cobS Δ cbiA) and G4 (control group). With exception of G4, all the other groups received 0,2 mL of their respective strain containing about 10⁸ CFU/mL of the inoculum with five days of age. Birds were sacrificed 24 hours before (1DBI) and 24 hours after the inoculation (1DAI), and three (3DAI), five (5DAI), seven (7DAI) ten (10DAI), and fifteen (15DAI) days after the administration of the inoculum, slaughtering ten birds at a time in each group. Birds were submitted to euthanasia and blood samples were collected in order to make the hematological and blood serum components test. Samples of liver, spleen, thymus, bursa of Fabricius, kidneys and heart were collected for the histological test. The birds inoculated with SG Δ cobS strain had similar behavior when compared with that ones who received SGNal^r strain, however some different responses in the hematological and blood serum components were found. On the other hand, the birds inoculated with SG Δ cobS Δ cbiA strain had similar behavior when compared with the control group, however, lower alterations in some parameters were found. Further studies must be done to verify if these alterations will not interfere in the performance of the vaccinate birds with SG Δ cobS Δ cbiA strain.

KEYWORDS: acute-phase proteins, attenuation, fowl typhoid, histopathology, leukogram, mutant

I. INTRODUÇÃO

A preocupação com a biosseguridade aviária no cenário mundial tem sido marcante, o que exige controles rigorosos para a prevenção das enfermidades. Dentre as enfermidades, as salmoneloses são um dos focos da preocupação, sendo imprescindível o seu controle. Uma das salmoneloses de grande importância é o tifo aviário, causado por *Salmonella Gallinarum* (SG), doença sistêmica grave que acomete galinhas domésticas e outras espécies de galináceos. Quando infecta um plantel avícola causa grande perda econômica, não só pelas altas taxas de morbidade e de mortalidade, mas também pela marcante queda de postura. Nos lotes afetados, a taxa de mortalidade pode ser de 40 a 80%.

Essa enfermidade foi reconhecida, inicialmente, na Inglaterra, no final do século XIX. É uma doença considerada de países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos da América, é considerada uma doença sob controle e este resultado deve-se a um plano nacional de prevenção de enfermidades avícolas, com destaque para o controle das salmoneloses. No Brasil, tem sido diagnosticada em áreas de exploração comercial de aves de postura, podendo ocorrer também em plantéis destinados à reprodução. Embora o Brasil tenha uma avicultura considerada de “primeiro mundo”, as condições ambientais próprias de zonas tropical e subtropical e os sistemas de criação em barracões abertos favorecem a disseminação de microrganismos, como as salmonelas.

Devido à importância que o tifo aviário representa para a produção avícola, o entendimento da fisiopatogenia e as alternativas que podem ser utilizadas para o devido controle dessa enfermidade se fazem necessários. Este trabalho objetiva estudar os parâmetros anatomopatológicos, hematológicos e bioquímicos, inclusive as proteínas de fase aguda, em aves de postura experimentalmente infectadas com a cepa de *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum resistente ao ácido nalidíxico (SGNal^r) e cepas mutantes contendo os genes *cobS* e *cobScbiA* inoperantes (SG Δ *cobS* e SG Δ *cobS* Δ *cbiA*). Estes genes fazem parte daqueles que são acionados pelas bactérias do gênero *Salmonella* em ambiente anaeróbico. Em trabalho recente, foi verificado que

a deleção simultânea desses genes impossibilita *Salmonella Gallinarum* de exercer sua ação patogênica em aves, porém quando houve deleção de apenas um dos genes a virulência se equiparou, sendo até maior que a cepa selvagem (PAIVA et al., 2009). Dessa forma, tendo-se em vista que o controle do tifo aviário está incluído no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), a análise das aves inoculadas por *SG Δ cobS Δ cbiA*, mostrando o comportamento da cepa ao longo da infecção é de grande importância para que, na ausência de alterações que possa comprometer a integridade fisiológica das aves, *SG Δ cobS Δ cbiA* possa ser utilizada em programas preventivos contra *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Enteritidis* (SE), sendo esta última o alvo principal, devido sua importância em saúde pública, já que são muito semelhantes quanto ao bioquimismo e fatores antigênicos.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão anatomopatológico, o hemograma e o perfil bioquímico sérico, inclusive as proteínas de fase aguda, de aves de postura experimentalmente infectadas com mutantes de *Salmonella Gallinarum* contendo os genes *cobS* e *cbiA* inoperantes ($SG\Delta cobS\Delta cbiA$), fazendo um comparativo dos parâmetros com cepas virulentas de *Salmonella Gallinarum*, $SGNaI^r$ e $SG\Delta cobS$.

2.2 Objetivos Específicos

Obter informações laboratoriais capazes de mostrar, em exame microscópico, a ausência de alterações e lesões induzidas por $SG\Delta cobS\Delta cbiA$, verificando se esta pode ser um futuro componente de eficiente vacina viva atenuada contra cepas selvagens de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Enteritidis*.

III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Taxonomia de *Salmonella*

As salmonelas são microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Salmonella*, sendo bacilos gram-negativos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, catalase-positivos e oxidase-negativos. As duas espécies que compõem o gênero são *Salmonella enterica* e *S. bongori*.

Salmonella enterica se distribui 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* (POPOFF et al., 1996). Assim, para exemplificar, a designação de *Salmonella* “*gallinarum*” passaria a ser *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo (ou sorovar) Gallinarum, ou de forma simplificada *Salmonella* Gallinarum. São conhecidos mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella*, mas cerca de 90 são os mais comuns em infecções de pessoas e animais (BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009).

3.2 Importância das salmoneloses em avicultura

Salmonella spp. é um microrganismo amplamente distribuído na natureza, sendo o ser humano e os animais seus principais reservatórios naturais e, de acordo com SHINOHARA et al. (2008), aves e bovinos são os principais disseminadores desse agente patogênico.

Em se tratando de aves comerciais, as salmoneloses são responsáveis por perdas diretas e indiretas na produção avícola, além de sua importância em saúde pública (BERCHIERI JÚNIOR et al., 2001; ANDREATTI FILHO & PATRÍCIO, 2004, BUCHALA et al., 2006).

Considerando-se que as três principais fontes de *Salmonella* spp. para aves de exploração comercial são a introdução de ave infectada, o meio ambiente e a ração, se

faz necessária a pesquisa de salmonelas nessas fontes para avaliar o grau de infecção das aves, permitindo o uso de medidas eficientes e, dessa forma, aumentando a eficácia do controle das salmoneloses aviárias (KAMPELMACHER, 1987; PEREIRA et al., 1999). Não obstante, a presença de *Salmonella* spp. também é um problema sanitário que restringe o comércio de aves e seus produtos (GAMBIRAGI et al., 2003).

Os sorotipos que infectam as aves podem causar três enfermidades distintas. A pulorose, causada por *Salmonella* Pullorum, o tifo aviário, causado por *S. Gallinarum* (SHIVAPRASAD, 2000; ITO et al., 2004; PEREIRA & SILVA, 2005; BERCHIERI JÚNIOR, 2009) e o paratifo aviário, provocado por qualquer outra salmonela que não seja *S. Pullorum* ou *S. Gallinarum*, com destaque para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (VAN IMMERSEEL et al., 2005; BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009).

As salmoneloses causadas por sorotipos adaptados a vários hospedeiros, como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, denominadas salmonelas paratíficas, em aves e mamíferos, são caracterizadas por gastroenterite; se restringem ao trato gastrointestinal, porém em certas circunstâncias em que o animal infectado se encontra debilitado, é possível a ocorrência de infecção sistêmica. Por outro lado, a doença causada por sorovares espécie específicos, como *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, manifesta-se sem comprometimento intestinal relevante, porém com grave doença sistêmica, podendo ocasionar morte do hospedeiro (VAN IMMERSEEL et al., 2005).

3.3 *Salmonella* Gallinarum e sua importância em avicultura

Salmonella Gallinarum (SG) é o agente causador do tifo aviário, enfermidade de distribuição mundial, que encontra-se sob controle em países da Europa e da América do Norte, embora tenham sido relatados casos em países como Alemanha e Dinamarca, no final da década de 80 (CHRISTENSEN et al., 1992). O tifo aviário tem sido descrito em países cuja avicultura industrial está em desenvolvimento e naqueles onde as aves são criadas livremente. Relatos recentes de isolamento de SG são oriundos de criações industriais avícolas de países africanos (ORJI et al., 2005) e asiáticos (KIM et al., 2007; LEE et al., 2007). Ocorrência de SG nas Américas Central e

do Sul foi relatado por SILVA (1984). No Brasil, desde a década de 60, estudos mostram altas prevalências de SG; porém, as maiores taxas de prevalência foram constatadas na década de 80 e no início da década de 90 (HOFER et al., 1997; BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009).

O microrganismo causador do tifo aviário é uma bactéria aflagelar, pertencente ao grupo D, que apresenta os antígenos somáticos 1, 9 e 12, como ocorre em *Salmonella Pullorum* (SP), sorovar muito semelhante a SG, possuindo algumas diferenças quanto ao comportamento bioquímico, destacando-se a fermentação do dulcitol por SG, reação que não ocorre com SP e a descarboxilação da ornitina por SP, mas não por SG (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009). Contudo, existem cepas com comportamento bioquímico atípico, o que dificulta a diferenciação por esse método. Estudo molecular recente com os dois sorotipos, utilizando técnica de tratamento enzimático com a enzima de restrição Eco RI, permitiu diferenciar SG de SP, mesmo quando amostras bacterianas apresentavam comportamento bioquímico atípico (RIBEIRO et al., 2009).

3.3.1 Epidemiologia e Patogenia

As fontes de infecção do tifo aviário são aves doentes e portadoras que, além de disseminarem, contribuem para a persistência da bactéria na natureza. Além de galinhas, a literatura especializada registra o agente do tifo aviário em perus, galinhas-da-angola, codornas, faisões, pardais e papagaios (SNOEYENBOS, 1991; POMEROY & NAGARAJA, 1991; SHIVAPRASAD, 1997).

É possível notar *Salmonella Gallinarum* nas fezes de animais infectados, em estágio final da doença, e ser transmitida por contágio indireto. Higiene deficiente, presença de moscas, pássaros, urubus, roedores, entre outros fatores, podem contribuir na disseminação do agente etiológico da doença em propriedades avícolas. Veículos que transportam aves, esterco e ovos, também são incriminados como meios prováveis de disseminação da bactéria, especialmente, aqueles que entram em várias granjas sem lavagem e desinfecção prévia. Contato entre ave doente e ave sadia, canibalismo

e presença de aves mortas na granja, bem como a equipe de trabalho e outras pessoas que transitam em propriedades avícolas, são fatores importantes na transmissão do tifo aviário (BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009).

O tifo aviário é uma enfermidade que geralmente causa grave infecção sistêmica em galinhas, com grande perda econômica devido a altas taxas de morbidade e de mortalidade e à queda na produção de ovos (BERCHIERI JÚNIOR et al., 2001).

As linhagens leves são consideradas mais resistentes, enquanto as semi-pesadas e as pesadas são consideradas suscetíveis à doença (FREITAS NETO et al., 2007). A habilidade de inibir o desenvolvimento da enfermidade por algumas linhagens de aves está relacionada à sua capacidade intrínseca de controle do patógeno, limitando a multiplicação e a eliminação, além de um eficiente mecanismo de destruição bacteriana no interior de macrófagos (BUMSTEAD & BARROW, 1993; QURESHI, 1998; WIGLEY et al., 2002). BERCHIERI JÚNIOR et al. (2000), no estudo da infecção experimental por SG em linhagens leves de aves poedeiras, observaram que apesar das aves não desenvolverem sinais clínicos, alguns órgãos internos apresentaram alterações macroscópicas; também, a bactéria foi isolada do baço e do fígado, quatro semanas após a infecção. Ainda com relação à resistência, OLIVEIRA et al. (2005), constataram que entre as linhagens suscetíveis, o desencadeamento da enfermidade e a morte depende da dose infectante ou desafio de SG a que as aves são submetidas.

Em aves, a principal porta de entrada de *Salmonella* é a gastrointestinal; após a infecção oral, a bactéria atinge o íleo distal e o ceco, replica-se na submucosa e placas de Peyer e penetra no epitélio intestinal (KAISER et al., 2000; JONES et al., 2001). Nas infecções clássicas por *Salmonella Gallinarum* não se nota comprometimento intestinal, como acontece nas salmonelas paratíficas, provavelmente por induzir baixa resposta inflamatória pelo fato de serem bactérias aflagelares, uma vez que os flagelos são potentes indutores de citocinas inflamatórias (WYANT et al., 1999). SG utiliza mecanismos específicos de invasão, como o sistema de secreção tipo III (em inglês, TTSS, sigla de “type III secretion system”), expresso por um gene denominado *inv H* (ALTMAYER et al., 1993, JONES et al., 2001). Esse sistema de secreção está localizado em ilhas de patogenicidade das salmonelas (em inglês, SPI, sigla de

“*Salmonella* Pathogenicity Island”), sendo responsável por mediar a passagem da bactéria desde a luz intestinal até o interior das células por meio do trânsito de proteínas efectoras, responsáveis pela migração bacteriana (KAISER et al., 2000; MASTROENI et al., 2000; JONES et al., 2001). Dentre esses mecanismos de invasão de SG destacam-se SPI1-TTSS e SPI2-TTSS. Enquanto o SPI1-TTSS está mais relacionado às etapas iniciais da infecção, o SPI2-TTSS está relacionado diretamente à virulência de SG (JONES et al., 2001; SHAH et al., 2005; JEONG et al., 2008). Segundo JONES et al. (2001), o SPI2-TTSS é absolutamente necessário para a sobrevivência de SG nos macrófagos e, conseqüentemente, para sua multiplicação no sistema fagocítico mononuclear (SFM), além de, provavelmente, estar envolvido na migração de SG do intestino para o fígado e o baço, sugerindo que o transporte ocorre por meio de fagócitos. Como SG não induz resposta inflamatória no intestino, ela limita a ação do sistema imune do hospedeiro, podendo desencadear grave doença sistêmica (KAISER et al., 2000). De acordo com BARROW et al. (1987), outro mecanismo de sobrevivência de SG está relacionado com um plasmídeo de 85 kb na estrutura da bactéria, cuja presença habilita SG a sobreviver e crescer dentro das células do SFM.

3.3.2 Alterações hematológicas

Após a invasão e replicação, principalmente em células do SFM, SG causa distúrbios na circulação sanguínea como anemia, caracterizando a fase aguda da infecção. Anemia é um achado comum em animais acometidos por infecções bacterianas e está associada à reação inflamatória. Segundo ALENCAR et al. (2002), a anemia da doença inflamatória (ADI) é uma anemia não-regenerativa, de leve a moderada, com característica normocítica normocrômica associada com processo inflamatório, infecções crônicas e condições traumáticas. Por outro lado, STOCKHAM, (2000) observou que as infecções bacterianas ou virais causam anemia moderada a grave como resultado de hemorragia em condições de lesão vascular, trombocitopenia e hemólise eritrocitária. Segundo a literatura, na infecção por SG, o processo anêmico está relacionado à lise de hemácias, sendo que a hemólise é induzida pela presença de

uma toxina bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS) na circulação sanguínea, que promove a formação de complexos LPS-anticorpo que seriam fagocitados pelo SFM (ASSOKU et al., 1970, ALLAN & DUFFUS, 1971; ASSOKU & PENHALE, 1974; 1978).

Alguns parâmetros são necessários para a avaliação das alterações do perfil eritrocitário. Os índices hematimétricos hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) permitem a classificação da anemia em normocrômica ou hipocrômica; por outro lado o índice volume corpuscular médio (VCM) permite classificar a anemia em normocítica, macrocítica ou microcítica. Já o hematócrito permite avaliar a massa de hemácias de uma amostra de sangue. Baixo valor do hematócrito pode ser observado em doença hemorrágica aguda ou crônica (CAMPBELL & DEIN, 1984).

Em infecções experimentais por SG, notou-se anemia, com expressiva diminuição do hematócrito (ASSOKU et al., 1970, ALLAN & DUFFUS, 1971; POMEROY & NAGARAJA, 1991; CHRISTENSEN et al., 1996; CARDOSO et al., 2003; GARCIA et al., 2007b). Não há consenso quanto à classificação da anemia durante infecção por SG; alguns autores a definem como macrocítica normocrômica (ASSOKU et al., 1970; CARDOSO et al., 2003), outros como microcítica normocrômica (CHRISTENSEN et al., 1996). ASSOKU & PENHALE (1974), durante a fase aguda do tifo aviário verificaram grave anemia hemolítica, com perda de mais de 70% do total de hemácias da circulação sanguínea. BUXTON (1960) notou que nas infecções naturais por SG, as aves apresentavam menor concentração de hemoglobina. No entanto, em condições experimentais o autor não verificou tal alteração.

A contagem total de leucócitos, inclusive a contagem diferencial, é necessária para a interpretação segura da natureza de uma infecção viral ou bacteriana (NORIEGA, 2000). Segundo ANDERSON & STEPHENS (1970), a contagem diferencial de leucócitos é de extrema importância para o diagnóstico de doenças aviárias.

A respeito das alterações nos parâmetros leucocitários durante a infecção experimental por *Salmonella* Gallinarum, constatou-se leucocitose com heterofilia marcante. No entanto, o número de linfócitos dessas aves era inferior àqueles encontrados em aves saudáveis (ASSOKU et al., 1970; ALLAN & DUFFUS, 1971;

KOKOSHAROV, 1998; CARDOSO et al., 2003; FREITAS NETO et al., 2007; GARCIA et al., 2007b). Segundo MORGULIS (2002) a leucocitose deve-se, principalmente, à heterofilia, sendo as causas mais comuns as infecções sistêmicas causadas por microrganismos, como as salmonelas.

A avaliação do teor de proteína total e de suas frações propicia subsídios para adequada interpretação do estado de hidratação, bem como do diagnóstico de doenças inflamatórias e imunomediadas e de alteração na síntese protéica (KANEKO et al., 2009).

Em aves sadias, o teor plasmático de proteína total varia de 3,0 a 6,0 g/dL, sendo considerado bom indicador do estado de higidez das aves. SILVA et al. (2007), em estudo de parâmetros hematológicos de frangos de corte sadios de diferentes idades, constatou valor médio de 3,0 g/dL para proteína total. Concentração elevada de proteína pode ser decorrente de desidratação ou de elevação do teor de globulinas como acontece em doenças inflamatórias (CAMPBELL & COLES, 1986). Em aves inoculadas com SG, CARDOSO et al. (2003) constataram elevação plasmática de proteína total.

O estágio inicial da reação inflamatória induzida por infecção envolve a liberação de proteínas de fase aguda, positivas e negativas (GRUYS et al, 1994). GARCIA et al. (2009), em estudo com infecção experimental de aves poedeiras por SG verificaram no traçado eletroforético obtido em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) alterações nos teores plasmáticos de proteínas de fase aguda dessas aves, em comparação com aves sadias.

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 propicia melhor reconhecimento e destruição da bactéria pelos fagócitos (MASTROENI et al., 2000; MITTRUCKER et al., 2000). Aumento do teor de IgG foi observado em infecções experimentais por SG (DUFFUS & ALLAN, 1968; GARCIA et al., 2009).

A determinação da concentração sérica de eletrólitos, enzimas e lipídeos, como colesterol e triglicérides, são importantes na avaliação de várias atividades metabólicas vitais que ocorrem nos fluidos corporais dos animais. SILVA et al. (2007), estudando parâmetros bioquímicos séricos de frangos de corte, verificaram alterações relevantes nos teores séricos de aspartato aminotransferase (AST), colesterol e cálcio entre grupos de frango com 21, 35 e 42 dias de idade, mostrando o quão dinâmico é a fisiologia do frango industrial, que apresenta alto nível de atividade metabólica, em razão de seu rápido crescimento.

Enfermidades sistêmicas, como tifo aviário, são acompanhadas de alterações nos parâmetros bioquímicos séricos. GARCIA et al. (2007c), em infecção experimental de aves poedeiras por SG, observaram alterações significativas nos teores séricos de magnésio, colesterol e triglicérides das aves infectadas, quando comparadas com aves saudáveis de mesma idade.

3.3.3 Alterações anatomopatológicas

Devido à gravidade da infecção por SG, em razão de sepse e toxemia, ocorre expressivo comprometimento dos órgãos infectados pela bactéria. O volume do fígado aumenta três a quatro vezes; o órgão torna-se friável, esverdeado ou amarelo-esverdeado a bronzeado e repleto de pontos de necrose (esbranquiçados) e de hemorragia. Necroses multifocais aparecem no baço e no coração. O volume do baço, à semelhança do fígado, aumenta três a quatro vezes; nota-se, ainda, pontos de hemorragia. Na doença de curso mais longo é possível notar hidropericárdio e inflamação, com nódulos esbranquiçados no coração, baço, pulmões, rins, moela, pâncreas, duodeno e ceco. Tais alterações foram observadas em diversos trabalhos que relatam infecção experimental de aves por SG (SMITH, 1955; ASSOKU et al., 1970; CHRISTENSEN et al., 1996; SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JÚNIOR et al., 2000; FREITAS NETO et al., 2007; GARCIA et al., 2007a; BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009).

3.4 Relação entre síntese de cobalamina e potencial de virulência das salmonelas

Organismos procarióticos, como as salmonelas, possuem mecanismos intrínsecos de sobrevivência, devido a um sistema respiratório modulado para alterar rapidamente o seu funcionamento de acordo com as condições e a disponibilidade de substratos para a obtenção de energia. Faz parte da habilidade da bactéria, para superar as adversidades ambientais, alteração da composição do seu sistema respiratório (RICHARDSON, 2000). Dessa forma, além dos mecanismos de virulência (JONES et al., 2001), a sobrevivência das salmonelas depende da capacidade de utilização dos substratos disponíveis no meio em que se encontra.

TURNER *et al.* (2003) observaram, no estudo com mutantes de SG, *Salmonella* Typhimurium (STM) e *Salmonella* Dublin (SD) contendo alterações em genes que expressam componentes da cadeia de transporte de elétrons (*nuoG*, *cydA* e *cyoA*), que essas bactérias colonizaram o trato digestório de frangos e camundongos utilizando uma via alternativa, anaeróbica ou fermentativa. Tais estudos mostram que as salmonelas são anaeróbicas facultativas.

A cobalamina (CBL) é um nutriente essencial para a vida de animais e seres humanos, porém, apenas organismos procarióticos como as salmonelas possuem mecanismos para biossíntese desta macromolécula. Em STM, a síntese de CBL ocorre em condições de anaerobiose, podendo ser sintetizada em aerobiose ou anaerobiose quando a bactéria for suprida com as substâncias precursoras como *cobinamida* (JETER et al., 1984; ESCALANTE-SEMERENA et al., 1990).

O *CbiA* (*ácido cobirínico a,c-diamido sintetase*) é a primeira glutamina aminotransferase da via anaeróbica para a biossíntese de cianocobalamina ou vitamina B12 (CN-CBL), cuja via de produção é bastante complexa, requerendo atividade catalítica de aproximadamente 30 enzimas (ANDERSSON, 1995); destas, 25 são codificadas pelo *operon cob* (ESCALANTE-SEMERENA et al., 1992; ROTH et al., 1993). Tal complexidade é afirmada com a quantidade de genes que participam de sua síntese, cerca de 1% do genoma bacteriano (PRICE-CARTER et al., 2001).

A presença de cobalamina 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 (ROTH et al., 1993; WARREN et al., 2002).

A enzima *CobS* (*Adenosilcobalamina-5'-P sintase*) fica localizada na membrana celular e catalisa o penúltimo passo da produção de Ado-CBL (MAGGIO-HALL et al., 2004), sendo a produção de cobalamina dependente da enzima *CobS* (MAGGIO-HALL & ESCALANTE-SEMERENA, 1999; ANDERSON et al., 2008).

A deleção dos genes *cobS* e *cbiA* ($\Delta cobS \Delta cbiA$) em *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. PAIVA et al. (2009), no estudo com cepas de SG contendo os genes *cobS* e *cbiA* inoperantes, mostrou que a bactéria tem seus mecanismos de sobrevivência de modo a superar a ausência de um deles. Contudo, quando a deleção foi dupla, o mutante de SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ apresentou comportamento diferente da cepa selvagem. Enquanto a cepa selvagem e a cepa com deleção de apenas um gene provocou mortalidade de quase 100% das aves infectadas experimentalmente, a cepa com dupla deleção não provocou mortalidade alguma. Esta atenuação tem provável ligação com a extinção da produção de cobalamina durante a fase intracelular, o que prejudica sua sobrevivência dentro dos macrófagos (FIELDS et al., 1986; BUCHMEIER & HEFFRON, 1989).

Segundo PENHA FILHO (2009) a atenuação da cepa SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ pode ser decorrente da dificuldade em sobreviver no intestino ou de invadir a parede intestinal do organismo, destruição mais eficiente desta cepa pelos macrófagos dos órgãos ou por uma replicação mais lenta.

3.5 Medidas preventivas para o controle das salmoneloses aviárias

Devido à ocorrência e importância das salmoneloses aviárias, muitos estudos estão focados em pesquisas sobre controle dessas enfermidades, com destaque para SG, SP, SE e STM, as quais são controladas de acordo com o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), em razão da importância e do impacto desses sorotipos na produção avícola, no contexto nacional e internacional.

De acordo com o PNSA, o tifo aviário é uma das enfermidades de destaque devido suas altas taxas de morbidade e de mortalidade em aves. Segundo BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO (2009), o melhor programa de prevenção quando se trata do tifo aviário, baseia-se na limpeza, higiene e desinfecção da granja. Deve-se ter cuidado com dejetos, veículos que transportam aves, ração e suas matérias primas, fezes (cama), ovos e aves de diferentes idades, evitar água parada, dar um destino correto e rápido aos animais mortos, além de controlar o acesso de pássaros, roedores e mosquitos à granja. SHIVAPRASAD (2000) relaciona a diminuição da prevalência de SG em países desenvolvidos a um forte programa de biossegurança, sobressaindo-se a eliminação de aves reprodutoras infectadas, bem como os ovos delas provenientes; granjas de reprodução devem receber somente ovos confirmados livres do patógeno.

Uma vez instalada a bactéria em uma propriedade, a eliminação de *Salmonella* pela ave e a sua presença no ambiente torna-se um grande problema; o controle é mais efetivo quando se emprega de modo integrado diferentes medidas de biossegurança, entre elas a vacinação (INOUE, 2007).

Infecções experimentais utilizando cepas vacinais com mutantes de SG em aves mostraram proteção, ao menos parcial, contra o desafio com cepas selvagens de SG (BARROW, 1990; GRIFFIN & BARROW, 1993; ZHANG-BARBER et al., 1998; RANA & KULSHRESHTHA, 2006; ROSU et al., 2007; PENHA FILHO, 2009) e contra cepas selvagens de SE (BARROW et al., 1991; FEBERWEE et al., 2001a; PENHA FILHO, 2009).

SG 9R é uma cepa atenuada de SG que foi alvo de estudos em razão dos resultados satisfatórios. É uma cepa rugosa originada da cepa lisa 9S (SMITH, 1956;

GORDON & LUKE, 1959; GORDON et al., 1959). SG9R não possui os antígenos somáticos característicos da forma lisa de SG devido alterações em seus antígenos de superfície e na conformação de seus carboidratos terminais (LEE et al., 2005). Dessa forma, a mudança na estrutura da bactéria influenciou a virulência da cepa (FEBERWEE et al., 2001a,b). WIGLEY et al. (2005) observaram que uma das formas de atenuação da cepa SG9R é a diminuição do período de vida da bactéria no fígado e no baço das aves.

Assim como SG9R, a cepa SG $\Delta cobS\Delta cbiA$, além de ser avirulenta para aves (PAIVA et al., 2009), possui características que a torna promissora para uma eficiente vacina atenuada, como a ausência de lesões graves em órgãos e a possibilidade de diferenciá-la de outras cepas de SG (PENHA FILHO, 2009).

Contudo, programas de vacinação não substituem medidas gerais de controle e, além disso, há relatos de que mesmo a vacinação utilizando a cepa 9R desencadeou o quadro de tifo aviário (BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009).

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação dos mutantes e de SGNal^r

A metodologia adotada seguiu os protocolos contidos no manual de técnicas de biologia molecular do *Molecular Cloning*, volumes 1, 2 e 3 (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Os mutantes de SG contendo deleção dupla (*cobS* e *cbiA*) e a deleção de apenas um dos genes (*cobS*) foram preparados conforme metodologia utilizada por PAIVA et al. (2009).

A cepa de *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum (SG) resistente ao ácido nalidíxico (SGNal^r) foi preparada por BERCHIERI JÚNIOR et al. (2001) no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP - Câmpus de Jaboticabal.

4.2 Preparação dos inóculos

As cepas bacterianas foram cultivadas em caldo Luria-Bertani (LB) (Invitrogen 12780-052) e incubadas a 37°C, durante 24 horas em agitação (100rpm). Uma amostra de 0,1 mL 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 depositado 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. Após esse período, as culturas continham, aproximadamente, concentrações de 10⁸ UFC/mL de inóculo.

4.3 Característica das aves

Foram utilizadas 280 aves de linhagem comercial semi-pesada (vermelhas), consideradas suscetíveis à bactéria *Salmonella Gallinarum*. No momento da chegada foram colhidas amostras de sangue para exame sorológico (soroaglutinação rápida em lâmina) e amostras de fezes das caixas de transporte para o exame bacteriológico, de acordo com as recomendações de ZANCAN et al. (2000), das quais os resultados foram negativos para *Salmonella Gallinarum*. Esses procedimentos foram necessários para se ter certeza da higidez das aves. As aves foram mantidas em isoladores, ocupando baterias separadas de acordo com a categoria dos grupos, com aquecimento elétrico até o 12º dia de vida, pois este é o tempo médio que a aves necessitam de aquecimento extra, e receberam água e ração à vontade. Todos os dias, no período da manhã, era feito o abastecimento dos cochos de ração e a retirada e limpeza dos cochos de água, sendo colocada água limpa diariamente, além da retirada das fezes do assoalho das baterias.

4.4 Procedimento experimental

As aves foram distribuídas, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais:

Grupo 1 (n= 70): Aves inoculadas com *S.Gallinarum* NaI^r Δ cobS/mL.

Grupo 2 (n= 70): Aves inoculadas com *S. Gallinarum* NaI^r/mL.

Grupo 3 (n= 70): Aves inoculadas com *S.Gallinarum* NaI^r Δ cobS Δ cbiA/mL.

Grupo 4 (n= 70): Aves não inoculadas (grupo controle).

Com exceção do grupo 4 (controle), os grupos receberam diretamente no papo por meio de cânula, um volume de 0,2 mL de suas respectivas cepas contendo aproximadamente 10^8 UFC de SG/mL.

As aves foram desafiadas com cinco dias de idade e submetidas à eutanásia para obtenção das amostras de sangue e fragmentos de tecidos, de acordo com a Tabela 1.

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética e bem estar animal (CEBEA – Protocolo n° 02666-08) devido ser necessário inocular cepas comprovadamente nocivas às aves, bem como eutanasiá-las nos dias de colheitas de material biológico.

Tabela 1. Esquema das coletas de material biológico dos grupos experimentais de aves de postura de uma variedade vermelha expostas à infecção experimental por *SGNaI^fΔcobS* (G1), *SGNaI^f* (G2), *SGNaI^fΔcobSΔcbiA* (G3) e grupo controle (G4).

Colheitas de material biológico	N° de animais abatidos por momento			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
24 horas antes da infecção	10	10	10	10
24 horas após a infecção (PI)	10	10	10	10
3 dias PI	10	10	10	10
5 dias PI	10	10	10	10
7 dias PI	10	10	10	10
10 dias PI	5	1	10	10
15 dias PI	*	*	10	10

* = Ausência de aves

4.5 Avaliação clínica

As aves foram examinadas diariamente para avaliação de sinais clínicos e registro de mortalidade, de acordo com recomendações de BERCHIERI JÚNIOR et al. (2000). O exame foi realizado no período da manhã, durante o manejo cotidiano, e à tarde.

4.6 Análises laboratoriais

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP - Câmpus de Jaboticabal.

4.7 Colheita de sangue

As aves foram insensibilizadas e posteriormente submetidas à eutanásia, obtendo-se amostras de sangue de vasos da região cervical. Esse procedimento foi realizado em todos os dias de colheita, ou seja, um dia antes e um, três, cinco, sete, dez e quinze dias após a infecção experimental por *S. Gallinarum* NaI^r. Para a realização do hemograma foram obtidas amostras de sangue em frasco contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10%, na proporção de 0,01 mL para 1,0 mL de sangue. As amostras de sangue para os exames bioquímicos, inclusive do proteinograma, foram coletadas em frascos sem anticoagulante; após coagulação e retração do coágulo em temperatura ambiente o soro sanguíneo foi transferido para novo tubo e centrifugado, separando-se completamente o soro, que é a fração de interesse para as análises. O soro obtido foi transferido para tubos ependorf que foram congelados até o momento das análises.

4.7.1 Hemograma

As contagens de hemácias e de leucócitos foram realizadas em hemocítômetro de Neubauer; as células foram coradas conforme recomendação de NATT & HERRICK (1952). Para a contagem diferencial de leucócitos foram preparados esfregaços sanguíneos, corados pelo método de Rosenfeld, de acordo com a técnica descrita por LUCAS & JAMROZ (1961). O hematócrito foi obtido pela técnica do microhematócrito, a determinação de hemoglobina foi realizada através da técnica da cianometahemoglobina. Pelas fórmulas padronizadas foram calculados os seguintes índices de Wintrobe: hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e volume corpuscular médio (VCM). Essas mensurações foram feitas em cinco aves de cada grupo.

4.7.2 Perfil bioquímico sérico

Foram determinados os teores séricos de fósforo (método de Daly e Ertingshausen modificado), proteína total (método do biureto), albumina (método do verde de bromocresol), triglicérides (método enzimático-Trinder), colesterol (método enzimático-Trinder), cálcio total (método CPC), magnésio (método Labtest), creatinina (método Labtest), gamaglutamiltransferase (GGT) (método de Szasz modificado), aspartato aminotransferase (AST) (método cinética UF-IFCC), ácido úrico (método enzimático-Trinder) e fosfatase alcalina (método de Bowers e McComb), mediante utilização de kits comerciais (Labtest). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático (Labquest), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste.

Para o fracionamento protéico da eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi utilizada a técnica proposta por WEBER & OSBORN (1969). Após o fracionamento o gel foi corado durante 10 minutos em solução de coomassie blue 0,25% e, posteriormente, colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu CS9301, Tóquio). Como referência foi utilizada solução marcadora (Sigma S8445) com diferentes pesos moleculares, além das proteínas purificadas ceruloplasmina, haptoglobina, α_1 -antitripsina, transferrina e IgG.

4.8 Exame bacteriológico

O exame dos suabes de fígado seguiu o modelo adotado por BERCHIERI JÚNIOR et al. (2001). Imediatamente após a realização dos suabes, esses eram colocados em tubos contendo 2 mL de caldo selenito-novobiocina (SN). Posteriormente, foram semeados em placas contendo ágar verde-brilhante (Oxoid CM0263) contendo ácido nalidixico (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e novobiocina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas e os tubos foram incubados a 37⁰C, durante 24 horas. Na ausência de crescimento no ágar,

o suabe foi novamente semeado em novas placas contendo ágar verde-brilhante e incubado nas mesmas condições, sendo analisado após 24 horas.

4.9 Exame macroscópico

Depois de feitos a colheita de sangue e do suabe de fígado, os órgãos das aves eutanasiadas eram minuciosamente analisados, onde foram observados aspecto, tamanho e coloração de cada órgão, sendo o objetivo encontrar lesões condizentes com a infecção por SG nos grupos infectados, tendo como parâmetro o grupo controle.

4.10 Exame histopatológico

Em cada momento de colheita foram obtidas amostras de fígado, baço, timo, bursa de Fabricius, coração e rins de cinco aves de cada grupo, destinadas ao exame histopatológico. Os fragmentos desses tecidos foram imersos em solução de formaldeído 4% tamponada em fosfato, com pH 7,2, na proporção líquido:fragmento de, no mínimo, 20:1. O processamento posterior das amostras para inclusão em parafina seguiu as recomendações de BEHMER et al. (1976). Os cortes foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina e examinados em microscópio binocular equipado com sistema de fotomicrografia digital (NICKON ECLIPSE E200 + COOLPIX 5400).

4.11 Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x7 (grupos e momentos pré e pós-infecção). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico “*Statistical Analysis System*” (SAS); no caso de diferença significativa as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

V. RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica

A partir do quarto dia após a infecção, 11 aves do grupo 1 (G1) e 15 aves do grupo 2 (G2) manifestaram sinais clínicos da infecção por SG. Apresentavam-se apáticas, encorujadas, não reativas ao estímulo além de diminuição de consumo de ração e água. O assoalho da gaiola indicava ocorrência de diarreia com fezes pastosas, de coloração amarelo-esverdeada, com presença de sangue. O aspecto das fezes é mostrado nas Figuras 1 e 2 e o aspecto clínico das aves no quinto dia após a infecção apresenta-se nas Figuras 3 e 4. No quinto dia após a infecção notou-se morte de aves do G2. No G1, constatou-se morte a partir do sexto dia após a infecção. Como mostrado na Tabela 2, devido às características altamente patogênicas das cepas a que as aves dos grupos 1 e 2 foram submetidas, morreram, ao todo, 15 aves do G1 e 19 aves do G2. Não se constatou óbito de aves nos Grupos 3 e 4 (G3 e G4).

Tabela 2. Número de mortes naturais de aves vermelhas expostas à infecção experimental por *S. Gallinarum* $\Delta cobS$, Nal^r e $\Delta cobS\Delta cbiA$ nos 15 dias após a inoculação.

Cepa	Dias após a inoculação											Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	
SG $\Delta cobS$	0	0	0	0	0	4	2	4	3	2	-	15
SG Nal^r	0	0	0	0	6	7	6	0	0	0	-	19
SG $\Delta cobS\Delta cbiA$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- = ausência de aves



Figura 1. Aspecto das fezes de aves do G1 no sétimo dia após a infecção mostrando coloração amarelo-esverdeada e presença de sangue.



Figura 2. Aspecto das fezes de aves do G2 no sétimo dia após a infecção com características semelhantes às fezes de aves do G1.



Figura 3. Aspecto de aves do G1 no quinto dia após a infecção. À esquerda, nota-se ave morta no lado inferior esquerdo e à frente ave em mau estado, que não respondia a estímulos. À direita, notam-se duas aves apáticas, encorujadas e com penas eriçadas, sinais típicos de infecção por *Salmonella Gallinarum*.



Figura 4. Aspecto de aves do G2 no quinto dia após a infecção. Nota-se no lado inferior direito uma ave morta e à frente duas aves com sintomas semelhantes às aves do G1.

5.2 Hemograma

5.2.1 Eritrograma

Os resultados do eritrograma dos grupos experimentais são mostrados na Tabela 3. As principais alterações do perfil eritrocitário foram verificadas nas aves de G1 e G2, evidenciando anemia nos estágios mais avançados da infecção, com decréscimo dos valores de hemácias e do hematócrito. Com relação aos índices hematimétricos obtidos nas aves de G1 e G2 notou-se aumento significativo no valor da hemoglobina corpuscular média (HCM) e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) no decorrer da infecção, enquanto o volume corpuscular médio (VCM) se manteve sem alteração. Portanto as aves desenvolveram anemia normocítica normocrômica. Com relação aos resultados obtidos nas aves do G3, com exceção de discreta diminuição nos valores do VCM, os valores não se alteraram, à semelhança do verificado no G4 (controle).

Tabela 3. Média das contagens de hemácias, hematócrito, teor de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de aves de postura experimentalmente infectadas por *Salmonella Gallinarum* Na^f, $\Delta cobS$ e $\Delta cobS\Delta cbiA$.

Variável	Colheitas	Grupos				CV	
		1	2	3	4		
Val. Referência	1 DAI	2,04 ^a	2,02 ^a	1,95	2,14	12,4	
	1 DPI	2,20 ^a	2,01 ^a	2,17	2,10	21,0	
	3 DPI	1,81 ^{ab}	1,68 ^{ab}	2,12	2,14	15,9	
	Hemácias/μL ($\times 10^6$)	5 DPI	1,47 ^{bcB}	1,50 ^{abB}	2,30 ^A	2,22 ^A	10,5
		7 DPI	1,28 ^{cB}	1,89 ^{abA}	2,22 ^A	2,05 ^A	14,2
		10 DPI	1,27 ^{cB}	1,28 ^{bB}	2,10 ^A	2,01 ^A	10,4
		15 DPI	-	-	1,97	2,05	27,7
CV (%)		15,2	15,9	15,5	12,3		
Val. Referência	1 DAI	31,4 ^a	29,6 ^a	31,0	29,8	13,4	
	1 DPI	27,2 ^{ab}	28,7 ^{ab}	26,4	26,0	17,3	
	3 DPI	19,6 ^{bcB}	22,4 ^{abB}	28,6 ^A	29,5 ^A	12,8	
	Hematócrito (%)	5 DPI	19,4 ^{cB}	19,8 ^{abB}	29,0 ^A	26,8 ^A	15,9
		7 DPI	22,0 ^{bcAB}	17,8 ^{abB}	27,4 ^{AB}	28,8 ^A	15,8
		10 DPI	19,0 ^{cB}	18,0 ^{bB}	28,0 ^{AB}	29,4 ^A	15,4
		15 DPI	*	*	29,0	28,0	7,20
CV (%)		11,9	16,0	17,6	16,8		
Val. Referência	1 DAI	9,56 ^{ab}	9,30 ^{ab}	8,26	9,87	17,3	
	1 DPI	6,92 ^b	6,16 ^b	8,62	10,0	23,9	
	3 DPI	10,8 ^a	10,1 ^a	8,96	11,0	12,1	
	Hemoglobina (g/dL)	5 DPI	9,72 ^{ab}	9,52 ^{ab}	9,50	12,8	19,2
		7 DPI	7,22 ^{bB}	11,5 ^{aA}	10,6 ^A	10,9 ^A	12,1
		10 DPI	9,00 ^{abAB}	6,50 ^{bB}	10,5 ^A	9,92 ^A	11,2
		15 DPI	*	*	10,2	10,6	16,9
CV (%)		17,57	15,18	20,11	14,14		
Val. Referência	1 DAI	156	147	177 ^a	140	17,8	
	1 DPI	127	140	125 ^b	129	28,3	
	3 DPI	109	134	137 ^{ab}	140	17,3	
	VCM (fL)	5 DPI	131	132	128 ^{ab}	121	18,0
		7 DPI	167 ^A	105 ^B	128 ^{abAB}	141 ^{AB}	20,5
		10 DPI	156	141	140 ^{ab}	146	23,7
		15 DPI	*	*	147 ^{ab}	135	14,3
CV (%)		23,1	23,3	18,2	12,3		
Val. Referência	1 DAI	47,4 ^b	46,7 ^{ab}	42,7	44,0	21,3	
	1 DPI	49,5 ^{bA}	30,4 ^{bB}	33,3 ^B	49,6 ^A	28,3	
	3 DPI	59,8 ^{aA}	60,4 ^{aA}	43,5 ^B	52,0 ^{AB}	15,3	
	HCM (pg)	5 DPI	66,2 ^{aA}	63,3 ^{aAB}	42,9 ^B	58,1 ^{AB}	20,0
		7 DPI	54,7 ^{ab}	61,6 ^a	49,1	53,1	18,3
		10 DPI	71,4 ^{aA}	50,8 ^{abB}	52,3 ^B	49,3 ^B	9,87
		15 DPI	*	*	52,0	51,7	15,5
CV (%)		23,8	15,6	24,6	16,2		
Val. Referência	1 DAI	30,8 ^b	32,3 ^{bc}	31,3	32,4	22,8	
	1 DPI	31,9 ^{bAB}	23,5 ^{cB}	34,2 ^{AB}	39,6 ^A	27,6	
	3 DPI	54,9 ^{aA}	47,1 ^{abAB}	31,7 ^C	37,3 ^{BC}	16,5	
	CHCM (g/dL)	5 DPI	52,6 ^{abA}	49,5 ^{abA}	32,7 ^B	49,1 ^A	25,5
		7 DPI	35,3 ^{abB}	58,6 ^{aA}	39,5 ^B	38,3 ^B	17,0
		10 DPI	49,0 ^{abA}	49,5 ^{abA}	38,2 ^{AB}	34,5 ^B	23,2
		15 DPI	*	*	35,3	39,8	10,1
CV (%)		25,6	22,7	24,3	22,6		

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

1=Grupo desafiado oralmente com cultura de SGNal^f $\Delta cobS$; 2=Grupo desafiado com cultura de SGNal^f; 3=Grupo desafiado com cultura de SGNal^f $\Delta cobS\Delta cbiA$; 4=Grupo não desafiado (controle).

*= Grupos 1 e 2 – Ausência de aves; CV= Coeficiente de variação; DAI= dia antes da inoculação; DPI= dias após a inoculação; Val.= Valores

5.2.2 Leucograma

Os resultados obtidos no leucograma são apresentados na Tabela 4. A partir do terceiro DPI, notou-se leucopenia em G1 e G2, seguida de leucocitose marcante no sétimo DPI no G1, onde permanece severa leucocitose quando comparado ao dia anterior à inoculação (DAI). No G2, a leucocitose teve seu pico no quinto DPI; após esse momento ocorreu declínio gradativo dos valores de leucócitos, que retornou à contagem basal no décimo DPI.

A contagem diferencial mostrou inversão da relação heterófilo:linfócito em aves do G1, a partir do sétimo DPI, e no G2, a partir do quinto DPI, permanecendo assim até o décimo DPI, dia em que as contagens de heterófilos e linfócitos se equipararam dentro dos respectivos grupos. Nas aves do G1, a contagem de heterófilos dobrou no sétimo DPI; no G2, a contagem heterofílica quadruplicou no quinto DPI, em comparação com o DAI nos respectivos grupos. Quanto aos linfócitos, notaram-se frequentes oscilações tanto em aves do G1 quanto naquelas do G2. As contagens leucocitárias de G1 e G2 mostrando leucócitos totais, heterófilos e linfócitos estão evidenciadas na Figura 5. Apenas no G1 foram verificadas oscilações significativas nas contagens de monócitos, basófilos e eosinófilos, porém, oscilações amenas. As contagens das aves de G3 e G4 permaneceram normais para a espécie.

Tabela 4. Médias das contagens de leucócitos, linfócitos, heterófilos, monócitos, basófilos e eosinófilos de aves de postura de uma variedade vermelha experimentalmente infectadas por *S. Gallinarum* NaI^r, $\Delta cobS$ e $\Delta cobS\Delta cbiA$.

Variável	Colheitas	Grupos				CV %	
		1	2	3	4		
Leucócitos/μL (x 10³)	Val. Referência	1 DAI	21,9 ^c	18,6 ^b	18,7	18,8	14,4
	1 DPI	19,3 ^{dc}	17,9 ^b	17,6	20,1	20,4	
	3 DPI	15,0 ^{dcBC}	12,6 ^{cc}	20,4 ^{AB}	24,2 ^A	21,4	
	5 DPI	11,0 ^{dC}	37,1 ^{aA}	19,8 ^B	17,9 ^{BC}	25,2	
	7 DPI	33,6 ^{bA}	22,3 ^{abB}	20,7 ^B	19,9 ^B	18,0	
	10 DPI	44,1 ^{aA}	19,0 ^{bb}	21,8 ^B	21,3 ^B	18,9	
	15 DPI	-	-	18,4	18,8	14,3	
	CV (%)	%	17,8	20,0	17,9	17,7	
Linfócitos/μL (x 10³)	Val. Referência	1 DAI	11,9 ^b	11,0 ^a	10,33	9,91	16,9
	1 DPI	8,72 ^b	9,36 ^a	9,36	10,30	19,0	
	3 DPI	7,36 ^{cb}	5,47 ^{bB}	9,80 ^{AB}	13,13 ^A	17,9	
	5 DPI	8,24 ^{bcB}	9,44 ^{aA}	9,97 ^A	9,26 ^A	26,0	
	7 DPI	11,8 ^b	7,37 ^b	10,15	11,66	23,7	
	10 DPI	19,8 ^{aA}	7,98 ^{abC}	12,59 ^B	11,75 ^B	17,1	
	15 DPI	*	*	10,19	10,53	19,4	
	CV (%)	%	16,1	20,5	18,3	24,4	
Heterófilos/μL (x 10³)	Val. Referência	1 DAI	8,80 ^b	6,91 ^b	6,97	7,62	19,7
	1 DPI	8,90 ^b	6,92 ^b	7,35	8,32	23,3	
	3 DPI	6,78 ^{bbAB}	6,11 ^{bb}	9,85 ^A	9,87 ^A	18,6	
	5 DPI	7,03 ^{bb}	26,4 ^{aA}	9,63 ^B	7,62 ^B	25,6	
	7 DPI	19,1 ^{aA}	13,3 ^{bb}	9,19 ^{BC}	7,15 ^C	22,4	
	10 DPI	19,9 ^{aA}	9,69 ^{bb}	8,14 ^B	8,58 ^B	19,9	
	15 DPI	*	*	7,59	7,25	22,6	
	CV (%)	%	17,2	24,2	16,8	22,0	
Monócitos/μL (x 10³)	Val. Referência	1 DAI	0,66 ^a	0,39	0,77	0,65	16,3
	1 DPI	0,32 ^{bc}	0,45	0,85	0,80	25,9	
	3 DPI	0,41 ^b	0,51	0,95	0,78	24,5	
	5 DPI	0,27 ^{bcB}	0,36 ^{AB}	0,51 ^A	0,56 ^A	22,5	
	7 DPI	0,19 ^{cA}	0,53 ^B	0,60 ^B	0,66 ^B	22,0	
	10 DPI	0,26 ^{bcA}	0,46 ^B	0,70 ^B	0,54 ^B	20,7	
	15 DPI	*	*	0,59	0,61	28,9	
	CV (%)	%	32,4	39,6	29,4	27,7	
Basófilos/μL (x 10³)	Val. Referência	1 DAI	0,29 ^b	0,21	0,34	0,38	24,7
	1 DPI	0,34 ^{abA}	0,38 ^A	0,19 ^B	0,28 ^{AB}	19,0	
	3 DPI	0,18 ^{bb}	0,31 ^{AB}	0,46 ^A	0,34 ^A	27,3	
	5 DPI	0,27 ^b	0,20 ^B	0,24 ^A	0,22 ^A	29,2	
	7 DPI	0,40 ^{aA}	0,36 ^A	0,19 ^B	0,23 ^B	15,6	
	10 DPI	0,39 ^{aA}	0,29 ^B	0,23 ^B	0,24 ^B	22,9	
	15 DPI	*	*	0,31	0,27	28,8	
	CV (%)	%	23,5	21,5	31,2	23,9	
Eosinófilos/μL (x 10³)	Val. Referência	1 DAI	0,28 ^{bb}	0,23 ^B	0,27 ^A	0,22 ^A	20,2
	1 DPI	0,34 ^{ab}	0,32	0,24	0,32	15,2	
	3 DPI	0,25 ^b	0,23	0,31	0,28	27,5	
	5 DPI	0,36 ^{abB}	0,45 ^A	0,43 ^{AB}	0,27 ^B	13,6	
	7 DPI	0,49 ^a	0,35	0,59	0,69	23,8	
	10 DPI	0,46 ^{aA}	0,38 ^B	0,47 ^B	0,43 ^B	24,5	
	15 DPI	*	*	0,34	0,57	24,3	
	CV (%)	%	26,8	27,4	32,9	17,8	

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

1=Grupo desafiado oralmente com cultura de SGNal^r $\Delta cobS$; 2=Grupo desafiado com cultura de SGNal^r; 3=Grupo desafiado com cultura de SGNal^r $\Delta cobS\Delta cbiA$; 4=Grupo não desafiado (controle).

*= Grupos 1 e 2 – Ausência de aves; CV= Coeficiente de variação; DAI= dia antes da inoculação; DPI= dias após a inoculação; Val.= Valores

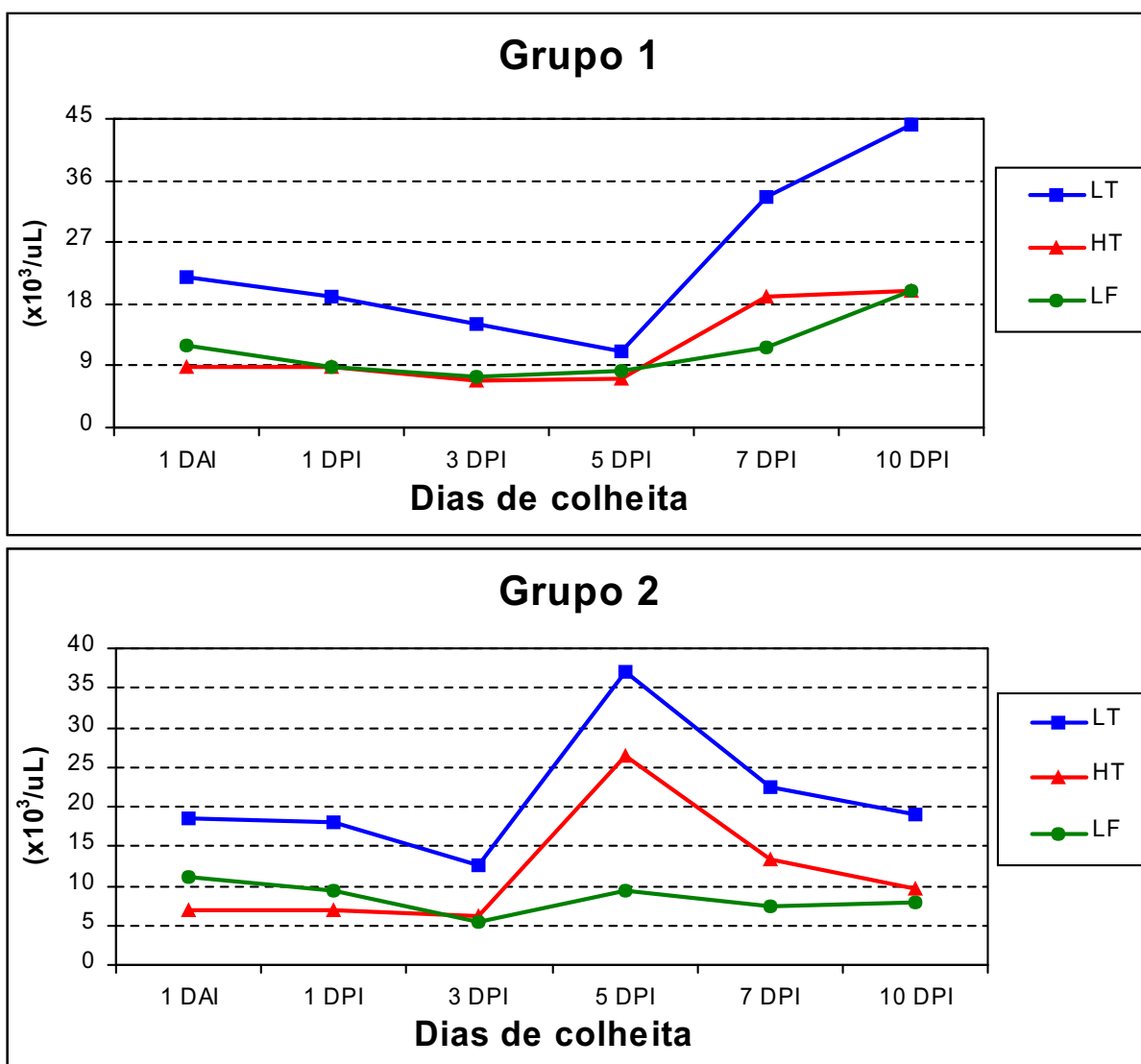


Figura 5. Número médio de leucócitos (LT), heterófilos (HT) e linfócitos (LF) do grupo de aves inoculadas com a cepa SGNal^r Δ *cobS* (Grupo 1) e do grupo de aves inoculadas com a cepa SGNal^r (Grupo 2) 24 horas antes (1 DAI) e após a infecção (1 DPI) e três (3 DPI), cinco (5 DPI), sete (7 DPI) e dez (10 DPI) dias após a infecção.

5.3 Perfil bioquímico sérico

Os dados apresentados nas Tabelas 5 e 6 mostram que as principais alterações nos parâmetros bioquímicos séricos ocorreram nas aves de G1 e G2, com destaque para a considerável diminuição nos teores séricos de albumina, triglicerídeos e colesterol a partir do sétimo DPI, dia em que a concentração sérica de colesterol diminuiu pela metade; as alterações dos teores de triglicerídeos foram ainda mais acentuadas, com valores reduzidos a um quarto em relação ao DAI. Expressivas alterações também ocorreram em aves de G1 e G2, nos teores séricos de magnésio e cálcio e das atividades das enzimas gamaglutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST), porém, com aumento das concentrações séricas no decorrer da infecção. Outros parâmetros bioquímicos como ácido úrico, creatinina e fosfatase alcalina também tiveram alterações significativas, com constantes oscilações ao longo do período experimental.

Quanto às aves do G3, os parâmetros que mostraram alterações significativas foram cálcio, ácido úrico e colesterol, com diminuição gradativa da concentração sérica de ácido úrico a partir do décimo DPI e oscilações nas concentrações séricas de cálcio e colesterol no decorrer do estudo. Os demais parâmetros mantiveram-se dentro da normalidade à semelhança do verificado no G4.

Tabela 5. Médias dos teores séricos de albumina, magnésio, cálcio, fósforo e ácido úrico de aves de postura de uma variedade vermelha experimentalmente infectadas por *S. Gallinarum* NaI^f, $\Delta cobS$ e $\Delta cobS\Delta cbiA$.

Variável	Momento	Grupos				CV %	
		1	2	3	4		
Albumina (g/dL)	Val. Referência	1 DAI	1,76 ^a	1,72 ^{ab}	1,51	1,96	29,2
		1 DPI	1,87 ^a	2,09 ^a	1,72	1,95	21,3
		3 DPI	1,94 ^{ab}	2,21 ^{abc}	1,70	1,70	25,7
		5 DPI	2,37 ^{aA}	1,31 ^{abcB}	1,60 ^{AB}	1,73 ^{AB}	23,2
		7 DPI	1,18 ^{abB}	1,11 ^{bcB}	1,54 ^{AB}	1,65 ^A	25,5
		10 DPI	0,91 ^{bBC}	0,74 ^{cC}	1,51 ^{AB}	1,72 ^A	18,9
		15 DPI	-	-	1,80	1,76	21,8
		CV (%)		20,9	22,7	29,2	17,5
Magnésio (mg/dL)	Val. Referência	1 DAI	1,99 ^b	2,02 ^b	2,18	1,97	15,6
		1 DPI	2,90 ^{ab}	2,07 ^b	2,08	2,29	35,4
		3 DPI	1,84 ^b	2,18 ^b	1,98	2,19	27,6
		5 DPI	2,16 ^b	1,84 ^b	1,53	2,24	30,8
		7 DPI	1,99 ^b	1,97 ^b	2,05	2,41	30,7
		10 DPI	3,80 ^{aA}	3,19 ^{aA}	1,87 ^B	2,07 ^B	21,5
		15 DPI	-	-	1,83	1,95	16,6
		CV (%)		25,8	30,1	28,9	24,6
Cálcio (mg/dL)	Val. Referência	1 DAI	9,67 ^{bc}	10,2	9,01 ^{bc}	9,59	21,5
		1 DPI	8,61 ^{cB}	10,8 ^{AB}	13,2 ^{aA}	9,56 ^A	24,6
		3 DPI	11,7 ^{abA}	11,3 ^A	12,2 ^{abA}	8,58 ^B	8,80
		5 DPI	12,6 ^{abA}	11,7 ^{AB}	8,13 ^{cC}	9,28 ^B	15,1
		7 DPI	12,5 ^{abA}	12,3 ^A	9,72 ^{bcB}	9,83 ^B	14,4
		10 DPI	13,4 ^{aA}	12,1 ^{AB}	8,33 ^{cB}	9,57 ^{AB}	20,0
		15 DPI	-	-	7,51 ^c	8,33	23,5
		CV (%)		25,2	16,1	12,4	17,8
Fósforo (mg/dL)	Val. Referência	1 DAI	5,65 ^{dB}	6,35 ^{AB}	6,73 ^A	7,11 ^A	17,5
		1 DPI	7,84 ^{ab}	7,61	7,72	7,73	27,5
		3 DPI	6,26 ^b	5,82	6,00	6,13	22,1
		5 DPI	6,43 ^b	5,87	7,08	7,47	29,5
		7 DPI	8,01 ^a	6,29	7,13	7,26	25,9
		10 DPI	5,49 ^{bB}	7,06 ^A	5,90 ^B	8,06 ^A	23,2
		15 DPI	*	*	6,90	6,91	26,8
		CV (%)		26,0	27,6	24,5	27,9
Ácido Úrico (mg/dL)	Val. Referência	1 DAI	8,70 ^a	6,74 ^a	8,20 ^a	6,55	23,9
		1 DPI	7,42 ^{ab}	7,19 ^a	7,53 ^a	6,56	24,6
		3 DPI	6,16 ^{ab}	7,43 ^a	6,30 ^{abc}	7,25	23,4
		5 DPI	5,95 ^{abAB}	4,96 ^{bB}	7,02 ^{abA}	6,50 ^B	21,0
		7 DPI	6,65 ^{ab}	5,94 ^b	6,69 ^{ab}	6,88	30,3
		10 DPI	4,85 ^{bB}	6,61 ^{abA}	4,50 ^{cB}	7,72 ^A	24,1
		15 DPI	*	*	5,45 ^{bcA}	6,48 ^B	16,4
		CV (%)		28,8	34,6	23,1	28,9

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

1=Grupo desafiado oralmente com cultura de SGNal^f $\Delta cobS$; 2=Grupo desafiado com cultura de SGNal^f; 3=Grupo desafiado com cultura de SGNal^f $\Delta cobS\Delta cbiA$; 4=Grupo não desafiado (controle).

*= Grupos 1 e 2 – Ausência de aves; CV= Coeficiente de variação; DAI= dia antes da inoculação; DPI= dias após a inoculação; Val.= Valores

Tabela 6. Médias dos teores séricos de colesterol, triglicerídeos e creatinina e das atividades de fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) de aves de postura de uma variedade vermelha experimentalmente infectadas por *S. Gallinarum* NaI^r, Δ cobS e Δ cobS Δ cbiA.

Variável	Colheitas	Grupos				CV %
		1	2	3	4	
Val. Referência	1 DAI	348 ^a	360 ^a	366 ^{ab}	360	20,2
	1 DPI	296 ^{aA}	230 ^{abB}	328 ^{abcA}	302 ^A	18,1
	3 DPI	178 ^{bB}	173 ^{bB}	280 ^{bcA}	307 ^A	23,8
	5 DPI	172 ^{bB}	241 ^{abAB}	274 ^{bcA}	321 ^A	32,4
	7 DPI	145 ^{bB}	150 ^{bB}	401 ^{aA}	316 ^A	26,1
	10 DPI	145 ^{bB}	164 ^{bB}	233 ^{cAB}	320 ^A	20,8
	15 DPI	*	*	286 ^{bc}	289	18,1
	CV (%)	%	28,2	30,8	25,5	19,5
Val. Referência	1 DAI	179 ^a	169 ^{ab}	188	149 ^{ab}	17,8
	1 DPI	138 ^{abB}	194 ^{aA}	196 ^A	169 ^{abAB}	25,6
	3 DPI	96,8 ^{bcB}	91,7 ^{bcB}	170 ^A	189 ^{aA}	20,1
	5 DPI	71,2 ^{cB}	72 ^{cB}	141 ^A	146 ^{bA}	12,8
	7 DPI	64,6 ^{cB}	52,4 ^{cB}	139 ^A	153 ^{abA}	26,6
	10 DPI	46,8 ^{cB}	40,8 ^{cB}	153 ^A	163 ^{abA}	20,4
	15 DPI	-	-	177	131 ^b	17,7
	CV (%)	%	28,6	16,6	12,9	18,3
Val. Referência	1 DAI	0,22	0,19	0,26	0,23	17,2
	1 DPI	0,31 ^A	0,23 ^B	0,20 ^B	0,26 ^{AB}	31,9
	3 DPI	0,26	0,27	0,24	0,24	13,1
	5 DPI	0,25	0,29	0,29	0,29	19,5
	7 DPI	0,24	0,25	0,26	0,30	14,6
	10 DPI	0,26	0,20	0,27	0,23	17,3
	15 DPI	*	*	0,27	0,22	10,4
	CV (%)	%	14,9	17,7	15,2	18,8
Val. Referência	1 DAI	3.532 ^{ab}	3.615 ^{ab}	3.685	4.643	34,2
	1 DPI	5.183 ^{aA}	5.130 ^{aA}	3.562 ^B	3.694 ^B	26,3
	3 DPI	2.280 ^{bB}	2.894 ^{bAB}	3.547 ^A	3.449 ^A	29,1
	5 DPI	4.884 ^{aA}	3.867 ^{abAB}	3.387 ^B	3.356 ^B	31,4
	7 DPI	3.891 ^{abA}	4.066 ^{abA}	3.062 ^B	3.478 ^B	25,3
	10 DPI	2.076 ^{bB}	3.200 ^{bAB}	2.900 ^{AB}	3.524 ^A	29,2
	15 DPI	*	*	3.739	2.997 ^B	17,9
	CV (%)	%	26,9	27,2	18,4	22,4
Val. Referência	1 DAI	8,18 ^b	7,65 ^b	8,50	7,37	26,5
	1 DPI	7,65 ^{bB}	8,41 ^{bAB}	6,88 ^B	9,18 ^A	33,1
	3 DPI	13,0 ^{abA}	9,18 ^{bB}	7,65 ^B	9,94 ^B	24,1
	5 DPI	13,0 ^{abAB}	16,1 ^{abA}	8,88 ^B	7,58 ^B	28,8
	7 DPI	13,8 ^{aA}	13,0 ^{abA}	10,7 ^B	9,94 ^B	25,9
	10 DPI	18,4 ^{aAB}	22,9 ^{aA}	9,88 ^C	9,94 ^C	32,9
	15 DPI	*	*	9,94	7,65	30,6
	CV (%)	%	17,3	23,9	27,5	30,8
Val. Referência	1 DAI	214 ^c	197 ^c	209	218	33,8
	1 DPI	177 ^{cB}	193 ^c	222 ^{AB}	282 ^A	27,8
	3 DPI	281 ^b	224 ^{bc}	224	232	18,7
	5 DPI	302 ^b	272 ^{bB}	247	261	18,6
	7 DPI	466 ^{aA}	388 ^{ab}	205 ^C	280 ^C	23,0
	10 DPI	252 ^{bcB}	399 ^{aA}	236 ^B	256 ^B	18,3
	15 DPI	*	*	221	209	27,6
	CV (%)	%	18,7	25,1	25,1	23,3

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

1=Grupo desafiado oralmente com cultura de SGNal^r Δ cobS; 2=Grupo desafiado com cultura de SGNal^r; 3=Grupo desafiado com cultura de SGNal^r Δ cobS Δ cbiA; 4=Grupo não desafiado (controle).

*= Grupos 1 e 2 – Ausência de aves; CV= Coeficiente de variação; DAI= dia antes da inoculação; DPI= dias após a inoculação; Val.= Valores

Nos traçados densitométricos das amostras de soro sanguíneo dos grupos experimentais, em eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram constatadas 28 proteínas, cujos pesos moleculares (PM) variaram de 222.000 a 16.000 dáltons (Da). Na Tabela 13 são apresentadas as nove proteínas consideradas mais relevantes ao estudo, ou seja, IgA (PM= 177.000 Da), proteína de 99.000 Da, proteína de 90.000 Da, transferrina (PM= 81.500 Da), albumina (PM= 63.000 Da), IgG de cadeia pesada (PM= 57.000 Da), haptoglobina (PM= 45.000 Da), IgG de cadeia leve (PM= 26500 Da) e proteína de 23.000 Da.

Nas aves de G1 e G2 as alterações das frações protéicas foram mais evidenciadas pela diminuição dos teores séricos de IgA, albumina, IgG de cadeia leve e proteína de peso molecular 23.000 Da, e pela elevação dos teores séricos de transferrina, haptoglobina e, particularmente, da proteína de peso molecular 90.000 Da, cujo valor aumentou em até, aproximadamente, 30 vezes no quinto DPI, no G1, quando comparado com o DAI. A cinética das imunoglobulinas IGA e IgG e das proteínas de fase aguda haptoglobina, proteínas de 99.000 e 90.000 Da e de transferrina, são apresentadas nas Figuras 6 e 7.

No G3, algumas alterações significativas foram observadas durante o estudo, como diminuição gradativa das concentrações de transferrina e oscilações nos valores de IgG de cadeia leve, com diminuição no segundo DPI, e retorno aos valores basais a partir do quinto DPI (Figura 7).

Tabela 7. Média e desvio-padrão dos teores séricos de proteína total (g/dL) e de nove frações protéicas (mg/dL) obtidas por fracionamento em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de aves de postura experimentalmente infectadas por *S. Gallinarum* Na^f, Δ *cobS* e Δ *cobS* Δ *cblA*.

Proteínas	1 DAI	1 DPI	3 DPI	5 DPI	7 DPI	10 DPI	15 DPI
Proteína total	V. Ref.						
G1	3,2±0,5 ^b	3,8±0,5 ^b	3,5±0,9 ^b	5,2±1,3 ^{aA}	3,0±0,9 ^b	3,9±1,0 ^{abA}	*
G2	3,6±0,7 ^{ab}	4,3±0,7 ^a	4,0±0,9 ^a	2,8±1,2 ^{abB}	3,1±0,8 ^{ab}	1,9±0,7 ^{bb}	*
G3	3,6±0,5 ^{ab}	3,8±0,5 ^a	3,4±0,6 ^{ab}	3,2±1,05 ^{abB}	2,9±0,7 ^b	3,0±0,4 ^{abA}	3,2±0,8 ^{ab}
G4	3,6±0,2 ^{ab}	3,9±0,3 ^a	3,9±0,7 ^a	4,0±0,8 ^{aAB}	3,7±0,8 ^{abc}	3,1±0,7 ^{bA}	3,0±0,5 ^b
IgA	V. Ref.						
G1	51,3±9,60 ^b	56,5±15,3 ^{abB}	61,4±18,9 ^{abAB}	64,2±14,9 ^{aA}	39,8±16,8 ^{cb}	31,6±17,5 ^{cb}	*
G2	49,2±10,2 ^b	63,5±12,5 ^{aA}	58,2±14,9 ^{abA}	42,7±17,9 ^{bb}	48,9±18,0 ^{bb}	26,1±9,3 ^{cc}	*
G3	49,6±9,96	59,9±14,6 ^{AB}	52,4±15,5 ^B	52,8±19,9 ^{AB}	45,9±14,2 ^B	54,0±12,3 ^{AB}	51,1±18,5
G4	60,2±13,1	61,2±17,9 ^A	68,2±24,6 ^A	55,4±16,2 ^B	49,2±19,1 ^A	63,3±16,6 ^A	62,1±11,6
99.000 Da	V. Ref.						
G1	31,8±14,8 ^d	59,3±20,5 ^{bcB}	57,6±22,4 ^{cdAB}	146±49,3 ^{aA}	92,3±41,6 ^{bA}	46,5±18,3 ^{cdAB}	*
G2	39,1±15,1 ^c	83,5±30,0 ^{aA}	87,3±28,8 ^{aA}	94,6±32,8 ^{ab}	78,4±22,6 ^{abA}	53,3±17,8 ^{bcA}	*
G3	39,6±15,7 ^b	55,1±23,3 ^{ab}	48,7±19,6 ^{abB}	44,6±17,9 ^{abC}	37,4±12,1 ^{bb}	37,8±12,6 ^{bb}	38,4±14,5 ^b
G4	39,1±13,7	49,9±18,4 ^B	50,8±25,8 ^B	48,2±18,9 ^C	55,5±20,4 ^B	49,7±20,1 ^{AB}	37,4±8,43
90.000 Da	V. Ref.						
G1	6,76±1,08 ^e	14,4±7,5 ^{eB}	31,4±15,2 ^{dA}	214±42,3 ^{aA}	122±35,8 ^{bA}	72,3±18,8 ^{cA}	*
G2	7,32±2,41 ^c	47,6±17,3 ^{bcA}	47,3±17,7 ^{bcA}	150±38,3 ^{ab}	100±32,7 ^{abA}	64,0±22,6 ^{bA}	*
G3	7,45±0,59	13,3±8,4 ^B	12,9±5,7 ^B	11,5±7,7 ^C	8,48±4,24 ^B	9,27±0,65 ^B	11,7±5,1
G4	8,03±3,86	11,6±6,3 ^B	9,80±3,5 ^B	10,8±8,54 ^C	11,2±5,77 ^B	10,7±5,36 ^B	8,29±2,76
Transferrina	V. Ref.						
G1	198±25,2 ^d	235±38,9 ^{cdB}	192±28,4 ^{dB}	829±130,4 ^{aA}	593±119,8 ^{bA}	308±54,0 ^{cAB}	*
G2	259±35,0 ^b	417±70,7 ^{abA}	330±63,1 ^{abA}	562±80,1 ^{ab}	504±94,8 ^{aA}	486±42,6 ^{abA}	*
G3	212±49,1 ^a	246±48,5 ^{ab}	149±29,7 ^{bb}	121±28,2 ^{bc}	108±20,5 ^{bc}	94,2±16,7 ^{bc}	117±19,9 ^{bb}
G4	238±30,1	232±29,1 ^B	193±33,1 ^B	235±40,5 ^C	273±38,9 ^{BC}	269±44,1 ^{BC}	240±26,8 ^A
Albumina	V. Ref.						
G1	1,7±0,3 ^{bc}	1,9±0,3 ^{abAB}	1,9±0,6 ^{abAB}	2,5±0,7 ^{aA}	1,2±0,4 ^{bcB}	0,85±0,3 ^{cc}	*
G2	1,8±0,4 ^{ab}	2,3±0,4 ^{aA}	2,3±0,5 ^{aA}	1,2±0,5 ^{cb}	1,5±0,4 ^{bcB}	0,77±0,7 ^{cb}	*
G3	1,9±0,3	1,8±0,2 ^B	1,8±0,4 ^B	1,9±0,6 ^{AB}	2,0±0,4 ^A	1,8±0,2 ^A	1,8±0,5
G4	2,0±0,2	2,1±0,2 ^{AB}	2,3±0,4 ^A	2,4±0,5 ^A	2,3±0,5 ^A	2,0±0,4 ^A	1,9±0,4
IgG P	V. Ref.						
G1	82,0±15,9 ^a	86,5±15,4 ^a	80,6±26,7 ^a	88,2±21,5 ^{aA}	106±25,8 ^{aA}	44,7±17,6 ^{bb}	*
G2	73,1±13,0 ^a	71,5±18,9 ^a	77,4±18,5 ^a	49,3±14,9 ^{bbB}	86,0±22,4 ^{abB}	80,7±12,8 ^{aA}	*
G3	74,7±18,1	66,4±14,3	88,9±20,5	75,9±17,8 ^B	86,4±19,8 ^B	78,9±12,5 ^B	71,8±16,0
G4	80,9±20,7	83,5±27,7	89,3±31,0	89,4±22,1 ^A	102±20,1 ^A	90,4±21,9 ^A	85,6±13,1
Haptoglobina	V. Ref.						
G1	21,7±7,08 ^c	31,0±9,07 ^{bc}	22,2±8,66 ^c	82,2±19,5 ^{aA}	58,0±21,2 ^{abA}	36,7±19,7 ^{bcB}	*
G2	22,1±10,7 ^c	30,2±8,87 ^{bc}	24,0±7,60 ^c	48,2±16,6 ^{bb}	57,1±15,7 ^{bA}	76,0±12,6 ^{aA}	*
G3	22,7±8,77 ^a	29,8±8,43 ^a	26,8±9,8 ^{ab}	19,0±8,15 ^{abC}	12,9±4,52 ^{bb}	14,1±6,53 ^{bc}	16,1±9,73 ^{ab}
G4	19,1±11,2	17,1±7,67	19,2±8,39	14,8±7,81 ^C	14,7±6,26 ^B	13,7±5,7 ^C	11,6±9,25
IgG L	V. Ref.						
G1	85,7±23,4 ^a	52,7±20,0 ^{abB}	31,1±16,3 ^{bcB}	42,3±17,6 ^{bcB}	28,0±8,6 ^{cb}	37,7±7,1 ^{bcB}	*
G2	93,6±28,4 ^a	53,8±24,2 ^{abB}	48,5±12,7 ^{bcB}	16,9±9,1 ^{cdC}	30,5±9,0 ^{bcB}	5,98±2,2 ^{dC}	*
G3	84,6±18,6 ^a	45,7±18,4 ^{bb}	31,4±13,5 ^{bb}	53,8±16,6 ^{abB}	88,8±11,7 ^{aA}	91,9±7,74 ^{aA}	85,0±6,59 ^a
G4	93,7±22,4	108±27,2 ^A	95,8±20,2 ^A	82,7±9,8 ^A	104±14,3 ^A	96,7±8,65 ^A	86,5±7,1
23.000 Da	V. Ref.						
G1	887±67,9 ^{aA}	835±83,0 ^{aA}	762±77,3 ^{aA}	744±67,4 ^{aA}	464±76,7 ^{bb}	260±43,1 ^{cb}	*
G2	722±68,2 ^{ab}	655±94,5 ^{ab}	590±51,2 ^{ab}	244±46,1 ^{cb}	371±53,2 ^{bb}	230±42,6 ^{cb}	*
G3	791±105 ^{aA}	759±78,1 ^{aA}	775±75,6 ^{abA}	708±104 ^{abA}	619±55,8 ^{bA}	690±69,4 ^{bA}	691±78,5 ^b
G4	786±51,4 ^B	729±80,7 ^{AB}	613±63,4 ^B	701±92,7 ^A	694±87,5 ^A	674±40,1 ^A	649±71,3

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas ou por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

1=Grupo desafiado oralmente com cultura de SGNal Δ *cobS*; 2=Grupo desafiado com cultura de SGNal^f; 3=Grupo desafiado com cultura de SGNal Δ *cobS* Δ *cblA*; 4=Grupo não desafiado (controle); *= Grupos 1 e 2 – Ausência de aves; DAI= dia antes da inoculação; DPI= dias após a inoculação; V. Ref.= Valores de referência; IgG P=IgG de cadeia pesada; IgG L= IgG de cadeia leve

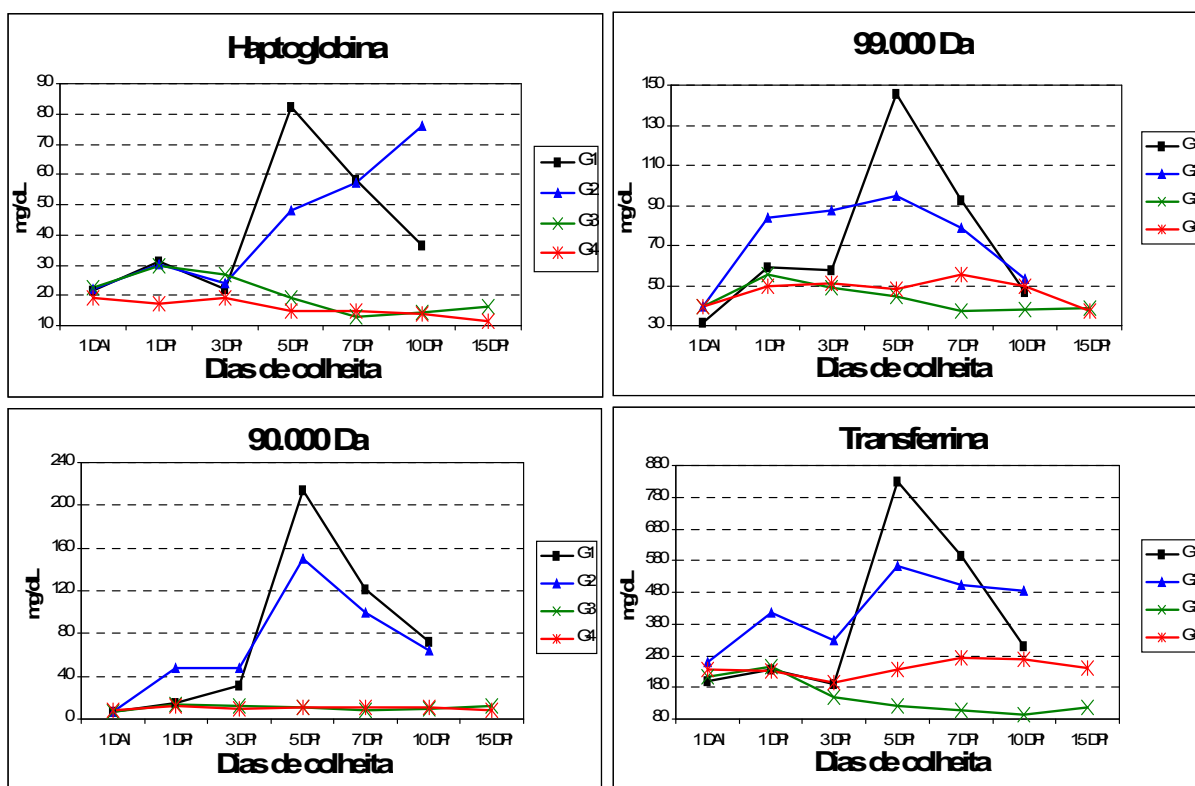


Figura 6. Concentração sérica média de haptoglobina, das proteínas de 90.000 e 99.000Da e de transferrina em aves de postura de uma variedade vermelha experimentalmente infectadas por $SGNaI^{\Delta cobS}$ (G1), $SGNaI^r$ (G2), $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ (G3) e das aves do grupo controle (G4) 24 horas antes (1 DAI) e após a infecção (1 DPI) e três (3 DPI), cinco (5 DPI), sete (7 DPI), dez (10 DPI) e quinze (15 DPI) dias após a infecção.

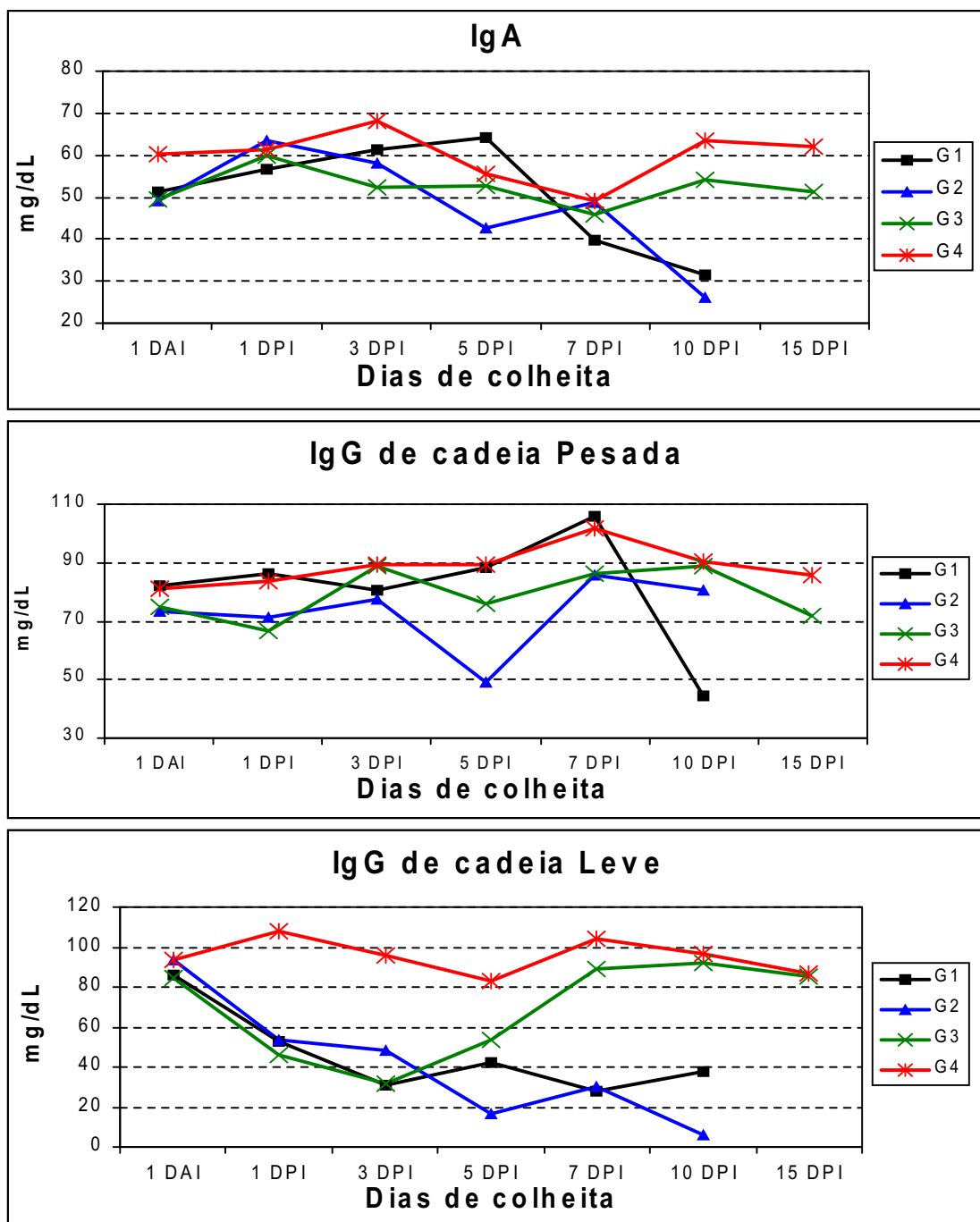


Figura 7. Concentração sérica média de IgA e IgG de cadeias pesada e leve em aves de postura de uma variedade vermelha experimentalmente infectadas por *SGNaI^rΔcobS* (G1), *SGNaI^r* (G2), *SGΔcobSΔcbiA* (G3) e das aves do grupo controle (G4) 24 horas antes (1 DAI) e após a infecção (1 DPI) e três (3 DPI), cinco (5 DPI), sete (7 DPI), dez (10 DPI) e quinze (15 DPI) dias após a infecção.

5.4 Exame bacteriológico

Das aves submetidas aos exames hematológico e histopatológico, ou seja, cinco aves de cada grupo, também foram obtidos suabes de fígado com intuito de ter um controle individual da presença de bactéria nesse órgão. Os resultados obtidos no exame desses suabes de fígado são apresentados na Tabela 2. A partir do terceiro dia após a inoculação (DPI) todas as aves do G1 foram positivas, ou seja, apresentavam bactéria no fígado. As aves do G2, com exceção de duas delas no sétimo DPI, também apresentaram positividade a partir do terceiro DPI. Nos suabes obtidos em aves do G3, com exceção de uma delas no quinto DPI, os resultados foram negativos, o mesmo ocorreu no G4 (controle).

Tabela 8. Resultados dos exames de suabes obtidos do fígado de aves de postura de uma variedade vermelha expostas à infecção experimental por $SGNaI^{\Delta cobS}$, $SGNaI^{\Delta}$ e $SGNaI^{\Delta cobS\Delta cbiA}$.

Aves	Colheitas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	1 DAI	-	-	-	-
2	1 DAI	-	-	-	-
3	1 DAI	-	-	-	-
4	1 DAI	-	-	-	-
5	1 DAI	-	-	-	-
1	1 DPI	-	-	-	-
2	1 DPI	-	-	-	-
3	1 DPI	-	-	-	-
4	1 DPI	-	-	-	-
5	1 DPI	-	-	-	-
1	3 DPI	+	+	-	-
2	3 DPI	+	+	-	-
3	3 DPI	+	+	-	-
4	3 DPI	+	+	-	-
5	3 DPI	+	+	-	-
1	5 DPI	+	+	+	-
2	5 DPI	+	+	-	-
3	5 DPI	+	+	-	-
4	5 DPI	+	+	-	-
5	5 DPI	+	+	-	-
1	7 DPI	+	+	-	-
2	7 DPI	+	+	-	-
3	7 DPI	+	-	-	-
4	7 DPI	+	+	-	-
5	7 DPI	+	-	-	-
1	10 DPI	+	+	-	-
2	10 DPI	*	+	-	-
3	10 DPI	*	+	-	-
4	10 DPI	*	+	-	-
5	10 DPI	*	+	-	-
1	15 DPI	*	*	-	-
2	15 DPI	*	*	-	-
3	15 DPI	*	*	-	-
4	15 DPI	*	*	-	-
5	15 DPI	*	*	-	-

1=Grupo desafiado oralmente com cultura de $SGNaI^{\Delta cobS}$; 2=Grupo desafiado com cultura de $SGNaI^{\Delta}$; 3=Grupo desafiado com cultura de $SGNaI^{\Delta cobS\Delta cbiA}$; 4=Grupo não desafiado (controle).

*Grupos 1 e 2 = Ausência de aves; DAI = dia antes da inoculação; DPI = dias após a inoculação;

+ = Positivo

- = Negativo

5.5 Exame macroscópico

As aves eram submetidas ao exame macroscópico para observação de possíveis lesões. A partir do terceiro DPI, os órgãos de aves de G1 e G2 apresentavam alterações principalmente no fígado, onde se observou alteração de coloração, com presença de pontos necróticos esbranquiçados espalhados por todo órgão, além do aumento de tamanho. As alterações mais evidentes foram encontradas no quinto e sétimo DPI, e as evidências macroscópicas mais relevantes foram observadas no fígado, baço e bursa de Fabricius, cujos detalhes são apresentados nas Figuras 8 a 11. Não foram observadas alterações macroscópicas em aves de G3 e G4.



Figura 8. Aspecto macroscópico de aves no quinto dia após a infecção. À esquerda, uma ave do G3 apresentando fígado normal, sendo comparada com ave do G1, à direita, mostrando fígado com coloração alterada e aumento de tamanho.

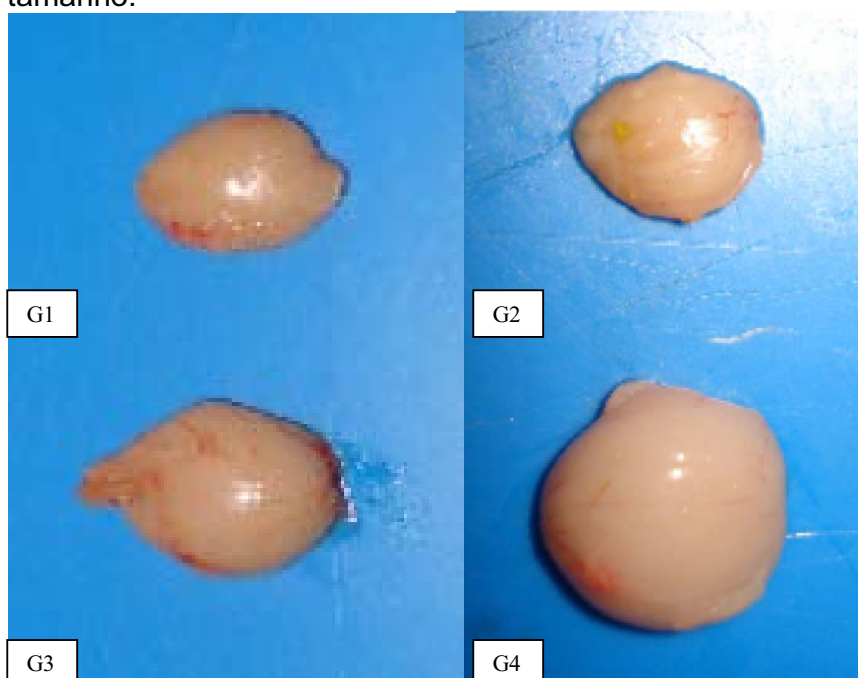


Figura 9. Aspecto macroscópico de bursa de Fabricius de aves no sétimo dia após a infecção mostrando atrofia do órgão em aves de G1 e G2, quando comparado a aves de G3 e G4.

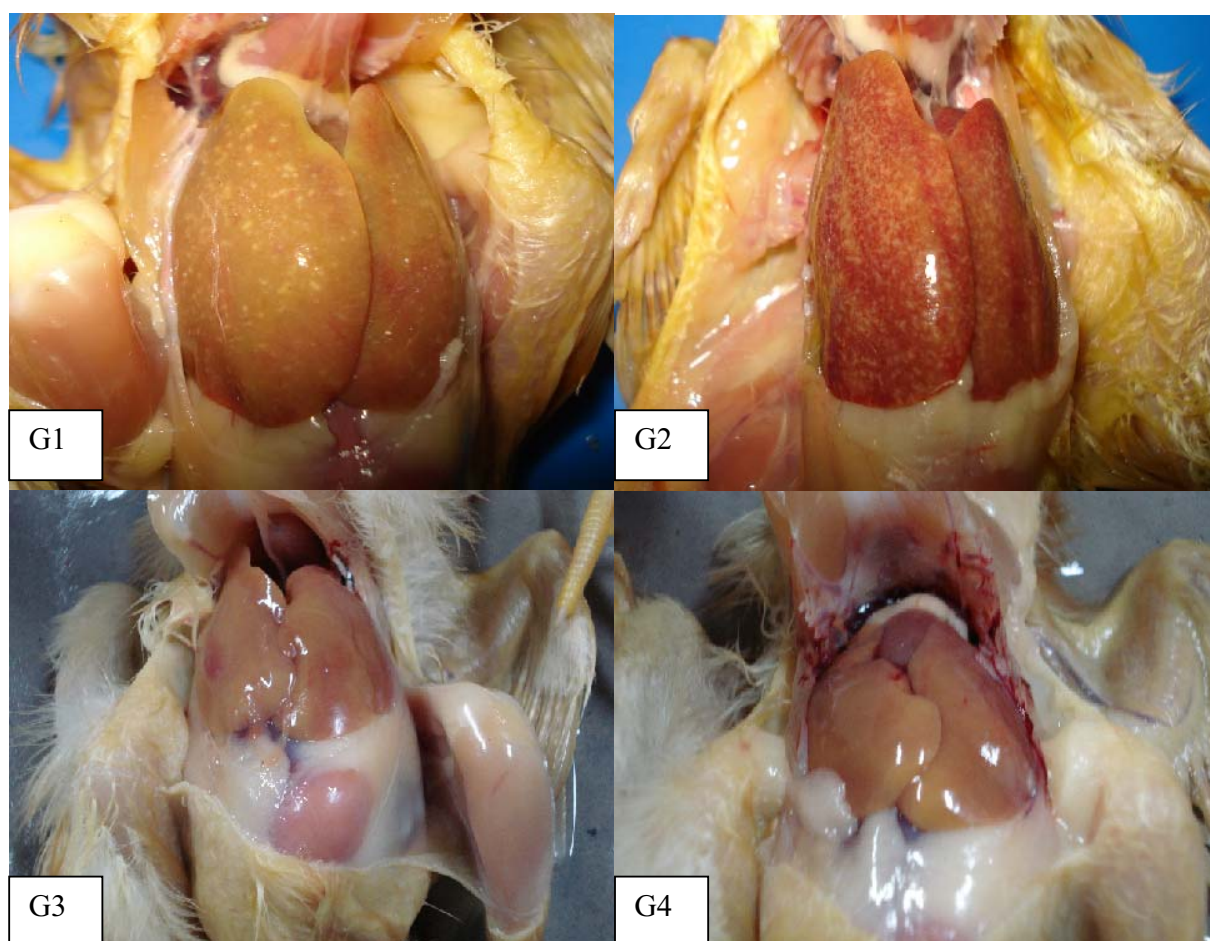


Figura 10. Aspecto macroscópico das aves no sétimo dia após a infecção evidenciando o fígado. No G1, o órgão apresenta-se com aumento de tamanho, coloração amarelo-esverdeada e pontos necróticos esbranquiçados espalhados por todo parênquima e no G2 está, da mesma forma, aumentado, com pontos necróticos, porém a coloração é marrom ou bronzeada. Nas aves de G3 e G4, o órgão encontra-se sem alterações.

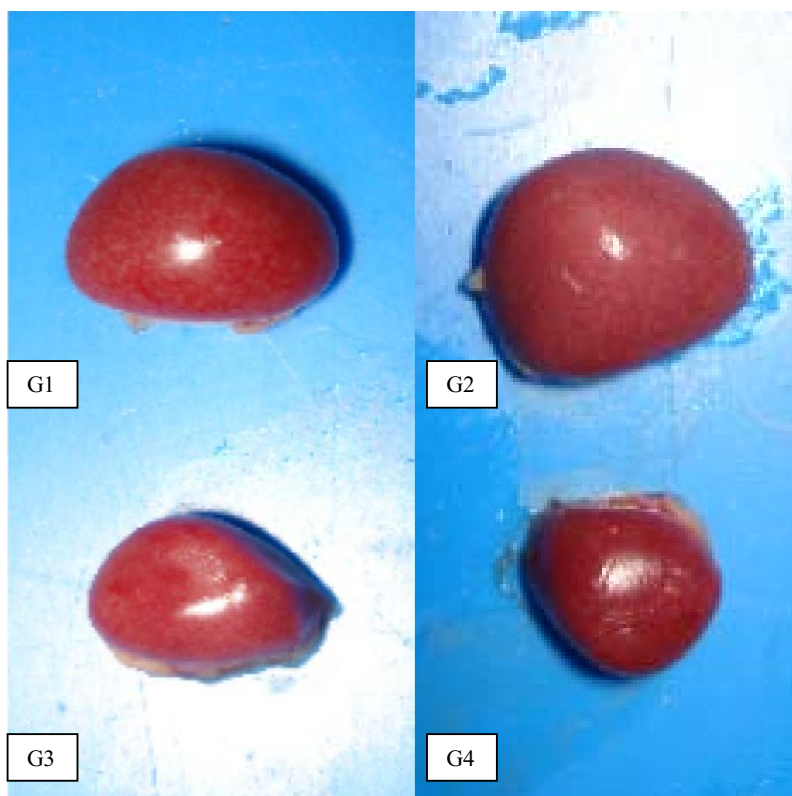


Figura 11. Aspecto macroscópico de baço de aves no sétimo dia após a infecção mostrando esplenomegalia do órgão das aves de G1 e G2, quando comparado à aves de G3 e G4.

5.6 Exame histopatológico

Alterações encontradas nos órgãos das aves do quinto e sétimo DPI são apresentadas nas Figuras 12 a 15. A partir do terceiro DPI, notou-se no exame microscópico dos órgãos das aves de G1 e G2, alterações condizentes com a infecção por SG, e dentre os órgãos, o mais acometido foi o fígado, que a partir do quinto DPI apresentou necrose difundida por todo o parênquima nas aves de G1 e G2, que é uma alteração patológica irreversível. Nas aves do G2, também no quinto DPI, encontrou-se focos necróticos no fígado, enquanto no G1, as lesões necróticas apareceram no sétimo DPI. Infiltrados heterofílicos, linfocíticos ou ambos (infiltrado misto) apareceram nos demais órgãos estudados, com ênfase para o miocárdio de aves do G1 no quinto DPI, onde encontrou-se infiltrado inflamatório misto difuso.

Nos outros órgãos, ou seja, bursa de Fabricius, rins e timo, as reações inflamatórias foram mais amenas, destacando-se picnose no núcleo de algumas células tubulares renais no décimo DPI de aves do G3, porém, esse processo pode ser reversível, ocorrendo em alguns casos iniciais de estresse, sendo que no 15º DPI, não se encontrou alterações nas células tubulares renais nas aves do G3. No exame histopatológico, o processo de picnose foi a única alteração encontrada nos órgãos das aves do G3, que mostrou cortes histológicos semelhantes a G4 (grupo controle), ou seja, com ausência de lesões e integridade da arquitetura tecidual dos órgãos estudados.

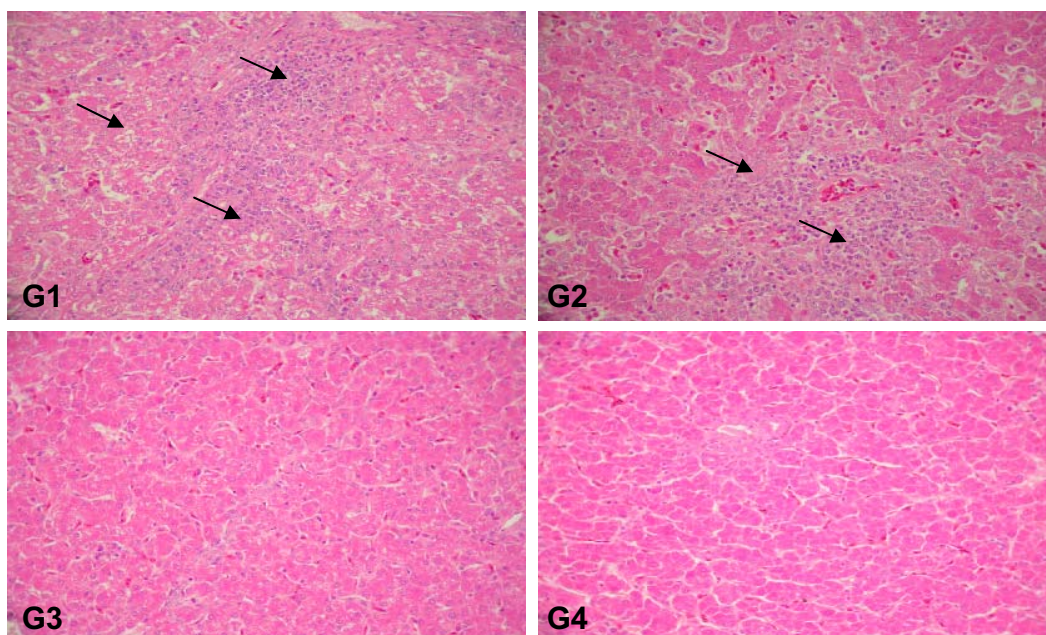


Figura 12. Fotomicrografia de corte histológico do fígado de aves no quinto dia após a infecção. Observa-se, em ave do G1, infiltrado inflamatório e degeneração hidrópica e em ave do G2, necrose multifocal com presença de infiltrado inflamatório (setas). As aves de G3 e G4 não apresentam alterações. (HE, Obj. 40x)

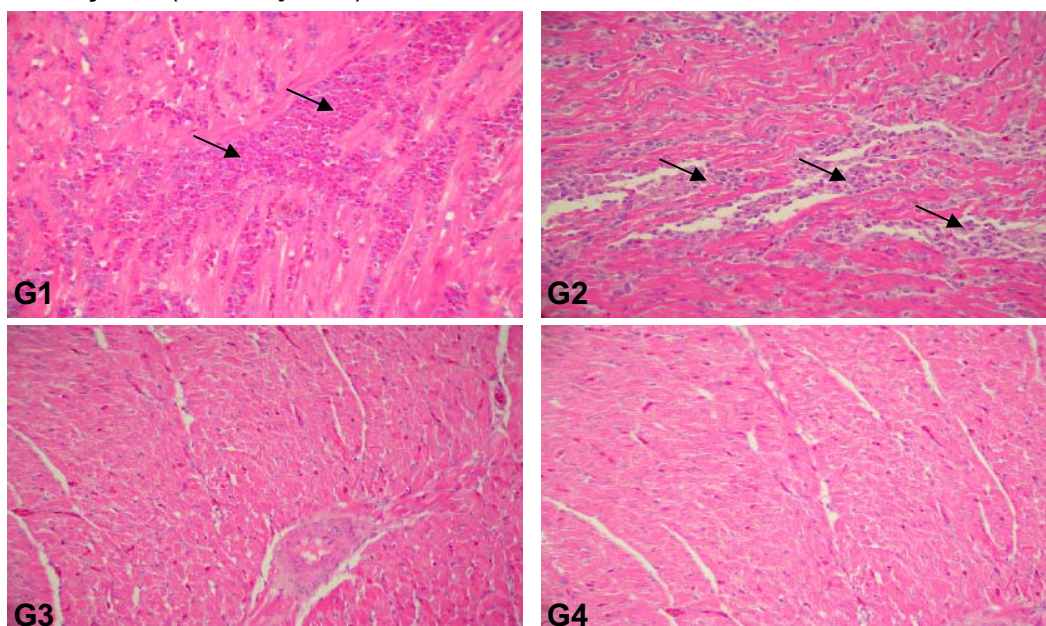


Figura 13. Fotomicrografia de corte histológico do coração de aves no quinto dia após a infecção. G1 e G2 apresentam infiltrado inflamatório misto, com destaque para G1, onde se observa forte infiltrado inflamatório (setas). As aves de G3 e G4 não apresentam alterações (HE, Obj. 40x).

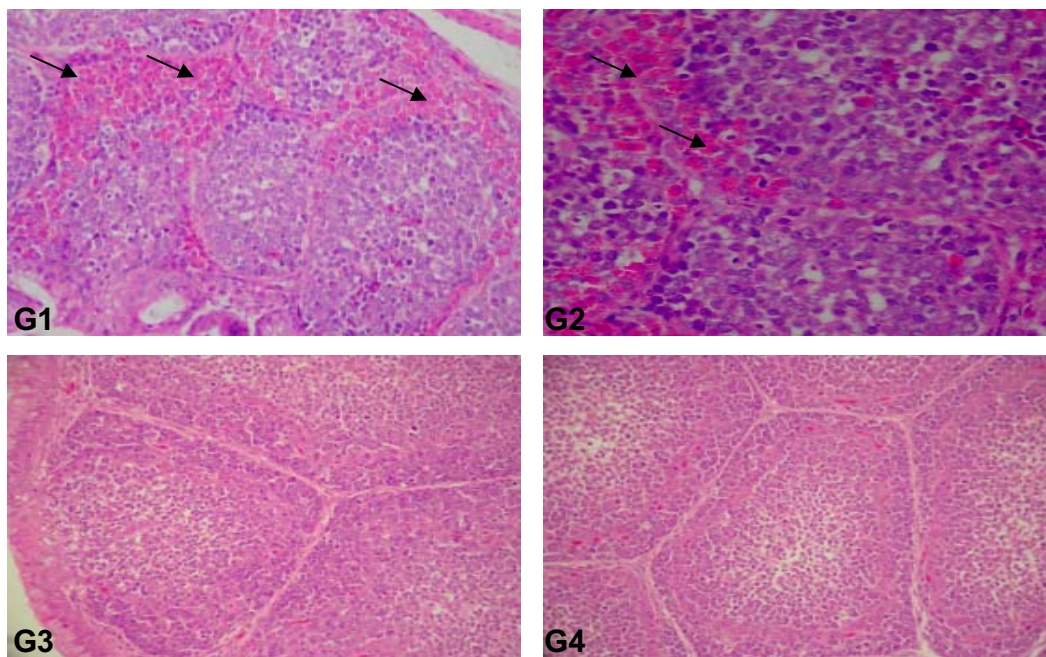


Figura 14. Fotomicrografia de corte histológico da bursa de Fabricius de aves no sétimo dia após a infecção. Nas aves de G1 e G2 observa-se infiltrado inflamatório (setas). As aves de G3 e G4 não apresentam alterações. (HE, Obj. 40x)

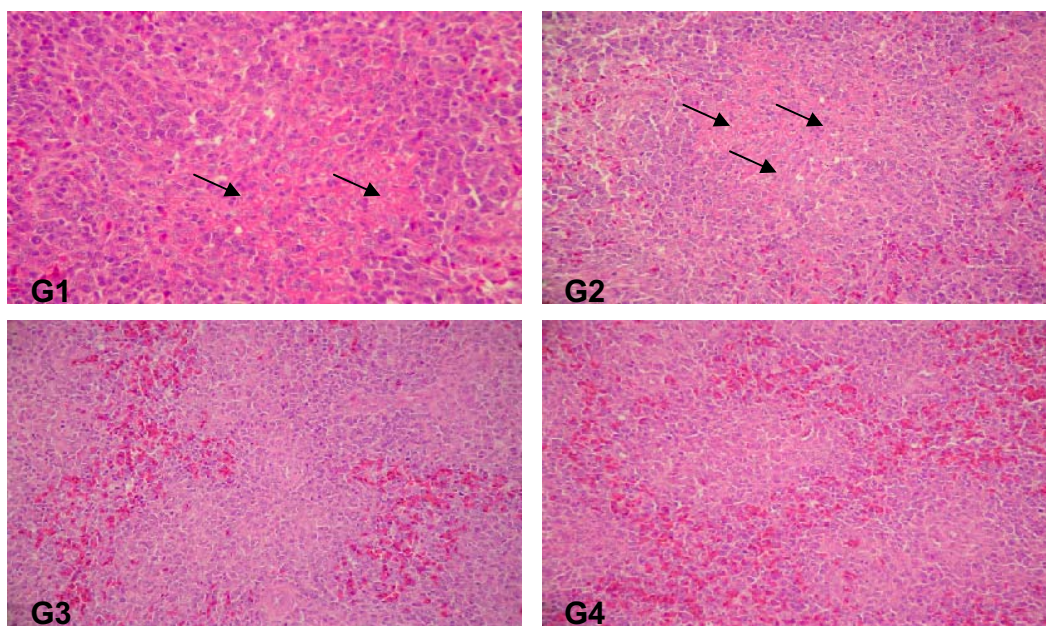


Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico do baço de aves no sétimo dia após a infecção. Nas aves de G1 e G2, observa-se necrose multifocal (setas). As aves de G3 e G4 não apresentam alterações. (HE, Obj. 40x).

VI. DISCUSSÃO

De forma geral, lotes de aves de produção acometidos por SG têm elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Segundo SHIVAPRASAD (2000), a relação entre morbidade e mortalidade depende da idade, nutrição, manejo, nível de estresse e com a variedade dos lotes infectados. Com relação aos sinais clínicos, as aves infectadas ficam apáticas, prostradas, deitam-se, param de se alimentar, apresentam diarreia amarelo-esverdeada a esverdeada (SHIVAPRASAD, 2000; FREITAS NETO et al., 2007; BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009). As observações relatadas são condizentes ao que ocorreu com G1 e G2 no presente trabalho, ou seja, com as aves inoculadas com as cepas $SG\Delta cobS$ e $SGNaI^r$ respectivamente, pois, conforme consta na Tabela 1 houve considerável mortalidade nesses dois grupos; da mesma forma, os sinais clínicos apresentados nas Figuras 1 a 4 confirmam quadro semelhante ao relatado acima, com fezes pastosas, de coloração amarelo-esverdeada e aves apresentando-se apáticas, encorujadas, com redução do consumo de ração e água. No entanto, as aves do G3, que foram inoculadas com a cepa $SG\Delta cobS\Delta cbIA$, não apresentaram mortalidade e nenhum tipo de sinal clínico, se comportando de maneira semelhante ao grupo controle. Esses resultados corroboram com aqueles observados por PAIVA et al. (2009) e PENHA FILHO (2009), que relatam ausência de mortalidade ou qualquer sintomatologia em aves infectadas por $SG\Delta cobS\Delta cbIA$.

Com relação às alterações hematológicas, a ocorrência de anemia é típica de infecções bacterianas como o tifo aviário, primeiramente devido à anemia da doença inflamatória (ALENCAR et al., 2002) e posteriormente à anemia hemorrágica (STOCKHAM, 2000). A anemia nas aves pode ser causada por hemorragia, destruição das hemácias ou diminuição na sua produção. Certas infecções bacterianas como as salmoneloses, podem causar anemia provocada pela destruição de hemácias (CAMPBELL & DEIN, 1984). Estudos de BUXTON (1960) e ASSOKU et al. (1970) mostraram que durante o curso da fase aguda da infecção por SG em galinhas, houve severa anemia. O quadro de anemia foi observado em G1 e G2 nos estágios mais

avançados da infecção, como mostra a Tabela 3, com decréscimo das contagens de hemácias e do hematócrito. Os valores normais para o VCM e o aumento nos valores de HCM e CHCM classificaram a anemia encontrada em G1 e G2 em normocítica e normocrômica. Com relação à diminuição da contagem de hemácias e no percentual de hematócrito, os resultados obtidos são similares aos de vários autores (ASSOKU et al., 1970; ALLAN & DUFFUS, 1971; POMEROY & NAGARAJA, 1991; CHRISTENSEN et al., 1996; CARDOSO et al., 2003; GARCIA et al., 2007b; FREITAS NETO et al., 2007) porém, o tipo de anemia obtido (normocítica normocrômica) foi semelhante com aqueles observados por FREITAS NETO et al. (2007), diferindo da anemia macrocítica normocrômica encontrada por ASSOKU et al., (1970) e CARDOSO et al., (2003), e da anemia microcítica normocrômica observada por CHRISTENSEN et al. (1996). Estas diferenças poderiam ser explicadas pelo fato da patogênese do tifo aviário apresentar-se de modo agudo, subagudo ou crônico, de acordo com a idade e variedade das aves (FREITAS NETO et al., 2007), bem como o nível de estresse em que os grupos experimentais se encontram.

No G3, ocorreram discretas oscilações no volume corpuscular médio (VCM) no decorrer da infecção, com tendência ao decréscimo, sendo que 24 horas após a infecção houve diminuição estatisticamente significativa do VCM, e após esse momento, os valores aumentaram, voltando a valores semelhantes ao encontrado no DAI. Geralmente, a diminuição do VCM ocorre em anemias microcíticas, que são provocadas principalmente por deficiência de ferro, que é componente essencial da hemoglobina. Uma das hipóteses a que se pode chegar é que a multiplicação inicial de *SGΔcobSΔcbiA* causou essa leve alteração hematológica no organismo das aves devido o ferro ser nutriente essencial para replicação das salmonelas. No entanto foi uma alteração branda e no início da infecção, pois não se constatou anemia nesse grupo.

A contagem de leucócitos é um indicador sensível de doenças inflamatórias agudas. Desta maneira, o leucograma, quando bem interpretado, representa um valioso dado para o entendimento da evolução de doenças infecciosas. Neste estudo houve decréscimo inicial na contagem de leucócitos até o terceiro DPI para o G2 e o quinto

DPI para o G1 (Tabela 4 e Figura 5). Esse fato pode ter ocorrido devido ao efeito citopático dos lipopolissacarídeos (LPS) de SG nos leucócitos das aves nos estágios iniciais da infecção, causando lise celular. Em trabalho utilizando mistura de leucócitos e *Salmonella* Typhimurium, LAM & MUNN (2002) constataram alterações na morfologia dos leucócitos e rápida diminuição em suas contagens, deduzindo que o contato com LPS ocasionou degranulação leucocitária. No entanto, essa leucopenia inicial cedeu à forte leucocitose em G1 e G2. Para o G1, a leucocitose se evidenciou no sétimo DPI e se manteve, atingindo seu pico no décimo DPI, que foi o último dia de colheita. Porém esses resultados diferem do que se encontrou para o G2, que apresentou pico das contagens de leucócitos no quinto DPI, porém já no sétimo DPI, essas contagens já haviam regressado a valores similares ao DAI, com tendência à diminuição até o último dia de coleta (Figura 5). Contudo, é pouco provável que essa diminuição leucocitária no G2 seja devido à recuperação das aves, pois de acordo com a Tabela 2, a mortalidade no sétimo DPI deste grupo é alta. Devido a esses fatores, a hipótese mais plausível seria que a diminuição ocorreu devido ao recrutamento excessivo de leucócitos para os sítios de invasão bacteriana e que alguns dos órgãos responsáveis pela produção e armazenamento dessas linhagens celulares já estariam comprometidos, como se observa através das alterações na bursa de Fabricius e baço, nos exames macroscópico e histopatológico. Dessa forma o organismo infectado não consegue repor, de maneira suficiente, novas células para o combate à infecção.

Com relação à contagem diferencial de leucócitos, observou-se diferenças entre G1 e G2, como se observa na Figura 5. Para o G1, a leucocitose foi observada a partir do sétimo DPI, com aumento tanto de heterófilos quanto de linfócitos, porém a contagem do primeiro se sobressaiu à do segundo, havendo uma inversão na relação heterófilo:linfócito até o décimo DPI, onde a contagem destes leucócitos, embora ainda estivessem aumentadas, se equipararam. Esses resultados são condizentes com aqueles encontrados por FREITAS NETO et al., (2007) que, em infecção experimental de aves por SG, encontraram leucopenia seguida de leucocitose devido à heterofilia. Por outro lado, a leucocitose do G2 foi constatada a partir do quinto DPI, como consequência do aumento de heterófilos, atingindo seu pico neste dia, com contagens

quatro vezes superiores ao DAI, sendo que o aumento de linfócitos foi insignificante. A inversão da relação heterófilo:linfócito ocorreu no terceiro DPI, permanecendo assim até o décimo DPI, onde houve declínio da contagem de heterófilos, que se aproximaram àquelas do DAI e às contagens de linfócitos (Figura 5). O aumento do número de heterófilos durante infecção também foi relatado por ASSOKU et al. (1970), em cujo trabalho cita-se leucocitose por aumento de cinco vezes a contagem normal de heterófilos. Segundo MORGULIS (2002), geralmente a leucocitose se deve à heterofilia, tendo como causa mais comum as infecções generalizadas ocasionadas por microrganismos infecciosos, como as salmonelas. Os heterófilos não possuem especificidade para os antígenos, mas têm importante papel na fase aguda da infecção (NORIEGA, 2000), migrando para o local de infecção em resposta a um estímulo quimiotático; sua principal função é a fagocitose (MORGULIS, 2002). A heterofilia encontrada neste estudo para G1 e G2 pode ser decorrente do recrutamento de novas células, devido a migração dos heterófilos circulantes para o local da lesão. Esses fatos evidenciam a resposta aguda do organismo no combate à infecção através do aumento na produção dos heterófilos.

Com relação aos linfócitos houve oscilações em G1 e G2. Nas aves do G1, observou-se ligeira linfopenia no terceiro DPI e linfocitose no décimo DPI quando comparados ao DAI. Já nas aves do G2 constatou-se linfopenia no terceiro DPI, com ligeiro aumento no quinto DPI, porém, permanecendo com contagens inferiores ao DAI, resultados semelhantes aos encontrados por ASSOKU et al. (1970), que pesquisando infecção de aves por *Salmonella*, verificaram diminuição no número de linfócitos. Por outro lado, ALLAN & DUFFUS (1971) inocularam *S. Gallinarum* em aves e não constataram variações no número de linfócitos durante o desenvolvimento de tifo aviário. Sabe-se que os linfócitos são células de defesa originadas tanto na medula óssea quanto em órgãos linfóides, como baço, timo, tonsilas cecais e bursa de Fabricius. Trata-se de células que, em processos inflamatórios agudos, respondem a mediadores inflamatórios e passam da corrente circulatória e tecidos linfóides ao local da inflamação, sendo que a intensidade da linfopenia reflete, muitas vezes, na gravidade da resposta inflamatória (FREITAS NETO et al., 2007). As alterações das

contagens de linfócitos constatadas principalmente no G2, onde se observou linfopenia, pode ser explicada pela migração dessas células para o local da lesão ou pelo comprometimento dos órgãos linfóides, principalmente a bursa de Fabricius e baço, como se pode observar nos exames macroscópico e histopatológico, que não liberaram os tipos celulares ligados a resposta imune de forma rápida e eficiente.

As alterações observadas em monócitos, basófilos e eosinófilos se restringiram ao G1, que tiveram oscilações, porém sem relevância, resultados similares aos encontrados por outros autores (ALLAN & DUFFUS, 1971; CARDOSO et al., 2003).

Analisando a contagem leucocitária num todo, observam-se respostas diferentes das aves de G1 e G2 (Figura 5). Como o G1 foram as aves inoculadas com a cepa mutante SG Δ cobS, esta pode estar utilizando mecanismos alternativos de infecção, fazendo com que seu comportamento seja diferente de cepas típicas de SG, pois, de acordo com TURNER et al. (2003) que estudaram mutantes de SG, *Salmonella* Typhimurium (STM) e *Salmonella* Dublin (SD), observaram que essas bactérias colonizaram o trato digestório de frangos e camundongos utilizando mecanismos alternativos de invasão quando comparadas com suas respectivas cepas selvagens.

Com relação à G3, não se observou nenhum tipo de alteração significativa nas contagens de leucócitos no decorrer da infecção para este grupo, que apresentou contagens semelhantes àquelas encontradas no G4 (controle).

A avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos tem grande importância no que tange às atividades metabólicas vitais que ocorrem nos fluidos corporais de animais enfermos. Segundo KANEKO et al. (2009), a avaliação dos exames bioquímicos do soro sanguíneo em animais permite diagnosticar precocemente quadros de sintomatologia subclínica. Como mostra a Tabela 5, os grupos que mostraram maiores alterações nos parâmetros bioquímicos séricos foram G1 e G2, no entanto, algumas alterações também foram encontradas no G3.

A albumina, sintetizada exclusivamente no fígado, é a principal proteína responsável pela manutenção da pressão oncótica do sangue. Também, atua como transportadora de várias substâncias presentes na circulação sanguínea. A hipoalbuminemia pode ocorrer nos casos de insuficiência hepática, desnutrição e

distúrbios gastrintestinais, dentre outras condições (MEYER et al., 1996). A partir do sétimo DPI, iniciou-se redução dos níveis séricos de albumina em G1 e G2, atingindo um nível mínimo no décimo DPI, onde os níveis séricos se reduziram à metade quando comparados ao DAI. Resultados semelhantes foram encontrados por FREITAS NETO et al., (2007) que observaram diminuição de albumina em aves suscetíveis à infecção por SG. Esta redução coincide com intensa degeneração hepática, observada a partir do quinto DPI nesses grupos, como se pode observar pelas Figuras 8, 10 e 12. Embora a meia-vida sanguínea da albumina seja superior ao período do experimento em questão, a diminuição do teor desta proteína pode ter sido decorrente de sua menor síntese devido à insuficiência hepática constatada.

O magnésio juntamente com o cálcio, são importantes na manutenção do potencial de membrana das células musculares e nervosas, bem como à adequada excitabilidade da musculatura lisa. Inadequado aporte de magnésio predispõe à atonia muscular (CAMPANILE et al., 1996). De acordo com MARTIN (1998), a concentração sérica de cálcio é mantida por mecanismos de absorção intestinal e reabsorção óssea e renal. Esse mecanismo é controlado por paratormônio, calcitonina e 1,25-diidroxicolicalciferol (KOCABAGLI et al., 1995). Porém, o equilíbrio dessa concentração pode variar devido a vários fatores como idade, sexo, espécie, alimentação, clima e principalmente estresse. No presente estudo foi verificado aumento gradativo dos teores séricos de magnésio e cálcio em G1 e G2 e oscilação das concentrações séricas de cálcio no G3 no decorrer da infecção, quando comparados ao DAI e ao G4 (controle). Essas alterações podem estar relacionadas a distúrbios nos tecidos renais dos grupos citados que, apesar de não apresentarem lesões significativas, essas lesões, mesmo que amenas, podem ter comprometido a adequada excreção dos eletrólitos, aumentando as concentrações séricas dos mesmos.

O fósforo é componente fundamental de ossos, membranas celulares e funções celulares. Apenas o G1 apresentou oscilações significativas para esse parâmetro, com destaque para aumento no sétimo DPI seguido de diminuição no décimo DPI, com concentração sérica semelhante ao DAI, como mostra a Tabela 5. É importante ressaltar que a absorção desse mineral está relacionada com a relação cálcio:fósforo

da dieta. Assim, a oscilação dos valores de fósforo encontrada ao longo do experimento no G1 pode estar relacionada a possível desequilíbrio na relação cálcio e fósforo da dieta, já que as aves não estavam se alimentando adequadamente, em razão da infecção por SG.

Sendo o principal produto do metabolismo de nitrogênio, o ácido úrico é responsável pela excreção, através da urina, de cerca de 60 a 80% do nitrogênio excretado pelas aves (SCHIMIDT et al., 2007). As alterações mais relevantes de ácido úrico foram encontradas em G1 e G3, com diminuição gradativa ao longo da infecção. Segundo SCHIMIDT et al. (2007), o ácido úrico é sintetizado tanto no fígado quanto nos rins, portanto, a hipótese é que, para o G1, essa diminuição pode estar relacionada à lesão hepática constatada a partir do quinto DPI e com relação ao G3, como a diminuição significativa foi observada a partir do décimo DPI, ela pode estar relacionada à alteração renal, observada também no décimo DPI, relacionada ao processo de picnose encontrado nas células tubulares renais, descrito no exame histopatológico.

A avaliação das concentrações séricas de triglicerídeos e do colesterol é de grande importância na determinação do funcionamento de várias atividades metabólicas vitais. Os lipídeos desempenham importantes funções no organismo animal, desde a composição de membranas e outras estruturas celulares até a função de armazenamento de energia; também podem causar transtornos quando em alta concentração no sangue. As alterações significativas observadas nos níveis séricos de colesterol mostraram diminuição de G1 e G2 e oscilações do G3 no decorrer da infecção. Com relação aos níveis séricos de triglicerídeos as alterações observadas foram em G1 e G2, com declínio inicial no terceiro DPI, chegando a uma concentração quatro vezes menor no décimo DPI, em relação ao DAI e o décimo DPI de G3 e G4, como mostra a Tabela 6. Resultados similares foram encontrados por GARCIA et al. (2007c), que observaram diminuição dos teores séricos de triglicerídeos de modo similar ao colesterol, na infecção de aves por SG. Esses resultados são pertinentes, pois além da diminuição da alimentação das aves, o metabolismo dos lipídeos está comprometido devido à insuficiência hepática constatada através dos exames

macroscópico e histopatológico, já que o fígado tem papel fundamental no metabolismo dos lipídeos.

A creatinina é formada durante o metabolismo da musculatura esquelética (MEYER et al., 1995) e, em animais com função renal normal, há relação direta entre a massa muscular e a concentração sérica desse catabólito (KANEKO et al., 2009). Não foram observadas alterações significativas para a creatinina nos grupos experimentais. O que se observou foi apenas diferença entre os grupos 24 horas PI, porém já no terceiro DPI não foi averiguado mais nenhuma alteração entre grupos e momentos no decorrer da infecção para esse parâmetro.

A determinação das atividades das enzimas séricas permite avaliar a funcionalidade de vários órgãos e tecidos. Exemplo de enzimas utilizadas como indicadores de função hepática são fosfatase alcalina (ALP), gamaglutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST). As alterações das atividades séricas dessas enzimas se restringiram a G1 e G2. ALP é uma enzima de membrana encontrada em vários tecidos, como ossos, epitélio hepatobiliar e placenta (MEYER et al., 1995). Os valores séricos médios de ALP mostraram flutuações ao longo da infecção em G1 e G2, que tiveram comportamento semelhante do início ao final do experimento. Tal fato pode ser explicado pelas considerações de SCHIMIDT et al. (2007) que relatam atividade de ALP nas aves em vários órgãos como rins, músculo cardíaco, músculo esquelético, pulmões e ossos. Portanto as oscilações das atividades de ALP constatadas em G1 e G2 podem ter ocorrido devido a disfunções de alguns desses órgãos, devido à infecção por SG, comprometendo a adequada atividade da enzima.

Alterações nas atividades séricas de GGT e AST podem estar associadas a distúrbios hepáticos, porém, suas atividades não são hepato-específicas, podendo estar alteradas nas lesões de outros órgãos como os rins. Com relação à GGT foi verificado aumento significativo de suas atividades no decorrer da infecção para G1 e G2, sendo que praticamente dobrou e triplicou, respectivamente, em relação ao momento anterior a infecção, como pode se observar na Tabela 6. Com relação à AST, o destaque ficou para o G2, que teve as atividades séricas dessa enzima dobrada, se comparada ao momento anterior a infecção, resultados condizentes com aqueles encontrados por

FREITAS NETO et al. (2007), que também verificaram aumento de AST em aves inoculadas por SG no decorrer da infecção. MEYER et al. (1995) observaram que GGT é uma enzima de membrana, sendo que suas atividades séricas podem estar aumentadas já no início de lesão hepática. Por outro lado, o aumento significativo das atividades séricas de AST sugere lesão hepática grave e difusa (KANEKO et al., 2009). Portanto, de acordo com essas informações, observa-se que G2 adquiriu lesão hepática mais acentuada quando se compara a G1, pois além de apresentar maior aumento de atividade sérica de GGT, as alterações de AST para G2 foram mais significativas que para G1.

Em animais enfermos, a alteração da concentração sérica de proteína total (PT) irá depender de como a doença se manifesta no organismo, podendo aumentar nos casos de resposta imunológica em que há produção de imunoglobulinas, ou diminuir nos casos de déficit de produção protéica. Para o G1, foi verificado aumento significativo na concentração sérica de PT no quinto DPI, porém, já no sétimo DPI, os valores retornaram a valores semelhantes ao momento anterior à infecção. Esse aumento no quinto DPI do G1 é procedente, pois das nove proteínas apresentadas na Tabela 7, sete delas estão aumentadas em relação ao DAI, sendo que seis proteínas apresentaram seu pico neste dia, com destaque para as proteínas de 90.000 e 99.000 Da, e transferrina, que tiveram seus valores aumentados em trinta, cinco e quatro vezes, respectivamente, além da albumina, que foi a proteína de maior concentração encontrada no soro sanguíneo. Para o G2, observou-se decréscimo significativo no décimo DPI. Esse decréscimo pode estar relacionado com a acentuada diminuição de albumina neste momento, que está reduzida pela metade e também da diminuição acentuada de IgG de cadeia leve, que se reduziu em 15 vezes em relação ao momento anterior à infecção.

Uma boa proteção contra as salmonelas requer tanto imunidade mediada por células T quanto imunidade humoral (BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009); assim, nas infecções sistêmicas por *Salmonella* a resposta humoral, caracterizada por alto título de IgG, não elimina a bactéria do organismo sem que haja resposta imune celular, mas é de fundamental importância no processo de destruição bacteriana

extracelular. Com relação à IgG de cadeia pesada, a única alteração importante foi no G1, onde verificou-se decréscimo significativo apenas no décimo DPI, com a concentração de IgG se reduzindo à metade do DAI. No entanto a IgG de cadeia leve mostrou decréscimo significativo em G1 e G2, sendo que para G2 os níveis séricos de IgG tiveram acentuada diminuição, reduzindo em 15 vezes no décimo DPI quando comparado ao DAI (Tabela 7 e Figura 7). Esses resultados diferem daqueles encontrados por GARCIA et al. (2009), que encontraram aumento de IgG em aves infectadas por SG. Em aves, os órgãos linfóides primários, que são responsáveis pela produção, maturação e diferenciação de linfócitos, são o timo e a bursa de Fabricius, que produzem linfócitos T e B, respectivamente. No presente estudo, houve um maior comprometimento da bursa de Fabricius, se comparada com o timo para G1 e G2, como se observa nos exames macroscópico e histopatológico. Diante desse quadro, uma explicação para a forte diminuição de IgG seriam irregularidades na produção, maturação e/ou diferenciação dos linfócitos B na bursa de Fabricius, pois são esses linfócitos que se diferenciam em plasmócitos, dando origem a imunoglobulinas como as IgGs.

Para G3, a cinética da IgG de cadeia leve apresentou diminuição significativa no primeiro dia após a inoculação, retornando aos valores basais no sétimo DPI, e a partir desse dia, manteve valores próximos aos do grupo controle. Como uma das principais funções das IgGs é a opsonização das bactérias para melhor fagocitose pelo SFM, pode ter ocorrido um forte recrutamento inicial para mobilização dos antígenos. A partir do terceiro DPI foi verificada recuperação na concentração de IgGs nas aves do G3 (Figura 7). Esse fato mostra que está havendo controle da infecção no organismo devido à característica avirulenta da cepa, pois, de acordo com PENHA FILHO (2009), no estudo com a cepa $SG\Delta cobS\Delta cbiA$, a deleção dos genes *cobS* e *cbiA* causou transtornos metabólicos que refletiram no comportamento da bactéria *in vivo*, pois o autor observou crescimento e virulência deficientes, quando comparada à cepas selvagens.

IgA é a principal imunoglobulina que atua no epitélio intestinal, reduzindo a colonização bacteriana no local. A penetração de *Salmonella* no epitélio intestinal é

mediada pelo sistema de secreção tipo III, presente na ilha de patogenicidade 1 da bactéria (DARWIN & MILLER, 1999). Segundo os autores, as proteínas secretadas por esse sistema interagem com as células epiteliais, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-4 e IL-6), facilitando a infiltração de polimorfonucleares e induzindo a produção de IgA, sendo esta resposta inflamatória intestinal de extrema importância no impedimento de infecção sistêmica.

Em G1 e G2, constatou-se que o teor sérico de IgA teve um decréscimo nos estágios mais avançados da infecção (Tabela e Figura 7). Segundo WYANT et al. (1999) a baixa resposta imune intestinal induzida por *Salmonella Gallinarum* ocorre devido à ausência de flagelo em sua superfície já que tal estrutura representa potente ativador da produção de citocinas inflamatórias nas mucosas que desencadeiam respostas que levariam ao aumento de IgA. Também, pode ser devido a mutação no *invH*, um dos genes que controlam o sistema de secreção tipo III, que é responsável por mediar a passagem da bactéria desde a luz intestinal até o interior das células (ALTMAYER et al., 1993). É importante lembrar que a baixa resposta de IgA na mucosa frente à infecção pode ser a causa de maior patogenicidade e, conseqüentemente, do alto índice de óbitos verificado neste estudo para G1 e G2 e nos casos naturais do tifo aviário, pois o prejuízo à barreira da mucosa intestinal predispõe à infecção sistêmica e conseqüentemente, a sinais clínicos e lesões teciduais características, principalmente no fígado, baço e coração (BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009). No entanto, além de não haver resposta de IgA, houve decréscimo nas concentrações dessa imunoglobulina para G1 e G2 a partir do quinto e terceiro DPI, respectivamente. Tal fato pode ser explicado por deficiência na produção desta imunoglobulina, da mesma forma que para IgG, como foi comentado anteriormente.

Proteínas de fase aguda (PFA) são aquelas sintetizadas pelo fígado, que se alteram na presença de lesões teciduais, tendo participação na reparação tecidual, podendo ser positivas ou negativas quando aumentam ou diminuem, respectivamente. Quanto à haptoglobina, é sabido que se trata de PFA positiva e as alterações encontradas em G1 e G2 comprovam essa teoria, pois no G1 houve aumento, que atingiu seu pico no quinto DPI, logo após houve decréscimo no sétimo e décimo DPI,

porém sem que voltasse aos valores do momento anterior à infecção. Esse decréscimo pode estar relacionado à forte anemia encontrada no G1 também no sétimo e décimo DPI (Tabela 3), já que a principal função da haptoglobina é ligar-se à hemoglobina livre, liberada pela destruição intravascular das hemácias causada pela anemia e, dessa forma, diminuindo a concentração da PFA na circulação sanguínea. Outro fato relevante seria o comprometimento hepático constatado a partir do quinto DPI, pois as PFAs são produzidas no fígado e com isso, a produção de haptoglobina não estaria correspondendo à demanda. Porém, para G2, esse aumento foi gradativo e constante, atingindo o pico no décimo DPI, como se observa na Tabela 7 e Figura 6. Resultados semelhantes foram encontrados por GARCIA et al. (2009), que observaram aumento de haptoglobina em aves infectadas por SG.

As proteínas de 99.000 e 90.000 Da, tiveram comportamento semelhante ao de PFA positiva, com valores extremamente aumentados no decorrer da infecção em G1 e G2, onde, no caso da proteína de 90.000 Da, esse aumento foi de 30 e 20 vezes, para G1 e G2 respectivamente, no quinto DPI, quando comparados ao DAI. Segundo SERRA (1997), esse aumento significativo é característico de algumas PFAs, pois o autor relata que PFAs como a proteína C reativa e substância amilóide A, podem aumentar milhares de vezes em resposta do organismo a uma injúria tecidual.

A transferrina, que, na presença de lesão tecidual tende a diminuir no decorrer da infecção, sendo uma PFA negativa, teve comportamento atípico em G1 e G2, se comportando como PFA positiva, aumentando e atingindo seu pico no quinto DPI, e decrescendo a partir deste momento. Esse fato pode ser explicado pela característica das salmonelas em consumir ferro, que é necessário para sua replicação, diminuindo as concentrações de ferro livre. Sendo a função da transferrina a de se ligar ao ferro, carreando-o no plasma e no líquido extracelular para suprir as necessidades teciduais, a diminuição do ferro livre no plasma acarreta no aumento desta PFA. Porém, para G3, as concentrações de transferrina tiveram decréscimo gradativo, semelhante ao encontrado por GARCIA et al. (2009), que também observaram decréscimo dessa PFA na infecção de aves por SG. A proteína de 23.000 Da teve comportamento de PFA

negativa para G1 e G2, pois observou-se decréscimo gradativo ao longo da infecção para esses grupos (Tabela 7).

Com relação à cinética das PFAs em G1 e G2 (Figura 6), observa-se que no geral, tiveram seu pico no quinto DPI, tendo um decréscimo a partir desse momento. Esse decréscimo pode estar relacionado com a disfunção hepática constatada nestes dois grupos, que começa a se agravar no quinto DPI, como pode se observar nos exames macroscópico e histopatológico, pois, como as PFAs são produzidas no fígado, o comprometimento do órgão consequentemente pode ter afetado a produção das PFAs, que decresceram a partir deste momento.

Para o exame bacteriológico, a Tabela 8 mostra que, a partir do terceiro DPI, todas as aves do G1 foram positivas e que no G2 houve apenas duas aves negativas, mostrando que o fígado é um dos órgãos de multiplicação de SG, principalmente dentro de macrófagos hepáticos, ou células de Kupffer, pois de acordo com CHADFIELD et al. (2003), os macrófagos são uma das células de eleição para multiplicação de SG.

Para G3, a única positividade foi encontrada no quinto DPI, mostrando que essa cepa possui algum grau de multiplicação no fígado, resultado condizente com PENHA FILHO (2009), que também verificou presença da cepa $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ no fígado nos estágios iniciais da infecção.

As alterações encontradas no exame macroscópico a partir do terceiro DPI, principalmente no fígado, baço e bursa de Fabricius em G1 e G2 (Figuras 8 a 11), evidencia quadro típico de infecção por SG, coincidindo com resultados encontrados por vários autores (ASSOKU et al., 1970; CHRISTENSEN et al., 1996; SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JÚNIOR et al., 2000; FREITAS NETO et al., 2007; BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009), ressaltando que não foram encontradas lesões em G3 e G4, que apresentaram órgãos com tamanho, coloração e aspecto normais.

Nos exames histopatológicos as alterações também se iniciaram a partir do terceiro DPI, nas aves de G1 e G2 e dentre os órgãos, o mais acometido foi o fígado, que a partir do quinto DPI já apresentava necrose multifocal no fígado das aves de G1 e G2, sendo alteração patológica irreversível (Figura 12). HALL (1991) descreveu as lesões histopatológicas observadas no fígado durante a infecção por SG como uma

degeneração de hepatócitos ao redor das veias centro-lobulares. No G2, também no quinto DPI, já se encontravam focos necróticos no tecido esplênico, enquanto em G1, as lesões necróticas apareceram no sétimo DPI. Infiltrados inflamatórios foram encontrados nos demais órgãos estudados, porém houve destaque para o coração de ave do G1, que mostrou forte infiltrado no quinto DPI (Figura 13). SMITH (1955), em estudo experimental com SG encontrou uma reação celular proliferativa no coração, que adquiria o formato de massas nodulares brancas disseminadas através do miocárdio e essas alterações eram de caráter celular e basicamente consistiam de diferentes linhagens celulares como polimorfonucleares, fibroblastos, linfócitos e monócitos. Na bursa de Fabricius houve infiltrado relevante no sétimo DPI para G1 e G2. Resultados semelhantes ao presente estudo foi encontrado por FREITAS NETO et al. (2007), que, na infecção de SG em aves de postura, descreveram interessantes alterações microscópicas no fígado, coração e rins, dando destaque para necrose multifocal e degeneração hidrópica no fígado e reações inflamatórias difusas nos rins e coração. GARCIA et al. (2007a), também encontraram lesões histopatológicas relevantes em aves infectadas por SG, porém as lesões encontradas se restringiram ao fígado, baço e rins, sendo que o fígado foi o órgão mais acometido onde os autores relatam necrose multifocal, megalocitose e degeneração hidrópica.

Para o G3, houve leve alteração renal nas células tubulares do órgão no décimo DPI. É importante ressaltar que houve diminuição significativa de ácido úrico para esse grupo (Tabela 5) e que a maior diminuição foi justamente no décimo DPI, mostrando que pode haver um comprometimento renal nesse momento no G3, já que, segundo SCHIMIDT et al. (2007), parte do ácido úrico é produzido nos rins.

As aves de G1 e G2, que foram inoculadas com as cepas $SG\Delta cobS$ e $SGNaI^r$ respectivamente, apresentaram, ao longo do experimento, alterações condizentes com a infecção por SG, com alterações macroscópicas e histopatológicas muito semelhantes. Entretanto, com relação às alterações hematológicas e bioquímicas, as aves inoculadas com a cepa mutante, com deleção do gene $cobS$ ($SG\Delta cobS$), tiveram algumas repostas diferentes das encontradas nas aves inoculadas pela cepa típica de SG ($SGNaI^r$), provavelmente porque a cepa mutante utiliza mecanismos alternativos de

infecção devido a ausência do gene *cobS*, pois, segundo RICHARDSON (2000), faz parte da habilidade da bactéria, para superar as adversidades ambientais, alteração da composição do seu sistema respiratório.

Com relação às aves do G3, ou seja, aquelas inoculadas com *SGΔcobSΔcbiA*, tiveram comportamento muito semelhante ao grupo controle (G4), principalmente na avaliação clínica, nas contagens de leucócitos e nos exames macroscópico e histopatológico, com exceção da picnose encontrada nas células tubulares renais. Entretanto, foram encontradas alterações no eritrograma e nos exames bioquímicos, com destaque para alterações renais, devido à diminuição gradativa dos teores séricos de ácido úrico, as alterações na produção de IgG, e também, alguma alteração hepática, já que houve alterações em componentes produzidos pelo órgão, que foram oscilações nos teores séricos de colesterol, e diminuição de transferrina no decorrer da infecção. Essas alterações, mesmo que amenas, devem ser levadas em consideração, já que o objetivo principal do presente trabalho foi verificar possíveis alterações causadas por esta cepa de deleção dupla. Diante do que foi relatado, seriam necessários novos estudos nesta linha de pesquisa para a cepa em questão, mostrando qual seria o limiar dessas alterações no que diz respeito ao desempenho e saúde de aves vacinadas com a cepa *SGΔcobSΔcbiA*, pois a necessidade do mercado são vacinas que interfiram o mínimo possível no desempenho e sanidade do plantel avícola.

VII. CONCLUSÕES

Dentro das condições em que foi realizado o presente trabalho, concluiu-se que:

- As aves inoculadas com a cepa $SG\Delta cobS$ tiveram comportamento semelhante às aves inoculadas por $SGNaI^f$, ou seja, apresentaram quadro típico da infecção por SG no que tange aos sinais clínicos, mortalidade e nos exames macroscópico e histopatológico, porém com algumas respostas diferentes nos exames hematológicos e bioquímicos.
- Os órgãos que apresentaram maior comprometimento nas aves inoculadas com $SG\Delta cobS$ e $SGNaI^f$ foram o fígado, o baço, a bursa de Fabricius e o coração.
- As aves inoculadas com a cepa $SG\Delta cobS\Delta cbIA$ tiveram comportamento semelhante ao grupo controle, com ausência de sinais clínicos e mortalidade, entretanto foi verificada lesões brandas nos rins e alterações nos parâmetros bioquímicos cálcio, ácido úrico, colesterol, transferrina e IgG de cadeia leve.
- Estudos futuros devem ser realizados com a cepa $SG\Delta cobS\Delta cbIA$, verificando se as alterações constatadas no presente trabalho não interferem, de alguma forma, no desempenho de aves vacinadas com a cepa em questão.

VIII. REFERÊNCIAS

ALLAN, D.; DUFFUS, W.P. The immunopathology in fowls (*Gallus domesticus*) of acute and subacute *Salmonella* Gallinarum infection. **Research in Veterinary Science**, London, v.12, p.140-151, 1971.

ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K.C.H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Revista de educação continuada CRMV-SP**, São Paulo, v.5, n.2, p. 196-205, 2002.

ALTMAYER, R.M., McNERN, J.K., BOSSIO, J.C., ROSENSHINE, I., FINLAY, B.B., GALAN, J.E. Cloning and molecular characterisation of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. **Molecular Microbiology**, Salem, v.7, p.89–98, 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*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 4, p. 1160-1171, 2008.

ANDERSON, E.L.; STEPHENS, J.F. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with *Salmonella*. **Applied Microbiology**, Washington, v.19, n.5, p.726-730, 1970.

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

ANDREATTI FILHO, R.L.; PATRÍCIO, I.S. Biosseguridade da granja de frangos de corte. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M. **Produção de Frangos de Corte**. Campinas: FACTA, 2004, p.169-177.

ASSOKU, R.K.G.; PENHALE, W. J. Experimental induction of an immunohaemolytic anaemia in the chicken with *Salmonella* Gallinarum endotoxin. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 42, p.108-120, 1978.

ASSOKU, R. K. G.; PENHALE, W.J. The pathogenesis of fowl typhoid: The influence of anaemia and erythrocyte clearance on the susceptibility of the fowl to bacterial endotoxin. **Journal of Comparative Pathology**, New York, v.84, p.443-453, 1974.

ASSOKU, R.K.G ; PENHALE, W.J. ; BUXTON, A. Haematological changes in acute experimental *Salmonella* Gallinarum infection in chickens. **Journal of Comparative Pathology**. New York, v. 80, p. 473-485. 1970.

BARROW, P.A. Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of *Salmonella gallinarum*. **Infection and Immunity**, Washington, v.58, p.2283-2288,1990.

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 Pathology**, Huntingdon, v. 20, n. 4, p. 681-692, 1991.

BARROW, P.A. ; SIMPSON, J.M. ; LOVELL, M.A. ; BINNS, M.M. Contribution of *Salmonella* Gallinarum large plasmid toward virulence in fowl typhoid. **Infection and Immunity**, Washington, v. 55, n. 2, p.388-392, 1987.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**, São Paulo: EDART, 1976, p.241.

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

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

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

BUCHALA, F. G.; ISHIZUKA, M. M.; MATHIAS, L. A.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; KANASHIRO, A. M. I. Ocorrência de reação sorológica contra *Salmonella* Pullorum em aves de “fundo de quintal” do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p. 1-5, 2006.

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

BUMSTEAD, N.; BARROW, P.A. Resistance to *Salmonella* Gallinarum, S. Pullorum and S. Enteritidis in inbred lines of chickens. **Avian Diseases**, Kenneth Square, v.37, n.1, p.189-193, 1993.

BUXTON, A. pathological changes in the blood of chickens infected with *Salmonella* Gallinarum. **Journal of comparative Pathology and Therapeutics**. New York, v.70, p. 308-325. 1960.

CAMPANILLE, G.; DE FILIPPO, C.; DI PALO, R. Et al. Influence of dietary protein on urea levels in blood and milk of buffalo cows. In : **International simposium of Veterinary Laboratory Diagnostic**, 8, Roma. Abstracts... 1996.

CAMPBELL, T.W.; COLES, E.H. Avian clinical pathology. In: Coles EH. **Veterinary Clinical Pathology**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 279-301p., 1986.

CAMPBELL, T.W.; DEIN, F.J. Avian Hematology. The Basics. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia: WB Saunders, v.14, n.2, p.223-248, 1984.

CARDOSO, A.L.; TESSARI, E.N.; CASTRO, A.G. Estudo hematológico em aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 35-42, 2003.

CHRISTENSEN, J. P.; BARROW, P. A.; OLSEN, J. E.; POULSEN J. S. D.; BISGAARD, M. Correlation between viable counts of *Salmonella Gallinarum* in spleen and liver and the development of anaemia in chickens as seen in experimental fowl typhoid. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 25, n. 4, p. 769-783, 1996.

CHRISTENSEN, J. P.; OLSEN, J. E.; HANSEN, H. C.; BISGAARD, M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* biovar *gallinarum* and *pullorum* by plasmid profiling and biochemical analysis. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 21, n. 1, p. 461-470, 1992.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L.; Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, p.405-428, 1999.

DUFFUS, W.P.H.; ALLAN, D. A study on the immunological response in chickens to the somatic antigen of *Salmonella gallinarum*. **Immunology**, London, v.15, p. 653-660, 1968.

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*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 1, p. 24–29, 1992.

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*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 1, p. 273-280, 1990.

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 Diseases**, Kenneth Square, 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 Diseases**, Kenneth Square, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.**, Washington, v. 83, n. 14, p. 5189-5193, 1986.

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

GAMBIRAGI, A. P. O. M.; SALLES, R. P. R.; OLIVEIRA, W. F.; MACIEL, W. C.; ROMÃO; J. M.; TEIXEIRA, R. S. C. *Salmonella* sp em frangos de corte de um dia de idade na região metropolitana de Fortaleza-CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, n. 3, p. 149-153, 2003.

GARCIA, K.O.; ALESSI, A.C.; FAGLIARI, J.J.; BERCHIERI JÚNIOR, A; PENHA FILHO, R.A.C.; SANTANA, A.M. Histopatologia de aves de postura experimentalmente infectadas por *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 34, 2007a. Santos – SP. **Trabalho Científico...** São Paulo, Santos, 2007a. Disponível em: <http://www.spmv.org.br/conbravet2007/dados/trabalhos/aves/082.doc>. Acesso em: 20 Ago. 2009a.

GARCIA, K.O.; FAGLIARI, J.J.; BERCHIERI JÚNIOR, A; SANTANA, A.M.; PENHA FILHO, R.A.C.; VIEIRA B.S.; Perfil eritrocitário e leucocitário de aves de postura experimentalmente infectadas por *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 34, 2007b. Santos – SP. **Trabalho Científico...** São Paulo, Santos, 2007b. Disponível em: <http://www.spmv.org.br/conbravet2007/dados/trabalhos/aves/088.doc>. Acesso em: 20 Ago. 2009b.

GARCIA, K.O.; FAGLIARI, J.J.; FREITAS NETO, O.C.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; SANTANA, A.M. Perfil bioquímico sérico de aves de postura experimentalmente infectadas por *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum. In: Congresso de produção, comercialização e consumo de ovos, 5, 2007c, Indaiatuba-SP. **Anais...** São Paulo: Associação Paulista de Avicultura, 2007c, p. 72-73.

GARCIA, K.O.; GALDINO, V.M.C.A.; FREITAS NETO, O.C.; SANTANA, A.M.; BERCHIERI JÚNIOR, A; FAGLIARI, J.J.; Estudo da cinética de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas de aves de postura experimentalmente infectadas por *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum. In: Congresso de produção, comercialização e consumo de ovos, 7, 2009, São Pedro-SP. **Anais...** São Paulo: Associação Paulista de Avicultura, 2009, p. 224-226.

GORDON, R. F.; GARSIDE, J. S.; TUCKER J. F. The use of living attenuated vaccines in the control of fowl typhoid. **Veterinary Record**, London, 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. **Veterinary Record**, London, v. 71, 145, p. 926-927, 1959.

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

GRUYS E., OBWOLO M.J., TOUISSANT M.J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary Bulletin**, Weybridge, v.64 p.1009-1018, 1994.

HALL, W.A. Fowl Typhoid In: BIESTER, H.E.; SCHWARTE, L.H. (Ed.). **Diseases of poultry**, Iowa: State University Press, 1991.p. 87-99.

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

INOUE, A. Y. Vacinação de reprodutoras pesadas contra *Salmonella* Enteritidis: Efeitos na transmissão e contaminação de progênie. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, Santos – SP, 2007. **Anais...** Campinas: FACTA, 2007, p. 215-235.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A.; OKABAYASHI, S. Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. In: MENDES, A.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004, p.233-236.

JEONG, J.H.; SONG, M.; PARK, S.I.; CHO, K.O.; RHEE, J.H.; CHOY, H.E. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 19, p. 6340-6350, 2008.

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

JONES, M.A.; WIGLEY, P.; KERRIE, L.; PAGE, L.; SCOTT, D.; BARROW, P. *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. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5471-5476, 2001.

KAISER, P.; ROTHELL, L.GALYOV, E.E.; BARROW, P.A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytoquine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology**, London, v.146, p. 3217-3226, 2000.

KAMPELMACHER, E. H. Poultry disease and public health. **British Poultry Science**, London, v. 28, n. 1, p. 3-13, 1987.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 6th ed, Academic Press, New York, 2009. 916p.

KIM, A.; LEE, Y.J.; KANG, M.S.; KWANG, S.I.; CHO, J.K.; Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. **Journal of Veterinary Science**. Suwõn-si, v.8, p155-161, 2007.

KOCABAGLI, N.; RIOND, J.; SPICHIGER, U.E.; WANNER, M. Parathyroid hormone-related protein and calcium homeostasis during the periparturient period of dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg v.56, n.3, p.380-385, 1995.

KOKOSHAROV, T. Changes in the white blood cells and specific phagocytosis in chicken with experimental acute fowl typhoid. **Veterinarski Arhiv**, Zagreb, v.68, p.33-38, 1998.

LEE, Y.J.; KIM, H.J.; PARK, C.K.; KIM, K.S.; BAE, D.H.; KANG, M.S.; CHO, J.K.; KIM, A.; KIM, J.W.; KIM, B.H. Characterization of *Salmonella* spp. isolated from a integrated broiler chicken operation in Korea. **Journal of Veterinary Medical Science**. Tokyo, v.69, p. 399-404, 2007.

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

LUCAS, A.M.; JAMROZ, C. **Atlas of avian hematology**. Washington: U.S. Department of Agriculture, 1961, monograph, v.25, 271p.

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

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**, London, v. 150, n. 5, p. 1385-1395, 2004.

MAGGIO-HALL, L. A.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. In vitro synthesis of the nucleotide loop of cobalamin by *Salmonella typhimurium* enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A**, Washington, v. 96, n. 21, p. 11798–11803, 1999.

MARTIN, L.G. Hypercalcemia and Hypermagnesemia. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.23, p.565-83, 1998.

MASTROENI, P.; CHABACAGOITY, S.J.; DUNSTAN, S.J. MASKELL, D.J.; DOUGAN, G. Review. *Salmonella*: Immune responses and vaccines. **British Veterinary Journal**, London, v.161, p.132-164, 2000.

MEYER, D.J. ; COLES, E.H. ; RICH, L.J. **Medicina de Laboratório Veterinária**. São Paulo : Roca, 1995. 307p.

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

MORGULIS, M.S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002, 375p.

NATT, M.P.; HERRICK, C.A. a new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, Champaign, v.31, n.4, p.735-738, 1952.

NORIEGA, M.L.V.C. **Apuntes de hematología aviar**. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2000, 70p. (Apostila).

OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, A. C. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n.1, p.51-56, 2005.

ORJI, M.U. ; ONUIGBO, H.C. ; MBATA, T.I. Isolation of *Salmonella* from poultry droppings and other environmental sources in Awka, Nigeria. **International Journal of Infectious Diseases**. Hamilton, v.9, p.86-89, 2005.

PAIVA, J.P.; PENHA FILHO, R.A.C.; ARGUELLO, Y.M.S.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; LEMOS, M.V.F.; BARROW, P.A. A defective mutant of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum in cobalamin biosynthesis is avirulent in chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.40, p.495-504, 2009.

PENHA FILHO, R.A.C. 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. 2009. 72p. **Dissertação (Mestrado em Patologia Animal)** – Faculdade de Ciências Agrárias de Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2009.

PEREIRA, M.S.; SILVA, P.L. Prevalência de anticorpos contra *Salmonella Pullorum* e identificação bacteriológica de *Salmonella* sp em galinhas “caipiras” em Uberlândia (MG). **Guia avicultura industrial**, Uberlândia, n.6, p.22-23, 2005.

PEREIRA, V. L. A.; SILVA, G. M.; LEMOS, M. Presença de *Salmonella* em frangos de corte aparentemente saudáveis em unidades de criação industrial na região de São José do Vale do Rio Preto – RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.6, n.3, p.156-161, 1999.

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

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.

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. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 8, p. 2463-2475, 2001.

QURESHI, M. A. Role of macrophages in avian health and disease. **Poultry Science**, Champaign, v 77, n. 7, p. 978-982, 1998.

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

RICHARDSON, D.J. (2000). Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. **Microbiology**, London, v.146, p.551-571, 2000.

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. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 13, n. 3, p. 541-553, 1994.

RIBEIRO, S.A.M.; PAIVA, J.B.; ZOTESSO, F.; LEMOS, M.V.F.; BECHIERI JÚNIOR, A. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.40, p.184-188, 2009.

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 Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 49, n. 14, p. 1-7, 2007.

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*. **Journal of Bacteriology**, Washington, 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.

SCHIMIDT, E.M.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E; PAULILLO, A.C. Clinical pathology in poultry – A tool to improve poultry health – a review. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.12, n.3. p. 9-20, 2007.

SERRA, C.R.B. Contribuição das proteínas de fase aguda na monitorização das doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 37, n.3, p.152-158, 1997.

SHAH, D.H.; LEE, M.J.; PARK, J.H.; LEE, J.H.; EO, S.K.; KWON, J.T.; CHAE, J.S. Identification of *Salmonella* Gallinarum virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. **Microbiology**, London, v.151, p.3957–3968, 2005.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, SM.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**. Recife, v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.

SHIVAPRASAD, H. L. Pullorum disease and fowl typhoid. In: CALNEK, B. W. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1997, p. 82-96.

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

SILVA, E.N. The *Salmonella gallinarum* problem in Central and South America. In: **Proceedings of the International Symposium on Salmonella**, New Orleans (G.H. Snoeyenbos, ed.). American Association of Avian Pathologists, Keneth Square, p.150-156, 1984.

SILVA, P.R.L., FREITAS NETO, O.C., LAURENTIZ, A.C., JUNQUEIRA, O.M., FAGLIARI, J.J. Blood serum components and serum protein test of Hybro-PG broilers of different ages. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.9, p.213-216, 2007.

SMITH, H.W. Observations on experimental fowl tiploid. **Journal of Comparative Pathology**, New York, V.65, p.37-57, 1955.

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

SNOEYENBOS,G.H. Pullorum disease. In : CALNEK, B.W. ;BARNES, H.I. ;REID, W.M. ; JODER, H.W. (Ed.). **Diseases of poultry**. Ames :Iowa State University Press, 1991. p. 73-86.

STOCKHAM, S.L. Anemia associated with bacterial and viral infections. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 163-168.

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. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 6, p. 3392-3401, 2003.

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

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

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.214, p.4406-4412, 1969.

WIGLEY, P.; HULME, S.D.; BUMSTEAD, N. ; BARROW, P.A. In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the *SAL1* locus. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, p.1111-1120, 2002.

WIGLEY P.; HULME, S.D.; 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. **Veterinary Research**, Paris, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2005.

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

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

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A.K.; DOUGAN, G.; BARROW, P.A. Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a *nuoG* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum. **Vaccine**. Surrey, v.16, p.899-903, 1998.