

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DA PATOGENIA DE ESTIRPES DE *Salmonella*
***enterica* SUBSP. *enterica* SOROTIPO GALLINARUM**
BIOVAR GALLINARUM COM OS GENES RESPONSÁVEIS
PELA EXPRESSÃO DE FLAGELO ATIVOS

Priscila Diniz Lopes

Médica Veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA PATOGENIA DE ESTIRPES DE *Salmonella*
enterica SUBSP. *enterica* SOROTIPO GALLINARUM
BIOVAR GALLINARUM COM OS GENES RESPONSÁVEIS
PELA EXPRESSÃO DE FLAGELO ATIVOS**

Priscila Diniz Lopes

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior
Coorientador: Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto

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).

2013

Lopes, Priscila Diniz
L864a Avaliação da patogenia de estirpes de *Salmonella enterica*
SUBSP. *enterica* sorotipo Gallinarum biovar Gallinarum com os
genes responsáveis pela expressão de flagelo ativos / Priscila
Diniz Lopes. – – Jaboticabal, 2013
xvi, 64 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Co-orientador: Oliveira Caetano de Freitas Neto

Banca examinadora: Antonio José Piantino Ferreira,
Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Bibliografia

1. *Salmonella* Gallinarum. 2. Flagelo. 3. Patogenia. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.981.49:636.5



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA PATOGENIA DE ESTIRPES DE *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SOROTIPO GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM COM OS GENES RESPONSÁVEIS PELA EXPRESSÃO DE FLAGELO ATIVOS

AUTORA: PRISCILA DINIZ LOPES

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANGELO BERCHIERI JUNIOR

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

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

Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

Pós-Doutorando / Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ PIANTINO FERREIRA

Universidade de São Paulo / São Paulo/SP

Data da realização: 03 de dezembro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PRISCILA DINIZ LOPES – nascida em 24 de março de 1986, na cidade de Machado, Minas Gerais. Médica Veterinária formada em dezembro de 2010, na Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, em Andradina, São Paulo. Durante o curso de graduação, foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), na modalidade de Iniciação Científica, no período de abril de 2009 a março de 2010, sob orientação da Prof. Ms. Camila Motta Marin Bernardi, na área de nutrição animal, com o trabalho intitulado “Desempenho de leitões órfãos sob dois níveis de leite em pó na ração”. Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Mestrado, área de concentração em Patologia Animal, subárea de Patologia Aviária), na FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e coorientação do Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto. Foi bolsista da FAPESP durante o mestrado.

Aprendi com o Mestre dos Mestres que a arte de pensar é o tesouro dos sábios. Aprendi um pouco mais a pensar antes de reagir, a expor - e não impor - minhas ideias e a entender que cada pessoa é um ser único no palco da existência.

Aprendi com o Mestre da Sensibilidade a navegar nas águas da emoção, a não ter medo da dor, a procurar um profundo significado para a vida e a perceber que nas coisas mais simples e anônimas se escondem os segredos da felicidade.

Aprendi com o Mestre da Vida que viver é uma experiência única, belíssima, mas brevíssima. E, por saber que a vida passa tão rápido, sinto necessidade de compreender minhas limitações e aproveitar cada lágrima, sorriso, sucesso e fracasso como uma oportunidade preciosa de crescer.

Aprendi com o Mestre do Amor que a vida sem amor é um livro sem letras, uma primavera sem flores, uma pintura sem cores. Aprendi que o amor acalma a emoção, tranquiliza o pensamento, incendeia a motivação, rompe obstáculos intransponíveis e faz da vida uma agradável aventura, sem tédio, angústia ou solidão. Por tudo isso Jesus Cristo se tornou, para mim, um Mestre Inesquecível.

Augusto Cury

À minha avó (*in memoriam*) que sempre teve orgulho de dizer que teria uma neta mestre e futuramente doutora e infelizmente não pode dividir esse momento comigo.

Aos meus pais que sempre apoiaram minhas decisões e tiveram muito amor e paciência em todos os momentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu força e coragem para chegar até aqui, que me amparou por tantas vezes que quis desistir. Sem Ele, eu nada seria.

Aos meus pais, Meire e Sebastião, fonte de amor, respeito e dedicação. Amo vocês incondicionalmente, sempre e para sempre, meu porto seguro.

Aos meus irmãos Douglas e Karina, que sempre tiveram ao meu lado, me apoiando e chamando atenção quando necessário.

Aos meus amigos Janine, Bruna, Silvia, Mariana (Cuba), Andrei (Xorado), Diego, Ketherson, D. Ivete, Olívia, Heloísa, Mayara, Anny, Juliana, Letícia, Bruno, Paula, Adriana e todos os outros que conheci durante essa fase aqui em Jaboticabal. Sem vocês minha vida aqui não teria graça.

A toda equipe do laboratório, que me ensinaram e ajudaram, dedicando seu tempo para estar ao meu lado, acompanhando todos os desafios durante o mestrado. A Adriana, o Diego e a Janine minha eterna gratidão, vocês sempre me ajudaram e tiveram paciência de me ensinar.

Aos colegas dos outros laboratórios, Prof. Rosangela, Prof. Rose, Aline, Miguel, Márcia, entre outros, que no momento de desespero, ajudaram, emprestaram seus equipamentos e iluminaram as várias dúvidas que surgiram.

Agradeço ao Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho, a professora Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos e ao professor Antonio José Piantino Ferreira pela disponibilidade, apoio e pelas sugestões para a melhoria da dissertação.

Ao meu orientador e co-orientador, Angelo Berchieri Junior e Oliveira Caetano de Freitas Neto, que me aceitaram no mestrado e acreditaram que eu poderia dar o meu melhor, além da paciência e orientação durante toda essa fase.

E a todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente para que eu finalizasse o mestrado.

A FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

A CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Muito obrigada!!!

AUXÍLIO FINANCEIRO

Este projeto teve bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, sob o processo nº 2011/14763-0

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Etiologia e Taxonomia de <i>Salmonella</i> spp.....	3
2.2 Salmoneloses aviárias.....	4
2.3 Tifo aviário.....	5
2.3.1 Distribuição e epidemiologia.....	5
2.3.2 Patogenia	6
2.3.3 Sinais clínicos e alterações anatomopatológicas	8
2.4 Estrutura e motilidade do flagelo	9
2.5 O reconhecimento do flagelo e a interação com o sistema imune	10
3. OBJETIVOS	13
3.1 Geral.....	13
3.2 Específicos	13
3.2.1 Comparar a mortalidade entre as aves desafiadas com as diferentes estirpes;.....	13
3.2.2 Analisar a infecção sistêmica por meio de contagem bacteriana em conteúdo cecal, baço e fígado;.....	13
3.2.3 Avaliar lesões macro e microscópicas provocadas em ingluvío, fígado, baço, bolsa cloacal, tonsilas cecais e ceco;	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Bactérias	14
4.2 Aves	14
4.3 Cultivos de SG Fla ⁺ e SG Fla ⁻ e preparo dos inóculos de SG, SG Fla ⁺ e SG Fla ⁻	14
4.3.1 Detecção da motilidade de SG Fla ⁺ e do estado estático de SG Fla ⁻	15
4.4 Ensaio <i>in vivo</i> . Avaliação da patogenia	16
4.4.1 Delineamento experimental	16
4.4.1.1 Experimento 01: Avaliação da mortalidade e excreção fecal	16
4.4.1.2 Experimento 02	17

4.4.1.2.1	Avaliação da infecção sistêmica	18
4.4.1.2.2	Avaliação de lesões macro e microscópicas	18
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
6.	RESULTADOS	20
6.1	Cultivo de SG Fla ⁺ e SG Fla ⁻	20
6.2	Ensaio <i>in vivo</i>	20
6.2.1	Avaliações dos sinais clínicos e mortalidade	21
6.2.2	Excreção fecal	23
6.2.3	Avaliação da infecção sistêmica	23
6.2.4	Avaliações das lesões macroscópicas	25
6.2.5	Análise histopatológica	28
7.	DISCUSSÃO	39
8.	CONCLUSÕES	45
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	APÊNDICES	54
	1A: Média (log ₁₀) do número de células viáveis (UFC/g) em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal de aves desafiadas aos cinco dias de vida com SG, SG Fla ⁺ e SG Fla ⁻ em diferentes intervalos	55
	1B: Alterações microscópicas observadas em diferentes intervalos de aves desafiadas com a estirpe selvagem de <i>Salmonella</i> Gallinarum no quinto dia de vida	56
	2B: Alterações microscópicas observadas em diferentes intervalos de aves desafiadas com a estirpe mutante de <i>Salmonella</i> Gallinarum Fla ⁺ no quinto dia de vida	59
	3B: Alterações microscópicas observadas em diferentes intervalos de aves desafiadas com a estirpe mutante de <i>Salmonella</i> Gallinarum Fla ⁻ no quinto dia de vida	62

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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

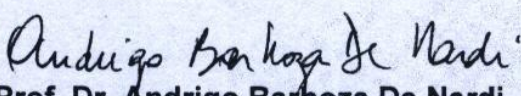


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 023482/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação da patogenia de estirpes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum com os genes responsáveis pela expressão de flagelo ativos.**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião extraordinária de 18 de novembro de 2011.

Jaboticabal, 21 de novembro de 2011.


Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Presidente - CEUA

AVALIAÇÃO DA PATOGENIA DE ESTIRPES DE *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SOROTIPO GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM COM OS GENES RESPONSÁVEIS PELA EXPRESSÃO DE FLAGELO ATIVOS

RESUMO - O tifo aviário é uma doença sistêmica provocada por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG), bactéria que não possui flagelos. Acredita-se que por não produzir flagelos, SG seria pouco reconhecido pelo sistema imune. Deste modo provocaria inflamação de menor intensidade na mucosa, atravessando as barreiras intestinais com mais facilidade e assim desencadeando enfermidade sistêmica severa. Com intuito de investigar essa hipótese, em estudo prévio, construiu-se um mutante de SG capaz de produzir flagelos (SG Fla⁺) o qual desencadeou resposta imune pro-inflamatória em células de cultivo, além de ter sido menos patogênico para as aves que a estirpe selvagem de SG. No entanto, notou-se que SG Fla⁺ tende a interromper a produção de flagelos após dois ou mais cultivos consecutivos em meio sólido, tornando-se fenotipicamente aflagelado (SG Fla⁻). O presente estudo teve por objetivo comparar a patogenicidade de SG Fla⁺, SG Fla⁻ e SG para aves susceptíveis ao tifo aviário. No primeiro experimento, as taxas de mortalidade provocadas pelas estirpes e excreção fecal das mesmas foram avaliadas. Enquanto que no segundo ensaio, avaliou-se a capacidade de colonização cecal, invasão das estirpes em fígado e baço e ainda a presença e intensidade de lesões macro e microscópicas em órgãos. SG Fla⁺ provocou mortalidade inferior às estirpes aflageladas, quando utilizou-se o inóculo diluído (10⁶ UFC). Os resultados da excreção fecal demonstram que SG Fla⁺ foi a estirpe mais excretada. Pôde-se observar que SG e SG Fla⁻ foram recuperadas do conteúdo cecal em quantidades mais elevadas que SG Fla⁺. SG e SG Fla⁻ foram isoladas mais cedo e em maiores quantidades que SG Fla⁺ em fígado e baço. No fígado verificou-se hepatomegalia, degeneração, congestão, alterações na coloração (amarelo-esverdeado a esverdeado), reatividade linfóide e áreas de necrose multifocais. No baço havia esplenomegalia, congestão, focos de necrose na polpa branca e depleção linfocitária. Na bolsa cloacal notou-se depleção linfóide e infiltrados polimorfonucleares. Na mucosa e submucosa do ceco foi observado edema, dilatação de vasos linfáticos e na mucosa havia atrofia de vilosidades. Todos estes achados foram mais pronunciados em aves inoculadas com SG Fla⁻ e SG. A reatividade linfóide no parênquima hepático foi mais intensa em aves desafiadas com SG Fla⁺. Ao que tudo indica a síntese de flagelos não foi estimulada em SG Fla⁻ durante a infecção de aves. Sendo assim, SG Fla⁻ apresentou patogenicidade semelhante à estirpe selvagem sendo mais patogênica que SG Fla⁺.

Palavras-chave: aves, flagelo, patogenicidade, reversão de fenótipo, *Salmonella Gallinarum*.

EVALUATION OF PATHOGENESIS OF STRAINS OF *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SEROVAR GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM WITH ACTIVE GENES RESPONSIBLE FOR FLAGELLA EXPRESSION

ABSTRACT - The fowl typhoid is a systemic disease of chickens caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG), a microorganism that does not produce flagella. It is suggested that due to the absence of flagella SG is poorly recognized by the bird immune system. As a result, just a mild inflammation is induced in the gut mucosa, favoring the development of a severe systemic infection. In order to investigate this hypothesis, in a previous study, a mutant of SG capable of producing flagella (SG Fla⁺) was constructed. This mutant was able to trigger mRNA pro-inflammatory cytokines e chemokines in cultured cells and was less pathogenic to birds than the wild type strain. However, it was noticed that SG Fla⁺ trends to stop flagella production after culturing two or more times on solid medium, becoming non-flagelated (SG Fla⁻). The present study aimed at comparing the pathogenicity of SG Fla⁺, SG Fla⁻ and SG to birds. In the first experiment, mortality rates caused by strains and fecal excretion were evaluated. In the second assay, the ability of strains in colonizing the ceca and invading liver and spleen were compared. In addition to this, the presence and intensity of macroscopic and microscopic lesions in organs were evaluated. When inoculated in the lower amount (10⁶ CFU) SG Fla⁺ provoked less mortality than the non-flagellate strains. The results of fecal excretion indicate that SG Fla⁺ was more excreted than the other strains. It was observed that SG and SG Fla⁻ were recovered from cecal contents in higher amounts than SG Fla⁺. SG Fla⁻ and SG were isolated earlier and in higher amounts from liver and spleen. In the liver degeneration, congestion, changes in color (greenish-yellow to greenish), lymphoid reactivity and multifocal areas of necrosis were noticed. Spleen was enlarged and congested; foci of necrosis in the white pulp and lymphoid depletion were also observed in this organ. In cloacal bursa was noticed polymorphonuclear infiltrates and lymphoid depletion. In ceca was observed edema of mucosa and submucosa, dilation of the lymphatic vessels and villous atrophy. All these findings were more pronounced in birds inoculated with SG and SG Fla⁻. The lymphoid reactivity in the hepatic parenchyma was more intense in birds challenged with SG Fla⁺. Apparently the flagellar synthesis was not stimulated in SG Fla⁻ during infection of birds. The pathogenicity of SG Fla⁻ was similar to the wild type strain; both SG and SG Fla⁻ were more pathogenic than SG Fla⁺.

keywords: poultry, flagellum, pathogenicity, phenotype reversion, *Salmonella* Gallinarum.

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1. Grupos de animais desafiados com SG, SG Fla ⁺ e SG Fla ⁻ no quinto de vida para avaliação de sinais clínicos, excreção fecal e mortalidade.	16
Tabela 2. Grupos de aves não desafiadas e desafiadas com SG, SG Fla ⁺ e SG Fla ⁻ no quinto de vida para avaliação da infecção sistêmica.	18
Tabela 3. Mortalidade das aves desafiadas experimentalmente com as estirpes SG, SG Fla ⁺ e SG Fla ⁻ aos cinco dias de vida, em grupos contendo 30 animais.	21
Tabela 4. Número de suabes positivos após a inspeção da cloaca de aves desafiadas experimentalmente com as estirpes SG, SG Fla ⁺ e SG Fla ⁻ , aos cinco dias de vida.	23

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- Figura 1.** Ágar semissólido inoculado com as estirpes SG Fla⁺(1) e SG Fla⁻(2) após 24 horas de incubação a 28 °C. Borda do halo de multiplicação (*) indica presença (1) /ausência (2) de motilidade.20
- Figura 2.** Alterações clínicas e anatomopatológicas em aves desafiadas com SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻. (A) Notar sinais clínicos como apatia, penas eriçadas e olhos semicerrados no 4º dpi em ave desafiada com SG; (B) Ave desafiada com SG aos 28 dpi apresentando hepatomegalia, congestão e ponto esbranquiçado localizado no lóbulo direito (seta); (C) Congestão e esplenomegalia (seta) em ave desafiada com SG Fla⁻ aos 28 dpi; (D) Fígado de ave desafiada com SG Fla⁺ aos 28 dpi não apresentando alterações macroscópicas.22
- Figura 3.** Média (log₁₀) do número de células viáveis (UFC/g) em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal de aves desafiadas aos cinco dias de vida com SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻. Asterisco (*) indica diferença entre médias das contagens bacterianas pelo teste de Tukey (*P*<0,05).24
- Figura 4.** Alterações macroscópicas em aves desafiadas com as estirpes SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 2º dpi. (A) Ave desafiada com SG apresentando hepatomegalia e degeneração (seta); (B) Fígado de ave desafiada com SG Fla⁺ sem alterações macroscópicas (seta); (C) Fígado de ave desafiada com SG Fla⁻ apresentando hepatomegalia acentuada e parênquima amarelado (seta); (D) Aspecto macroscópico do ceco de ave desafiada com a estirpe de SG Fla⁻. Espessamento da parede cecal (seta), com presença de sangue (*) no lúmen intestinal.26
- Figura 5.** Alterações macroscópicas de aves desafiadas com SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 7º dpi. (A) Fígado (seta) e baço (asterisco) de uma ave não desafiada com 12 dias de idade; Aves desafiadas com SG (B), SG Fla⁺ (C) e SG Fla⁻ (D) apresentando hepatomegalia com a coloração do fígado variando de castanho-esverdeado a vermelho-escuro (seta) e esplenomegalia (asterisco).27

Figura 6. Proporções de escores de lesões microscópicas em ingluvío de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escores de intensidade de lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na figura da seguinte forma: H.E. (Hiperplasia epitelial); D.E. (Descamação epitelial); R.L. (Reatividade linfóide em lâmina própria); D.C.M. (Degeneração da camada muscular); H.C.M. (Hipertrofia de células musculares); I.C.I. (Infiltrado de células inflamatórias na camada muscular).....29

Figura 7. Proporções de escores de lesões microscópicas em fígado de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: D.H. (Degeneração hepática); N (Áreas de necrose); C.I. (Células inflamatórias na região de necrose); R.L. (Reatividade linfóide em parênquima hepático); G (Granulomas); H.V. (Hipertrofia da parede dos vasos); C.V.S. (Congestão de vasos e sinusóides); I.P. (Inflamação perivascular).....30

Figura 8. Proporções de escores de lesões microscópicas em baço de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas).30

Figura 9. Proporções de escores de lesões microscópicas em bolsa cloacal de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas).31

Figura 10. Proporções de escores de lesões microscópicas em tonsila cecal de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas).31

Figura 11. Proporções de escores de lesões microscópicas em ceco de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: I.I.M. (Infiltrado inflamatório mononuclear); D.A. (Desnudamento apical de vilos); A.V. (Atrofia de vilosidade); E.SM. (Edema de submucosa); D.L.M. (Dilatação linfática de mucosa); D.L.SM. (Dilatação linfática de submucosa).32

Figura 12. Fotomicrografia do ingluvírio de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 1º dpi. (A) Inglúvio sem alterações de ave não desafiada; (B) Notar a reatividade linfóide em lâmina própria (seta) e hiperplasia do epitélio da mucosa em aves desafiadas com SG (grupo D); (C) Notar descamação epitelial (asterisco) e hiperplasia do epitélio da mucosa em ave desafiada com SG Fla⁺ (grupo E) (D) Notar a reatividade linfóide em lâmina própria (seta) e hiperplasia do epitélio da mucosa em aves desafiadas com SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 4x.33

Figura 13. Fotomicrografia de fígado de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 7º dpi. (A) Fígado sem alterações de ave não desafiada; (B) Notar inflamação focalmente extensa (seta) em ave desafiada com SG (grupo D); (C) Notar degeneração hepática difusa (asterisco) e reatividade linfóide no parênquima hepático (seta) em ave desafiada com SG Fla⁺ (grupo E); (D) Notar área de necrose no parênquima hepático (seta) em ave desafiada com SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 10x.34

Figura 14. Fotomicrografia do baço de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 5º dpi. (A) Baço sem alterações de ave não desafiada; (B) Notar rarefação linfóide na polpa branca (seta) em ave desafiada com SG (grupo D); (C) Notar hiperplasia de polpa branca (seta) em ave desafiada com SG Fla⁺ (grupo E); (D) Notar depleção linfocitária (asterisco) em ave desafiada com SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 10x.35

Figura 15. Fotomicrografia da bolsa cloacal de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 7º dpi. (A) Bolsa cloacal sem alterações de ave não desafiada; (B) Notar depleção linfocitária na região medular dos folículos (asterisco) em ave desafiada com SG (grupo D); (C e D) Notar infiltrado de células polimorfonucleares (heterófilos) nas regiões corticais dos folículos (seta) em aves desafiadas com SG Fla⁺ (grupo E) e SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 20x.36

Figura 16. Fotomicrografia da tonsila cecal de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻. (A) Tonsila cecal sem alterações de ave não desafiada; (B, C e D) Notar discretas áreas de hemorragia em aves desafiadas com SG (grupo D), SG Fla⁺ (grupo E) e SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 20x.37

Figura 17. Fotomicrografia do ceco de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 2º dpi. (A) Ceco sem alterações de ave não desafiada; (B) Observar infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta) e edema de submucosa (asterisco) em ave desafiada com SG (grupo D); (C) Notar desnudamento apical (seta) em ave desafiada com SG Fla⁺ (grupo E); (D) Notar edema de submucosa (asterisco) em ave desafiada com SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 10x.38

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* é composto por micro-organismos capazes de provocar enfermidades nos animais e zoonose de origem alimentar. Tendo em vista os prejuízos econômicos que podem acarretar, os programas de biossegurança para prevenir ou controlar a presença destas bactérias em aves de exploração comercial, recebem atenção especial.

Estão descritos mais de 2600 sorotipos de *Salmonella* spp., o sorotipo *Salmonella* Gallinarum possui duas variantes, os biotipos *Salmonella* Gallinarum (SG) e *Salmonella* Pullorum (SP) que são responsáveis por duas enfermidades sistêmicas nas aves, o tifo aviário e a pulorose, respectivamente. Os demais sorotipos podem acometer as aves causando o paratifo aviário.

O tifo aviário e a pulorose são doenças consideradas sob controle em países desenvolvidos, mas ainda estão presentes nos países em desenvolvimento, sendo diagnosticadas principalmente em áreas de produção de aves de postura, provocando alta mortalidade e morbidade, quedas de produção, além de gastos com medicamentos e medidas de controle, incluindo as vacinas.

Os biotipos SG e SP tem em comum a ausência de flagelos. Parece que este fato contribui para a severidade das enfermidades sistêmicas que provocam. As bactérias conseguiriam passar pelas barreiras intestinais, sendo pouco reconhecidas pelo sistema imune. Assim sendo, produziriam uma inflamação de menor intensidade na mucosa intestinal, evitando o reconhecimento pelo hospedeiro e facilitando a invasão de órgãos internos.

Salmonella Enteritidis (SE) é um dos sorotipos que causam o paratifo aviário. É genotipicamente semelhante aos biotipos SG e SP. Uma das características que o diferencia desses biotipos, é a presença de flagelos, uma estrutura que tem um importante papel na indução de produção de interleucinas pró-inflamatórias, além de poder estar envolvida na colonização intestinal.

No caso dos sorotipos flagelados, há reconhecimento da flagelina, um monômero proteico que compõe o filamento do flagelo, por receptores *Toll Like* de número 5 (TLR-5), que estão localizados na região basolateral dos enterócitos.

Quando ativados, esses receptores induzem a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que intensificam a reação inflamatória na mucosa intestinal. Como consequência, ocorreria diminuição da severidade da infecção sistêmica.

A ausência de flagelos em SG tem sido considerada uma adaptação do micro-organismo ao hospedeiro e uma das razões para sua agressividade. SG é um patógeno que possui importância em avicultura em razão dos prejuízos econômicos que provoca. Estudos que ajudem a compreender a relação hospedeiro-parasita e a elucidar os mecanismos de patogenicidade da bactéria podem contribuir para melhoria de programas de prevenção e controle do tifo aviário.

Em um estudo realizado por esse grupo de pesquisa foi possível produzir, por métodos moleculares, uma estirpe de SG capaz de expressar flagelos (SG Fla⁺) em condições especiais de cultivo. Após a infecção experimental de aves observou-se que SG Fla⁺ provocou mortalidade inferior, em comparação ao que foi observado no grupo infectado pela estirpe selvagem. Ao que tudo indica, a estirpe mutante apresentou grau de atenuação, devido à presença de flagelos. Ainda foi observado que em cultivo celular, a expressão gênica de CXCLi2, IL-6 e iNOS foi maior em células epiteliais infectadas com a estirpe mutante de SG Fla⁺ quando comparado a estirpe selvagem.

A expressão de flagelos em SG Fla⁺ pode ser observada em ágar semissólido. Entretanto, quando o mutante é cultivado em ágar nutriente por duas vezes consecutivas, tende a interromper a produção de flagelos, tornando-se um mutante fenotipicamente aflagelado (SG Fla⁻). A capacidade de produção da estrutura permanece inalterada e foi comprovada com o cultivo de SG Fla⁻ em ágar semissólido, condição em que o mutante volta a produzir flagelos.

O presente trabalho destina-se a estudar se o mutante SG Fla⁻, mesmo sendo capaz de produzir flagelos, se comportaria como a estirpe mutante de SG Fla⁺, que sofreu certo grau de atenuação, ou como a estirpe selvagem de SG que é altamente patogênica para as aves.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia e Taxonomia de *Salmonella* spp.

Os micro-organismos do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram-negativos, não esporulados, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos. Em sua grande maioria são móveis, devido à presença de flagelos peritríquios, embora os biotipos SP e SG sejam imóveis (SHIVAPRASAD, 2000; GAST, 2008; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Os membros do gênero *Salmonella* fermentam a glicose e outros açúcares e descarboxilam aminoácidos (lisina e ornitina); multiplicam em caldo nutriente simples e em meios seletivos (caldo ou ágar) para enterobactérias, como caldo selenito e ágar verde brilhante. O ambiente ideal para a multiplicação desses micro-organismos varia entre 35 - 43°C e pH entre 7,0 e 7,5 (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo que a espécie *enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (GRIMONT; WEILL, 2007). Atualmente estão descritos mais de 2600 sorotipos, dos quais, 1547 encontram-se na subsp. *enterica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Entre eles, estão os principais causadores das salmoneloses aviárias e cerca de 90 estão envolvidos em infecções alimentares em humanos (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Na classificação atual, os biotipos SP e SG por terem suas fórmulas antigênicas semelhantes, são considerados variantes do sorotipo *S. Gallinarum* (antígenos somáticos O: 1, 9, 12) (GRIMONT; WEILL, 2007).

A nomenclatura do gênero segue o esquema proposto por Popoff, Bockemühl e Hickman-Brenner (1996). Assim, para exemplificar, o biotipo SG deve ser descrito como: *Salmonella enterica* subspecie *enterica* sorotipo *Gallinarum* biotipo *Gallinarum*, ou de forma simplificada *Salmonella Gallinarum* (*S. Gallinarum*) (BRENNER et al., 2000; GRIMONT; WEILL, 2007).

2.2 Salmoneloses aviárias

As salmoneloses aviárias são enfermidades provocadas por bactérias do gênero *Salmonella*. Quando infectam as aves podem causar três enfermidades distintas; o tifo aviário, causado pelo biotipo SG, a pulorose cujo agente é o biotipo SP e o paratifo aviário, causado por qualquer *Salmonella* spp. que não sejam os biotipos SP e SG (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

SG e SP provocam doenças sistêmicas, podendo ocasionar a morte do hospedeiro sem causar comprometimento intestinal severo, sendo que não há relatos de envolvimento em infecções alimentares em seres humanos. Os sorotipos envolvidos no paratifo aviário não possuem hospedeiros específicos, colonizam de forma eficiente o trato entérico, podendo ou não causar infecção sistêmica e estão comumente envolvidos em infecções alimentares em seres humanos (BERCHIERI JUNIOR et al., 2001; BARROW, 2007; FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2008; SETTA et al., 2012).

Alguns fatores podem influenciar a colonização intestinal de sorotipos que causam o paratifo aviário. Dentre estes, destaca-se a virulência da estirpe, a imunidade do hospedeiro, o estresse (decorrente de fatores ambientais, transporte e doenças subclínicas), a exclusão competitiva, a qual micro-organismos colonizam o intestino e competem com outras bactérias, o pH estomacal, entre outros (BARROW, 2007; FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2008).

A enfermidade sistêmica provocada por SG e SP pode ser dividida em três fases distintas. A primeira fase se caracteriza por invasão do trato gastrointestinal. Na segunda, ocorreria a internalização da bactéria por células do sistema fagocitário mononuclear e consequente disseminação da mesma pelo organismo. Na última fase o micro-organismo é destruído pelo sistema imune, ou consegue se multiplicar causando a morte da ave. No entanto, em alguns casos, principalmente observados em infecções persistentes por SP, o sistema imune destrói quase todos os micro-organismos, mas uma pequena parte persiste em macrófagos do baço e a ave se torna portadora. Quando a ave passa por uma imunossupressão, como por exemplo,

no início da postura, facilita a ocorrência de nova disseminação sistêmica (CHAPPELL et al., 2009).

Existem duas hipóteses para explicar a persistência de SP em aves. Uma delas seria que a ausência de expressão do MHC por alguns macrófagos infectados faria com que os mesmos não fossem reconhecidos pelas células T CD8⁺ (CHAPPELL et al., 2009). Outra possibilidade seria que a principal resposta induzida por SP seria do tipo Th2, a qual é caracterizada por ativação de linfócitos B, elevada produção de anticorpos e fraca resposta imune celular, sendo essa a principal resposta envolvida na eliminação de patógenos intracelulares (SETTA et al., 2012).

A maioria das informações sobre doença sistêmica provocada por salmonela e a resposta imune do hospedeiro baseiam-se em modelos experimentais com camundongos infectados com *Salmonella* Typhimurium (STM). Nem sempre esses resultados podem ser extrapolados para outro modelo animal. Sendo assim, há necessidade de mais pesquisas com aves para compreensão do tifo aviário, pois a maioria dos estudos com esses animais utilizam salmonelas paratíficas (BARROW, 2007).

2.3 Tifo aviário

2.3.1 Distribuição e epidemiologia

O tifo aviário é uma enfermidade de distribuição mundial. Nos países desenvolvidos, como Estados Unidos e Canadá, a doença está sob controle, devido a programas nacionais de sanidade avícola (OIE, 2012). A doença ainda é um grande problema em países que têm intensificado sua produção avícola recentemente e/ou países tropicais, os quais apresentam dificuldade na aplicação de práticas adequadas de manejo e sanidade (BARROW, 1993; SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

SG acomete principalmente galinhas e perus, embora outras aves como faisões, codornas, pardais, papagaios, também são susceptíveis (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). O micro-organismo é altamente patogênico, provoca infecção sistêmica e acomete de forma severa aves de

qualquer idade, causando mortalidade de 40 a 80% do lote. O patógeno pode atingir toda a cadeia produtiva (aves de corte, galinhas poedeiras e aves reprodutoras). Portanto, medidas de controle como a eliminação de aves infectadas, o destino correto das carcaças, além de limpeza e desinfecção da granja devem ser adotadas (BARROW, 1993; PORTER JÚNIOR, 1998; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A principal via de transmissão de SG é a horizontal, embora existam alguns relatos antigos de transmissão vertical (BEACH; DAVIS, 1927; BEAUDETTE, 1930). Aves gravemente acometidas pelo tifo aviário aumentam a excreção de SG e consequentemente a transmissão para outras aves. Medidas de higiene ineficientes, presença de moscas, aves silvestres e roedores contribuem para disseminação de SG em propriedades avícolas. Veículos que transitam nas granjas e não recebem desinfecção adequada, pessoas que trabalham nas propriedades avícolas, bem como aves mortas e canibalismo são fatores importantes na transmissão do tifo aviário (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

2.3.2 Patogenia

Geralmente as infecções por SG em aves se iniciam por via oral. O organismo da ave possui barreiras químicas e físicas que, juntamente com o sistema imune, previnem e, caso necessário, combatem a infecção por SG. O ácido clorídrico presente no proventrículo e moela reduz o pH dessas regiões, inviabilizando a sobrevivência do micro-organismo. No entanto, logo após a ingestão do alimento, ocorre elevação do pH e essa barreira química deixa de existir (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009; CHAPPELL et al., 2009)

Com base nos estudos sobre a doença sistêmica em camundongos infectados com STM, acredita-se que o quadro da infecção seja semelhante à SG. Sendo assim, SG invade os enterócitos, penetrando no epitélio intestinal ou no tecido linfóide localizado nas placas de Peyer e tonsilas cecais (CHAPPELL et al., 2009; BARROW; FREITAS NETO, 2011; SETTA et al., 2012). Tem sido sugerido que a ausência de flagelos em SG resulta na não ativação de TLR-5 e consequente indução de resposta imune pró-inflamatória de menor intensidade na mucosa

intestinal durante o processo de invasão, o que favorece o desencadeamento da infecção sistêmica (CHAPPELL et al., 2009; FREITAS NETO et al., 2013).

Ao penetrar no intestino, SG atinge a lâmina própria e então é fagocitada por macrófagos e heterófilos (CHAPPELL et al., 2009). Graças à capacidade de síntese de estruturas complexas, SG é capaz de resistir à destruição pelos fagócitos (JONES et al., 2001). Durante a infecção, macrófagos infectados atingem a circulação linfática e atuam como transportadores de SG para diversos órgãos como fígado e baço (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A resposta imune adaptativa do tipo Th1, com elevados níveis de interferon gama (INF- γ), é a responsável pela destruição de SG presentes nos tecidos (WIGLEY et al., 2002; WIGLEY et al., 2006). O INF- γ atua nos macrófagos, que dessa forma ativa a enzima NADPH-oxidase responsável por produzir os intermediários reativos de oxigênio (radicais livres), potentes antimicrobianos capazes de destruir as bactérias presentes nos fagossomos. Outra função dessa molécula é ativar células do complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC I), as quais são responsáveis por apresentarem os antígenos bacterianos aos linfócitos T citotóxicos CD8⁺ para que estes destruam as células infectadas (CHAPPELL et al., 2009). De outro modo, quando a resposta imune adaptativa é insuficiente, ocorre a proliferação do micro-organismo, provocando muitas vezes, a morte do animal (FREITAS NETO et al., 2007).

A capacidade de SG invadir células do intestino e sobreviver no interior de macrófagos deve-se a regiões do genoma bacteriano denominadas ilhas de patogenicidade (SPI – “*Salmonella* Patogeniticy Islands”) (JONES et al., 2001; MORGAN, 2007). O sistema de secreção do tipo três (SSTT) codificado pela ilha de patogenicidade de número 1 (SPI-1) tem a finalidade de injetar proteínas efetoras no citoplasma celular, reorganizando o citoesqueleto das células epiteliais e facilitando a invasão do epitélio intestinal. A ilha de patogenicidade de número 2 (SPI-2) contém genes que codificam outro tipo de SSTT, o qual é necessário para a sobrevivência de SG no interior dos macrófagos. A SPI-2 atua na inativação da enzima NADPH-oxidase, evitando a morte de SG por intermediários reativos de oxigênio (HACKER et al., 1997; HENSEL, 2000).

Aves de linhagens leves são geralmente mais resistentes à SG, enquanto que aquelas de linhagens pesadas e semi-pesadas são consideradas susceptíveis (FREITAS NETO et al., 2007). A resistência à infecção bacteriana sistêmica em aves está relacionada à capacidade dos macrófagos em controlar e destruir o micro-organismo presente no seu interior (BUMSTEAD; BARROW, 1993; WIGLEY et al., 2002). Estudos demonstram que macrófagos oriundos de aves de linhagens resistentes à infecção bacteriana sistêmica são capazes de produzir maiores quantidades de radicais reativos de oxigênio gerados pela enzima NADPH-oxidase. Essas células também são capazes de produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias mais rapidamente e em níveis mais elevados quando comparados aos de macrófagos isolados de aves susceptíveis (WIGLEY et al., 2006).

2.3.3 Sinais clínicos e alterações anatomopatológicas

O tifo aviário é uma doença sistêmica aguda ou crônica. A manifestação clínica nas aves caracteriza-se por apatia, anorexia, desidratação, diarreia amarelo-esverdeada a esverdeada e queda na produção. Geralmente o curso da doença é de cinco a sete dias, mas pode se prolongar por mais tempo. Aves sobreviventes podem se tornar portadoras transitórias (SHIVAPRASAD, 2000; OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005; FREITAS NETO, et al., 2007)

Durante o quadro agudo, pode-se observar congestão e hepatoesplenomegalia. O fígado se torna friável, de coloração amarelo-esverdeada a bronzeada e com pontos amarelo-esbranquiçados, sugestivos de necrose, e hemorrágicos (FREITAS NETO et al., 2007; GARCIA et al., 2010). Microscopicamente podem ser observadas necrose multifocal e degeneração vacuolar dos hepatócitos. Já o baço se torna hemorrágico e com áreas de necrose multifocal. Na doença de curso mais longo é possível notar hidropericárdio e a presença de pontos amarelo-esbranquiçados esbranquiçados no coração, baço, pulmão, rins, moela, pâncreas, duodeno e algumas vezes no ceco (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009; GARCIA et al., 2010).

2.4 Estrutura e motilidade do flagelo

Flagelo é uma estrutura pertencente às bactérias móveis, responsável pela locomoção, que pode estar envolvido na colonização intestinal e na patogenidade de algumas bactérias como STM e SE (ALLEN-VERCOE; WOODWARD, 1999b; DIBB-FULLER; WOODWARD, 2000).

O flagelo pode ser encontrado em bactérias Gram-negativas (bastonetes) e Gram-positivas (bastonetes e cocos), sendo caracterizado segundo o número e arranjo celular como: monotríquios (um flagelo em um polo); anfitríquios (um flagelo em cada polo); lofotríquios (tufo de flagelos em um ou ambos os polos); e peritríquios (flagelos por toda a célula bacteriana) (CHEVANCE; HUGHES, 2008; AIZAWA, 2009).

Nas bactérias Gram-negativas, o flagelo possui estrutura complexa que consiste em três partes: o filamento, o gancho e o corpo basal. O corpo basal se encontra aderido à superfície celular, o filamento e o gancho estão localizados externamente à membrana celular (HARSHEY, 2003; AIZAWA, 2009).

O filamento é constituído por protofilamentos de subunidades de flagelina, dispostos paralelamente formando um cilindro oco (CHEVANCE; HUGHES, 2008). As porções inicial e final da flagelina são altamente conservadas e estão envolvidas na interação com receptores de reconhecimento padrão (PRRs) do hospedeiro. Enquanto que a porção central é uma região hipervariável, mesmo entre espécies ou subespécies do mesmo gênero. Desse modo, muitos sorotipos de *Salmonella* spp. são sorologicamente diferenciados pela região hipervariada da flagelina (AIZAWA, 2009).

As bactérias móveis possuem receptores em várias localizações, podendo estar dentro ou logo abaixo da parede celular. Quando captam estímulos positivos ou negativos, passam informações para os flagelos. O movimento de uma bactéria para se aproximar de um ambiente favorável ou para se afastar de um desfavorável é denominado taxia, que pode ser química (quimiotaxia) ou luminosa (fototaxia) (MACNAB, 1992).

2.5 O reconhecimento do flagelo e a interação com o sistema imune

O sistema imune inato possui receptores capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A capacidade do sistema imune reconhecer e responder aos componentes bacterianos e virais, como LPS, flagelina, lipoproteína e ácido nucleico, tem sido atribuída a uma família de proteínas transmembrana presentes em células do sistema imune e epiteliais, denominadas receptores “Toll-like” (TLR). Quando esses receptores são ativados, estimulam a produção de citocinas e quimiocinas necessárias para o desencadeamento da resposta imune (MEDZHITOV, 2001; AKIRA; TAKEDA, 2004; CHEN et al., 2009)

Os receptores citoplasmáticos “NOD-like” (NLRs) presentes em algumas células, como linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APCs), também estão envolvidos no reconhecimento de PAMPs e no controle de patógenos intracelulares. Esses receptores participam da regulação de sinais do fator nuclear kappa B (NF- κ B), na produção de interleucina 1 β (IL-1 β) e na morte celular (CHEN et al., 2009).

Quando patógenos penetram a barreira física do epitélio, os TLRs reconhecem os respectivos PAMPs desencadeando, dessa forma, a produção de proteínas adaptadoras como MyD88 (“Myeloid differentiation primary response gene-88”) e TRIF (“TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ”) as quais ativam a via de sinalização de MAPK (“Mitogen-activated protein kinases”) e NF- κ B, resultando na indução de mediadores pró-inflamatórios e antimicrobianos como IL-6, TNF- α (Fator de necrose tumoral- α) e IL-1 β (KAWAI; AKIRA, 2006; CHEN et al., 2009). Para complementar a defesa do hospedeiro, receptores NLRs utilizam como uma das vias de ativação a caspase-1, que induz secreção de IL-1 β e IL-18. A interação entre os receptores TLRs/NLRs com seus respectivos PAMPs é importante no desencadeamento de respostas imunes contra patógenos invasores (MIAO et al., 2007; STEINER, 2007)

A flagelina, monômero proteico que constitui o flagelo, é um PAMP detectado pelo sistema imune inato, sendo reconhecida por receptores TLR-5 em meio extracelular e no citoplasma por receptores NLRC4 (MIAO et al., 2007; CHEN et al., 2009). Ambos identificam regiões conservadas da flagelina, porém em locais

diferentes. TLR-5 são especificamente ativados pela flagelina, enquanto que a ativação de NLRC4 ocorre durante o reconhecimento de bactérias que expressam flagelina e também outros fatores de virulência, como o sistema de secreção tipo três (CHEN et al., 2009). Gewirtz et al. (2001) demonstraram que durante a infecção por *Salmonella* spp. ocorre o transporte de flagelina por meio de vacúolos até a superfície basolateral da monocamada de células do epitélio intestinal, onde TLR-5 estão localizados, induzindo resposta inflamatória. Posteriormente, comprovou-se que esse transporte seria dependente de uma vesícula produzida por genes presentes na SPI-2 (STEINER, 2007). Além disso, foi observado por meio de um estudo com a estirpe de STM, que a flagelina que ativa os receptores do sistema imune é sintetizada quando o micro-organismo entra em contato com moléculas de lisofosfolípídeos produzidas pelas células intestinais do hospedeiro (SUBRAMANIAN; QADRI, 2006). Entretanto, existem alguns autores que consideram que a ativação dos receptores ocorre no momento de despolimerização do flagelo ou pela quebra da estrutura, liberando monômeros de flagelina (MIAO et al., 2007).

Outro receptor relacionado ao reconhecimento da flagelina, pertencente a mesma família *Toll like*, porém de número 11, foi identificado recentemente em camundongos. O TLR-11 age independente do TLR-5 e também é um indutor de resposta imune inata e adaptativa. Entretanto, esse receptor está ausente em humanos e ainda não foi descrito em aves (MATHUR et al., 2012; SHI et al., 2012).

Os TLR-5 estão presentes em diferentes tipos de células, como por exemplo, células epiteliais do intestino e macrófagos. No caso de infecções por estirpes flageladas de *Salmonella* spp., os TLR-5 dos enterócitos são ativados e desencadeiam uma resposta imune pró-inflamatória rápida na mucosa intestinal. Isso ocorreria em decorrência da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-1 β , IL-6 e CXCLi2 as quais possuem a função de recrutar neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células dendríticas (DC) para o local da invasão (IQBAL et al., 2005; SUBRAMANIAN; QADRI, 2006). A flagelina ainda é capaz de ativar receptores de células T e DC, desencadeando resposta imune adaptativa (STEINER, 2007).

As informações sobre interações entre receptores do hospedeiro e a flagelina são originárias de modelos experimentais com mamíferos ou de estudos *in vitro* com cultivo de células epiteliais infectadas com STM (GEWIRTZ et al., 2001; SUBRAMANIAN; QADRI, 2006). Não se sabe até que ponto tais informações podem ser utilizadas para o entendimento da patogenia das salmoneloses aviárias.

Desse modo, é importante a realização de estudos com aves para melhor compreensão da resposta imune desencadeada durante a infecção por sorotipos de *Salmonella* spp.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar se o mutante SG Fla⁻ se comportaria do mesmo modo que a estirpe mutante de SG Fla⁺, a qual é parcialmente atenuada, ou como a estirpe selvagem, de alta patogenicidade para as aves.

3.2 Específicos

Inocular as estirpes SG Fla⁺ e SG Fla⁻ e a estirpe selvagem de SG em aves susceptíveis ao tifo aviário para:

3.2.1 Comparar a mortalidade entre as aves desafiadas com as diferentes estirpes;

3.2.2 Analisar a infecção sistêmica por meio de contagem bacteriana em conteúdo cecal, baço e fígado;

3.2.3 Avaliar lesões macro e microscópicas provocadas em inglúvio, fígado, baço, bolsa cloacal, tonsilas cecais e ceco;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias

Foram utilizadas a estirpe selvagem de *Salmonella* Gallinarum (SG) 287/91 (THOMSON et al., 2008), a qual foi utilizada para a construção das estirpes mutantes SG Fla⁺ e SG Fla⁻ (FREITAS NETO et al., 2013). As bactérias foram mantidas a -80°C na bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - campus de Jaboticabal (UNESP – FCAV).

4.2 Aves

No ensaio *in vivo* foram utilizadas aves de cinco dias de idade, susceptíveis ao tifo aviário de linhagem comercial para postura de ovos vermelhos. No momento da chegada das aves, foram colhidas amostras de mecônio do interior das caixas para pesquisa de *Salmonella* spp., conforme a metodologia descrita por Zancan et al. (2000). Os suabes foram colocados em frascos contendo caldo selenito (OXOID: CM 395), adicionado de novobiocina a 0,04 % (SN). Após incubação a 37 °C/ 24 horas, os caldos foram semeados em placas contendo ágar verde brilhante (VB) (OXOID: CM0263), que foram incubadas a 37 °C/ 24 horas.

As aves foram alojadas em baterias de cria em ambiente climatizado, recebendo água e ração *ad libitum*.

4.3 Cultivos de SG Fla⁺ e SG Fla⁻ e preparo dos inóculos de SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻

A estirpe mutante de SG Fla⁺ (armazenada em freezer -80 °C) foi semeada em placa de Petri contendo ágar de Luria Bertani (LB) (DIFCO: 240110) e incubada a 37°C/ 18 horas. Uma colônia de SG Fla⁺, com ajuda de um estilete estéril, foi

inoculada em ágar semissólido contendo uma solução a 0,9 % de caldo infusão de coração (OXOID: CM1032) e 0,25 % de ágar LB. Após a incubação do ágar a 28 °C/ 24 horas, tocou-se cuidadosamente a borda do crescimento bacteriano na superfície do ágar semissólido utilizando estilete estéril para inoculá-la em um frasco estéril contendo 10 mL de caldo de Luria Bertani (LB) (DIFCO: 240230), o qual foi incubado a 37 °C/ 24 horas sem agitação, sendo este usado como inóculo.

Para obtenção do fenótipo de SG Fla⁻, a cultura de SG Fla⁺ em caldo LB foi sucessivamente (três vezes) inoculada em um novo recipiente contendo caldo LB, incubado a 37 °C/ 24 horas em agitação (100 RPM). O último cultivo de SG Fla⁻ em caldo LB foi utilizado como inóculo.

O inóculo contendo a estirpe selvagem de SG foi preparado em caldo LB e incubado a 37 °C/ 24 horas em agitação (100 RPM).

As culturas continham, aproximadamente, 5×10^8 UFC/ mL. A estimativa foi feita seguindo o modelo adotado por Miles, Misra e Irwin (1938). Uma alíquota da cultura foi diluída decimalmente em 0,9 mL de solução salina, pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10. De cada diluição foi retirado 0,1 mL, e semeados em ágar VB contendo novobiocina (1 µg/ mL) e ácido nalidíxico (20 µg/ mL) (VB Nal/ Nov), que foram incubadas a 37 °C/ 24 horas. O resultado foi o número de colônias por mL (UFC/ mL) transformado em $\log_{10}$.

4.3.1 Detecção da motilidade de SG Fla⁺ e do estado estático de SG Fla⁻

Após o preparo dos inóculos, a motilidade de SG Fla⁺ e o estado estático de SG Fla⁻ foram verificados por microscópio de luz. Para isso, 25 µL de cada cultura foram alíquotados e despejados na superfície de uma lâmina de vidro. A gota foi cuidadosamente coberta com uma lamínula. Posteriormente, adicionou-se uma gota de óleo de imersão sobre a lamínula para verificar, em objetiva de 100x, a movimentação das células bacterianas. Foram realizados vídeos para comprovar a motilidade ou estado estático dos mutantes.

4.4 Ensaios *in vivo*. Avaliação da patogenicia

O ensaio *in vivo* seguiu o modelo adotado por Freitas Neto et al. (2007) e foi realizado no Laboratório de Ornitopatologia no Departamento de Patologia Veterinária da UNESP-FCAV.

4.4.1 Delineamento experimental

4.4.1.1 Experimento 01: Avaliação da mortalidade e excreção fecal

As aves foram separadas em grupos de acordo com as estirpes e doses utilizadas. Para cada estirpe (SG selvagem, SG Fla⁺, SG Fla⁻) foram utilizados dois grupos contendo 30 aves cada, totalizando seis grupos experimentais (A₁, B₁, C₁, A₂, B₂, C₂) (Tabela 1). No quinto dia de vida, aves de três grupos receberam oralmente 0,2 mL de uma cultura contendo aproximadamente $5,0 \times 10^8$ UFC/ mL e aves dos outros grupos receberam a mesma cultura diluída a 10^{-2} .

Tabela 1. Grupos de animais desafiados com SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no quinto de vida para avaliação de sinais clínicos, excreção fecal e mortalidade.

Estirpe	Grupos	Dose do inóculo	Quantidade de animais
SG	A ₁	1×10^8 UFC/mL	30
SG Fla ⁺	B ₁	1×10^8 UFC/mL	30
SG Fla ⁻	C ₁	1×10^8 UFC/mL	30
SG	A ₂	1×10^6 UFC/mL	30
SG Fla ⁺	B ₂	1×10^6 UFC/mL	30
SG Fla ⁻	C ₂	1×10^6 UFC/mL	30

Para a avaliação da excreção fecal foi pesquisado a presença de SG, SG Fla⁺, SG Fla⁻ nas fezes, nos momentos 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi), por meio da colheita de fezes cloacais com suabes estéreis de algodão. Os suabes foram colocados em frascos contendo 2 mL de caldo SN e incubados a 37 °C/ 24h. Após a incubação, as culturas foram semeadas em placas contendo ágar VB Nal/ Nov e incubadas a 37 °C/ 24h.

As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se os sinais clínicos e a mortalidade. As aves sobreviventes foram submetidas à eutanásia aos 28 dpi para a avaliação das alterações macroscópicas e pesquisa da bactéria inoculada em fígado, baço e conteúdo cecal. Os exames bacteriológicos consistiram de suabe do parênquima hepático, esplênico e de conteúdo cecal. Os suabes foram colocados em frascos contendo 2 mL de caldo SN e incubados a 37 °C/ 24h. Após a incubação, a cultura foi semeada em placa contendo ágar VB Nal/ Nov e incubada a 37 °C/ 24h.

4.4.1.2 Experimento 02

Neste ensaio foram utilizadas a estirpe selvagem (SG) e as mutantes (SG Fla⁺ e SG Fla⁻). 150 aves foram distribuídas em três grupos de 50 animais cada. No quinto dia de vida, aves de cada grupo (D, E e F) receberam oralmente 0,2 mL de culturas puras de SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻, respectivamente, como pode ser observado na Tabela 2. Um grupo controle (G) contendo 30 aves foi mantido separadamente com a finalidade de comparar possíveis lesões macro/microscópicas observadas em aves desafiadas.

Em cada intervalo de tempo estabelecido, cinco aves de cada grupo foram submetidas à eutanásia para analisar a infecção sistêmica, por meio de contagens bacterianas e exame macro e microscópico de órgãos.

Tabela 2. Grupos de aves não desafiadas e desafiadas com SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no quinto de vida para avaliação da infecção sistêmica.

Grupos	Dose do inóculo	Quantidade de animais
D	1x10 ⁸ UFC/mL	50
E	1x10 ⁸ UFC/mL	50
F	1x10 ⁸ UFC/mL	50
G	Não receberam inóculo	30

4.4.1.2.1 Avaliação da infecção sistêmica

Foram realizadas contagens bacterianas em amostras do conteúdo cecal e de fragmentos de fígado e baço. As amostras foram colhidas nos momentos 6, 12, 24 e 48 horas pós-infecção (hpi), 5, 7, 14, 21 e 28 dpi.

As amostras de conteúdo cecal, baço e fígado foram colocadas em solução salina tamponada (PBS), pH 7,4, na proporção de 1:10, maceradas e diluídas decimalmente em 0,9 mL de PBS. De cada diluição foi retirado 0,1 mL, o qual foi semeado em placas contendo ágar VB Nal/ Nov (OXOID: CM0263), que foram em seguida incubadas a 37 °C/ 24h. O número de colônias por grama de conteúdo cecal ou órgão, foi transformado em log₁₀ para análise dos resultados. Na ausência de colônias, foi adicionado igual volume de caldo SN (preparado em concentração dupla) aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10). O frasco foi incubado a 37 °C/ 24h e a seguir, seu conteúdo era semeado em ágar VB Nal/ Nov, com incubação a 37 °C/ 24h.

4.4.1.2.2 Avaliação de lesões macro e microscópicas

Após a eutanásia, as aves foram submetidas à necropsia para avaliar as alterações macroscópicas. A análise histopatológica foi realizada por meio de colheita de fragmentos de papo, fígado, baço, tonsilas cecais, ceco e bolsa cloacal nos momentos 1, 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dpi.

As amostras foram colocadas em solução de formol 10% tamponado com fosfato, pH 7,2, na proporção de 20:1 (solução fixadora: fragmentos de órgãos), onde permaneceriam pelo tempo mínimo de 24 horas.

Os fragmentos foram processados no Laboratório de Histopatologia da FCAV/UNESP, onde foram cortados a 4 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (BEHMER; TOLOSA; FREITAS NETO, 1976). A avaliação dos cortes histológicos foi realizada com auxílio de microscópio de luz equipado com câmera digital (NICKON ECLIPSE E 200 x COOLPIX 5400).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relativos à mortalidade e excreção fecal foram analisados pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (GREENWOOD; NIKULIN, 1996). Análises pelo método dos quadrados mínimos foram conduzidos para avaliar o efeito da multiplicação das estirpes nos diferentes órgãos. As médias das contagens bacteriológicas foram avaliadas pelo Teste de Tukey (DANIEL, 1991). Os testes foram realizados com auxílio do programa estatístico “R” (CHAMBERS, 2008) e o nível de significância dos mesmos foi 5% ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Cultivo de SG Fla⁺ e SG Fla⁻

As bactérias fenotipicamente flageladas (SG Fla⁺) e aflageladas (SG Fla⁻) foram obtidas com cultivo da estirpe mutante SG Fla⁺. A estirpe de SG Fla⁺ demonstrou motilidade quando inoculada em ágar semissólido, enquanto que SG Fla⁻ não produziu motilidade na superfície do ágar (Figura 1). Após este ensaio, os inóculos das estirpes mutantes e a selvagem foram preparados. A visualização dos esfregaços dos inóculos em objetiva de 100 x confirmou a motilidade de SG Fla⁺ e estaticidade de SG Fla⁻.

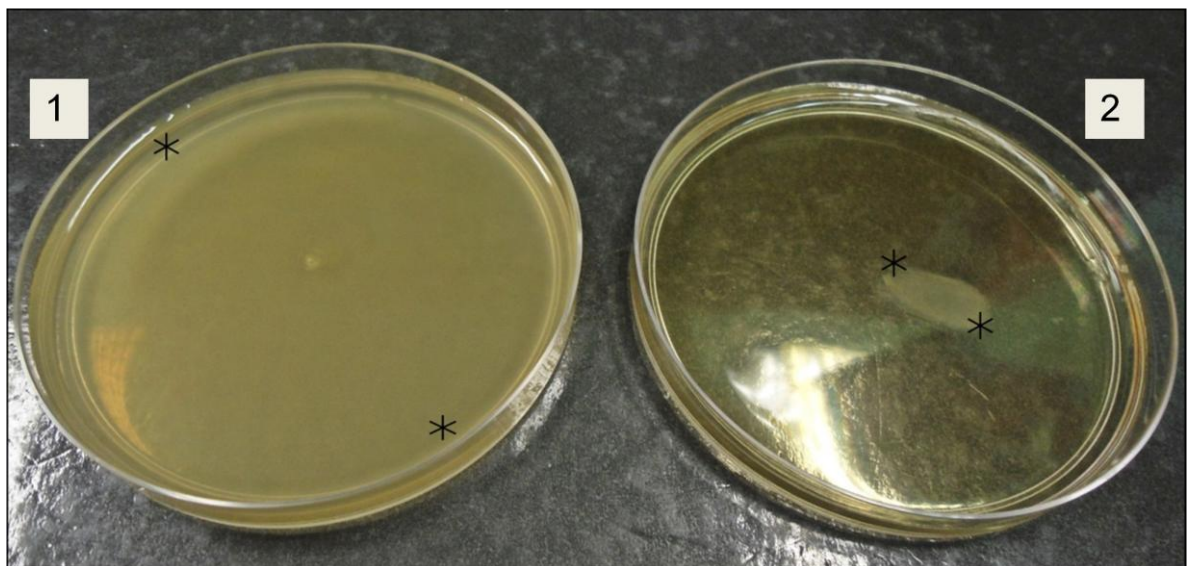


Figura 1. Ágar semissólido inoculado com as estirpes SG Fla⁺(1) e SG Fla⁻(2) após 24 horas de incubação a 28 °C. Borda do halo de multiplicação (*) indica presença (1) /ausência (2) de motilidade.

6.2 Ensaio *in vivo*

Os suabes das caixas de transporte realizados no momento da chegada das aves foram negativos para *Salmonella* spp.

6.2.1 Avaliações dos sinais clínicos e mortalidade

A mortalidade provocada pelas estirpes SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ está demonstrada na Tabela 3. Não houve diferença significativa entre as taxas de mortalidade de aves dos grupos A₁, B₁ e C₁ ($P>0,05$). Aves do grupo B₂ apresentaram taxa de mortalidade inferior às observadas naquelas dos grupos A₂ e C₂ ($P<0,05$).

Tabela 3. Mortalidade das aves desafiadas experimentalmente com as estirpes SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ aos cinco dias de vida, em grupos contendo 30 animais.

		Dias pós-infecção (dpi) *																
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	21		
Estirpe	Grupo	Mortalidade acumulada														Total	Mortalidade	
SG	A ₁	8	20	23		25								26			26 A	87%
SG Fla ⁺	B ₁		5	14	19	23		24	25				26		27		27 A	90%
SG Fla ⁻	C ₁	4	11	16	19	22	23		24	25							25 A	83%
SG	A ₂	3	4	6	9	10					12						12 ab	40%
SG Fla ⁺	B ₂			2	3	4	5					6				7	7 a	23%
SG Fla ⁻	C ₂	4	9	15		16	17			18							18 b	60%

*Registrou-se a mortalidade das aves durante 28 dpi, omitindo-se os dias sem mortalidade. Aves dos grupos A₁, B₁ e C₁ receberam 0,2 mL de cultura contendo aproximadamente 5×10^8 UFC/ mL e aves dos grupos A₂, B₂ e C₂ receberam 0,2 mL da mesma cultura diluída 100 x. Os totais de animais mortos seguidos por letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste do Qui-quadrado, com nível de significância de 5 % ($P<0,05$), considerando-se a mesma concentração do inóculo.

No 3º dia pós-infecção, alguns animais dos grupos B₁, B₂ (desafiados com SG Fla⁺) e C₁ (desafiados com SG Fla⁻) apresentaram diarreia amarelo-esverdeada, sendo que aos 5 dpi foi encontrado sangue nas fezes. Esses achados também foram notados em algumas aves dos grupos A₁, A₂ (desafiadas com SG) e C₂ (desafiadas com SG Fla⁻), no entanto iniciaram mais tardiamente; a partir do 5º dpi.

No 4º dpi, animais dos grupos A₁, C₁, A₂ e C₂ apresentaram sinais clínicos de tifo aviário (Figura 2A), os quais persistiram até o 14º dpi. Os principais sinais observados foram apatia, prostração, olhos semicerrados, penas eriçadas e diminuição do consumo de água e alimento. Sinais clínicos semelhantes foram observados em animais dos grupos B₁ e B₂ a partir do 5º dpi.

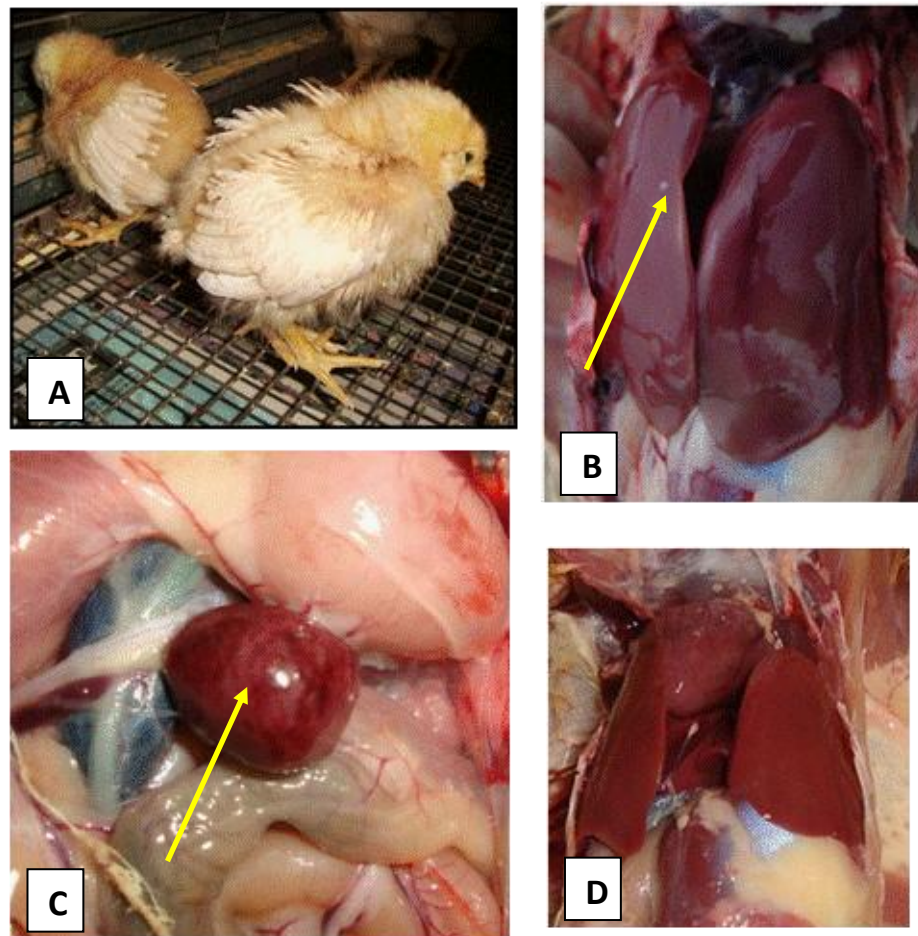


Figura 2. Alterações clínicas e anatomopatológicas em aves desafiadas com SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻. (A) Notar sinais clínicos como apatia, penas eriçadas e olhos semicerrados no 4° dpi em ave desafiada com SG; (B) Ave desafiada com SG aos 28 dpi apresentando hepatomegalia, congestão e ponto esbranquiçado localizado no lóbulo direito (seta); (C) Congestão e esplenomegalia (seta) em ave desafiada com SG Fla⁻ aos 28 dpi; (D) Fígado de ave desafiada com SG Fla⁺ aos 28 dpi não apresentando alterações macroscópicas.

Aves remanescentes foram eutanasiadas e examinadas quanto à presença de alterações macroscópicas em fígado, baço e rim. Notou-se hepatoesplenomegalia com presença de pontos esbranquiçados em fígado, baço e rim em aves dos grupos A₁, A₂, C₁ e C₂ (Figura 2B e 2C). Nestes mesmos animais, ainda foi observado que os fígados estavam friáveis e congestos. Não foram observadas alterações macroscópicas em aves dos grupos B₁ e B₂ (Figura 2D).

Apenas SG foi isolada de fígado e baço de uma mesma ave do grupo A₂. SG Fla⁺ e SG Fla⁻ não foram isoladas de fígado, baço e conteúdo cecal aos 28 dpi.

6.2.2 Excreção fecal

Os resultados da avaliação da excreção fecal de SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ estão descritos na Tabela 4.

A excreção de SG Fla⁺ (B₁) em fezes foi superior à excreção de SG (A₁) e SG Fla⁻ (C₁) em aves desafiadas com o inóculo puro ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos que receberam o inóculo diluído ($P > 0,05$).

Tabela 4. Número de suabes positivos após a inspeção da cloaca de aves desafiadas experimentalmente com as estirpes SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻, aos cinco dias de vida.

DPI	Grupos					
	A ₁ (SG)	B ₁ (SG Fla ⁺)	C ₁ (SG Fla ⁻)	A ₂ (SG)	B ₂ (SG Fla ⁺)	C ₂ (SG Fla ⁻)
1	0/30	6/30	2/30	0/30	2/30	1/30
3	2/30	10/30	4/30	1/30	1/30	1/30
7	0/7	11/16	2/14	3/24	3/28	1/15
14	0/5	1/5	1/5	1/19	2/25	1/12
21	1/4	0/3	1/5	3/18	0/23	2/12
28	0/4	0/3	0/5	0/18	1/23	0/12
Total	3/80 A	28/87 B	10/89A	8/139 a	9/159 a	6/111 a

DPI: dias pós-infecção; Letras diferentes nas linhas indicam diferença pelo teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$), considerando-se a mesma concentração do inóculo. Aves dos grupos A1, B1 e C1 receberam 0,2 mL de cultura contendo aproximadamente 5×10^8 UFC/ mL e aves dos grupos A2, B2 e C2 receberam 0,2 mL da mesma cultura diluída 100 vezes; Total: número total de amostras positivas/ número total de aves inspecionadas.

6.2.3 Avaliação da infecção sistêmica

A Figura 3 contém os resultados das médias ($\log_{10}$) do número de células viáveis (UFC) de SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ por grama de amostras de fígado, baço e conteúdo cecal das aves examinadas. No grupo F (contendo aves desafiadas com SG Fla⁻) as colheitas cessaram no 7° dpi, devido à mortalidade provocada pela bactéria, enquanto que nos grupos D e E (aves desafiadas com SG e SG Fla⁺, respectivamente) foi possível ainda realizar uma colheita no 14° dpi.

As contagens em fígado e baço de aves dos grupos D e F foram similares aos 2°, 5° e 7° dpi ($P > 0,05$). No 5° e 7° dpi as contagens em fígado e baço de aves do

grupo E foram inferiores às contagens dos grupos D e F, embora essa diferença não tenha sido significativa ($P>0,05$). A contagem de SG Fla⁻ foi significativamente superior a de SG Fla⁺ em amostras de fígado no 7º dpi ($P<0,05$).

As contagens em conteúdo cecal de aves dos grupos D e F foram superiores às do grupo E no 7º dpi, porém sem diferença significativa. No 14º dpi, a quantidade de SG foi superior a de SG Fla⁺ em conteúdo cecal ($P<0,05$).

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

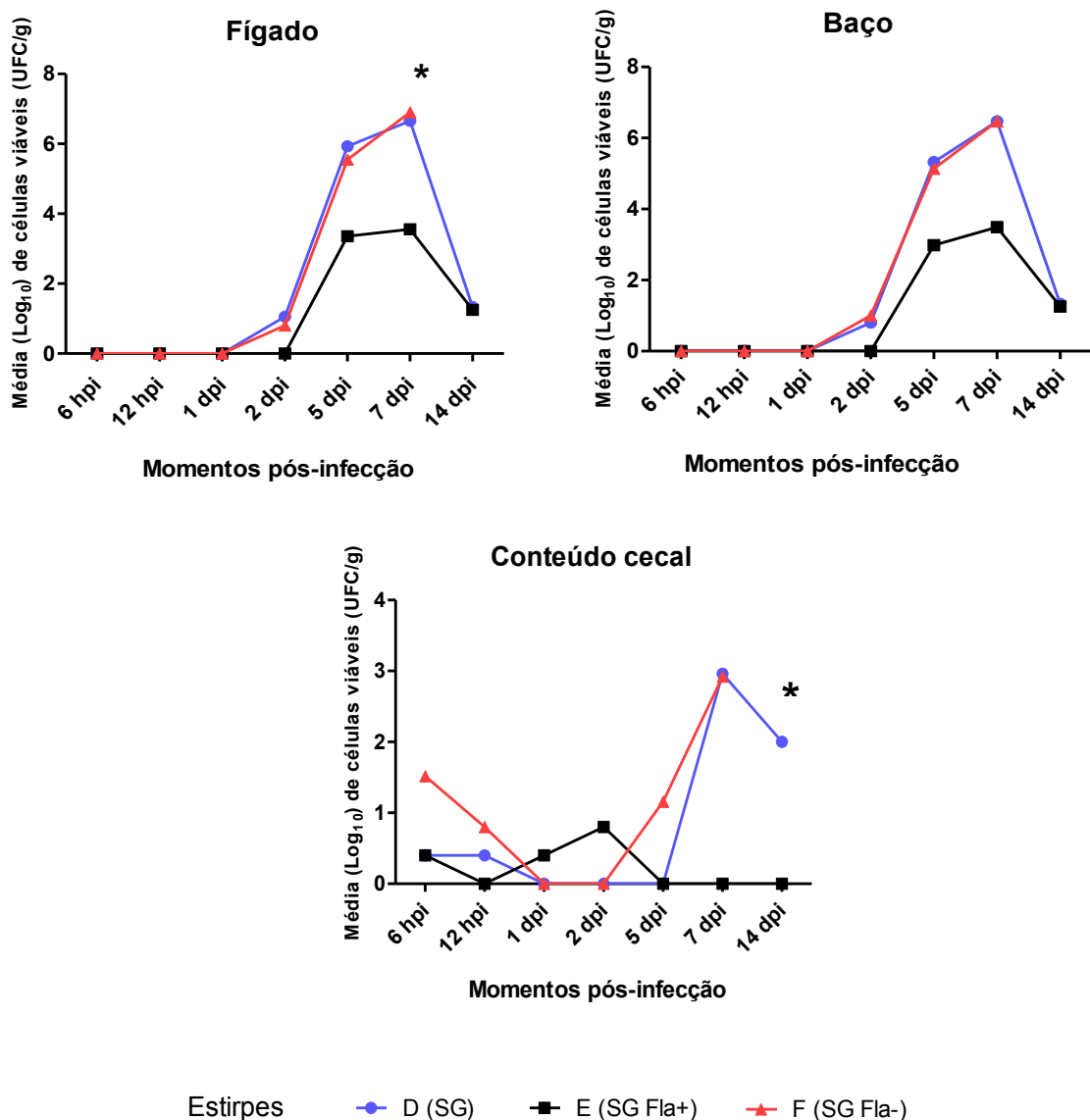


Figura 3. Média ($\log_{10}$) do número de células viáveis (UFC/g) em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal de aves desafiadas aos cinco dias de vida com SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻. Asterisco (*) indica diferença entre médias das contagens bacterianas pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

6.2.4 Avaliações das lesões macroscópicas

A partir do 2º dpi, aves dos grupos D e F (desafiadas com SG e SG Fla⁻) apresentaram discreto aumento de fígado e baço (Figuras 4A e 4C), notou-se também espessamento da parede do ceco com presença de sangue no lúmen cecal (Figura 4D). Alterações mais exacerbadas foram observadas no 5º e 7º dpi em aves desses grupos, sendo elas, acentuada hepatoesplenomegalia, congestão de órgãos internos e fígado friável com coloração esverdeada a bronzeada (Figuras 5B e 5D). Aves do grupo E (desafiadas com SG Fla⁺) apresentaram no 5º dpi, baço e fígado congestos. No entanto, a partir do 7º dpi, as alterações nesses órgãos foram semelhantes às descritas para aves dos grupos D e F (Figura 5C).

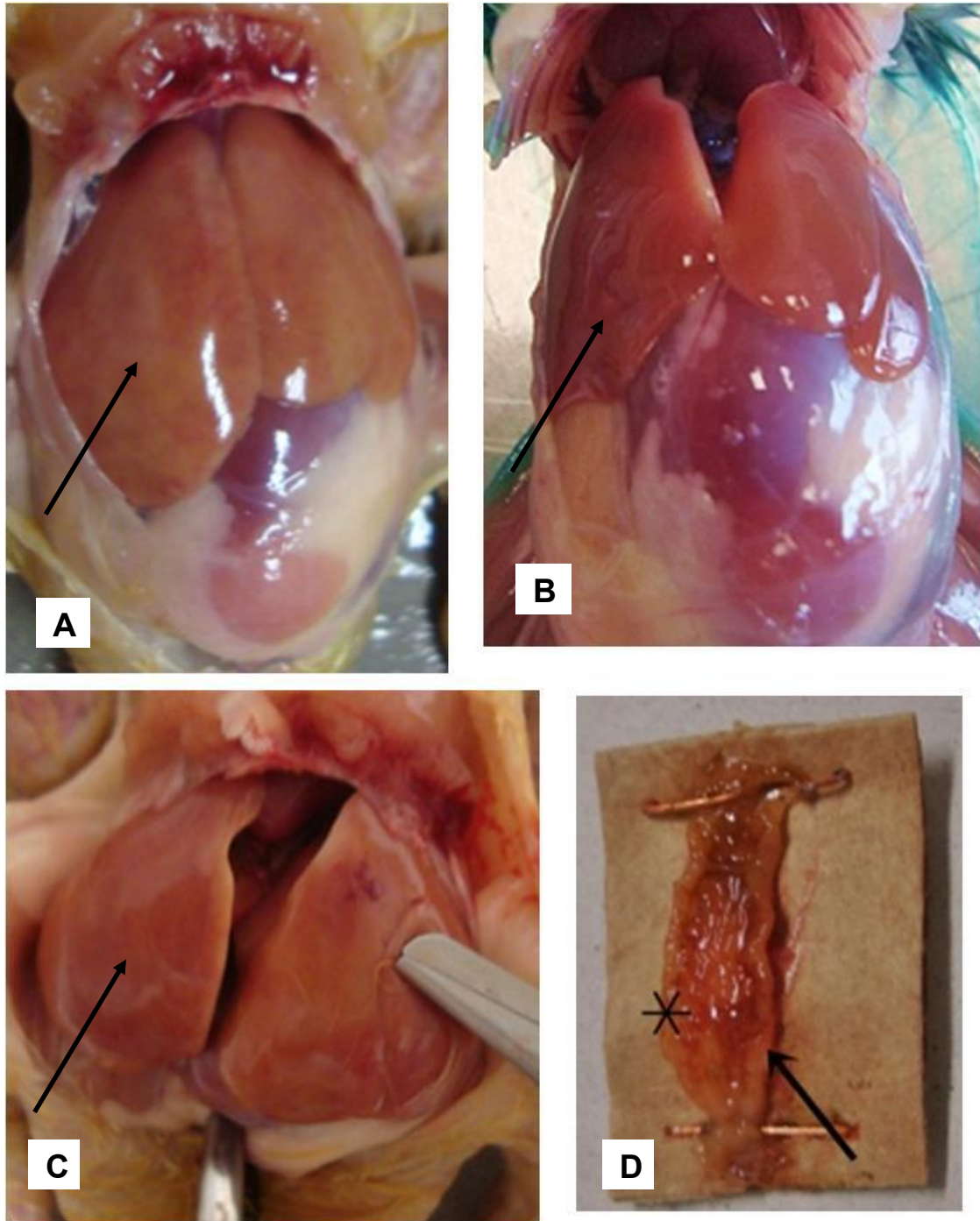


Figura 4. Alterações macroscópicas em aves desafiadas com as estirpes SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 2º dpi. (A) Ave desafiada com SG apresentando hepatomegalia e degeneração (seta); (B) Fígado de ave desafiada com SG Fla⁺ sem alterações macroscópicas (seta); (C) Fígado de ave desafiada com SG Fla⁻ apresentando hepatomegalia acentuada e parênquima amarelado (seta); (D) Aspecto macroscópico do ceco de ave desafiada com a estirpe de SG Fla⁻. Espessamento da parede cecal (seta), com presença de sangue (*) no lúmen intestinal.

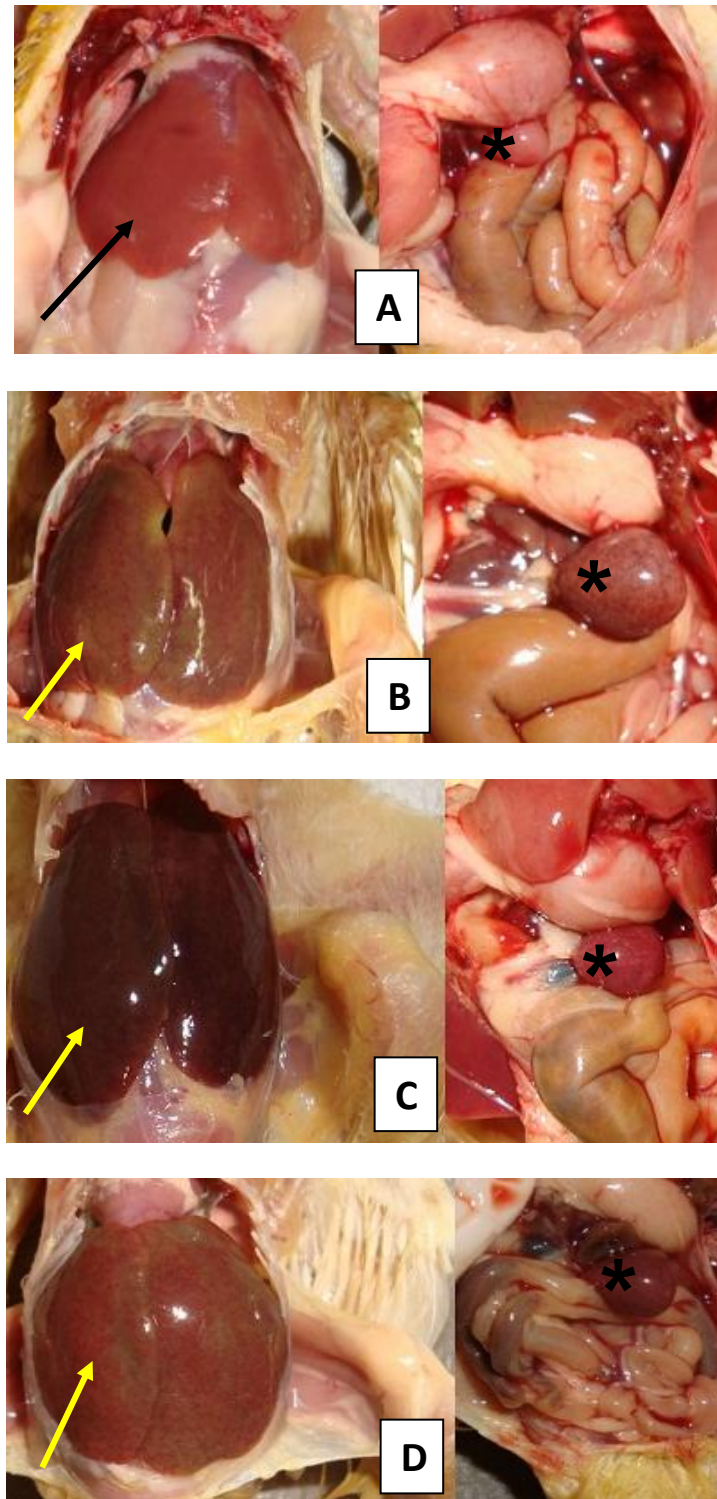


Figura 5. Alterações macroscópicas de aves desafiadas com SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 7º dpi. (A) Fígado (seta) e baço (asterisco) de uma ave não desafiada com 12 dias de idade; Aves desafiadas com SG (B), SG Fla⁺ (C) e SG Fla⁻ (D) apresentando hepatomegalia com a coloração do fígado variando de castanho-esverdeado a vermelho-escuro (seta) e esplenomegalia (asterisco).

6.2.5 Análise histopatológica

As proporções de escores das alterações microscópicas observadas em papo, fígado, baço, tonsila cecal, bolsa cloacal e ceco estão descritas nas Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11. As alterações foram mais evidentes em aves dos grupos D (desafiadas com SG) e F (desafiadas com SG Fla⁻) em relação ao grupo E (desafiadas com SG Fla⁺).

Ainda no primeiro dia após a infecção, pôde-se observar lesões microscópicas no ingluvío de aves de todos os grupos; hiperplasia e descamação epitelial, reatividade linfóide em lâmina própria, degeneração da camada muscular, hipertrofia de células musculares lisas e infiltrado de células inflamatórias mononucleares na musculatura externa. No entanto, foram mais evidentes em aves do grupo F (Figura 6 e 12).

No 1º dpi foi observada degeneração de hepatócitos em cinco aves do grupo F, quatro do grupo D e em uma ave do grupo E. Discretas áreas de necrose foram observadas no parênquima hepático de duas aves do grupo F também no 1º dpi e em uma ave do mesmo grupo 2 dpi. Em aves do grupo D e E, áreas de necrose foram observadas a partir do 5º dpi. A reatividade linfóide no parênquima hepático foi observada principalmente em aves do grupo E desde o 1º dpi (Figura 13). Alterações como células inflamatórias na região de necrose, granulomas, hipertrofia da parede dos vasos, congestão de vasos e sinusoides e inflamação perivascular foram notadas em aves de todos os grupos a partir do 5º dpi (Figura 7).

A lesão mais evidente observada no baço foi a hiperplasia de polpa branca em uma ave do grupo D e uma do grupo F no 1º dpi e em uma ave do grupo E no 2º dpi. Áreas de necrose distribuídas em polpa branca foram observadas em duas aves do grupo D, também no 1º dpi. Enquanto que em aves dos grupos E e F esse tipo de alteração foi notada mais tardiamente, a partir do 5º dpi. Com a evolução da doença, lesões mais severas foram observadas como, depleção linfocitária na região de polpa branca em aves dos grupos D e F a partir do 5º dpi e em uma ave do grupo E no 7º dpi (Figura 8 e 14).

Na bolsa cloacal foi observada discreta depleção linfocitária na região medular e infiltrado de células polimorfonucleares na região cortical a partir do 2º dpi

em aves de todos os grupos. Essas lesões foram evidentes em aves dos grupos D e F, a partir do 5º dpi (Figura 9 e 15).

Hemorragia em vilos da tonsila cecal foi observada em aves dos grupos E e F a partir do 1º dpi, enquanto que nas aves do grupo D esse achado foi notado a partir do 2º dpi (Figura 10 e 16).

Atrofia de vilosidade, edema e dilatação linfática na mucosa e submucosa foram observados desde o 1º dpi no ceco, principalmente em aves dos grupos D e F. Aves do grupo E apresentaram discreta atrofia de vilosidade e dilatação de vasos linfáticos da submucosa a partir do 1º dpi (Figura 11 e 17).

Descrições mais detalhadas das intensidades das lesões em diferentes órgãos e momentos estão disponíveis nos Apêndices 1B, 2B e 3B.

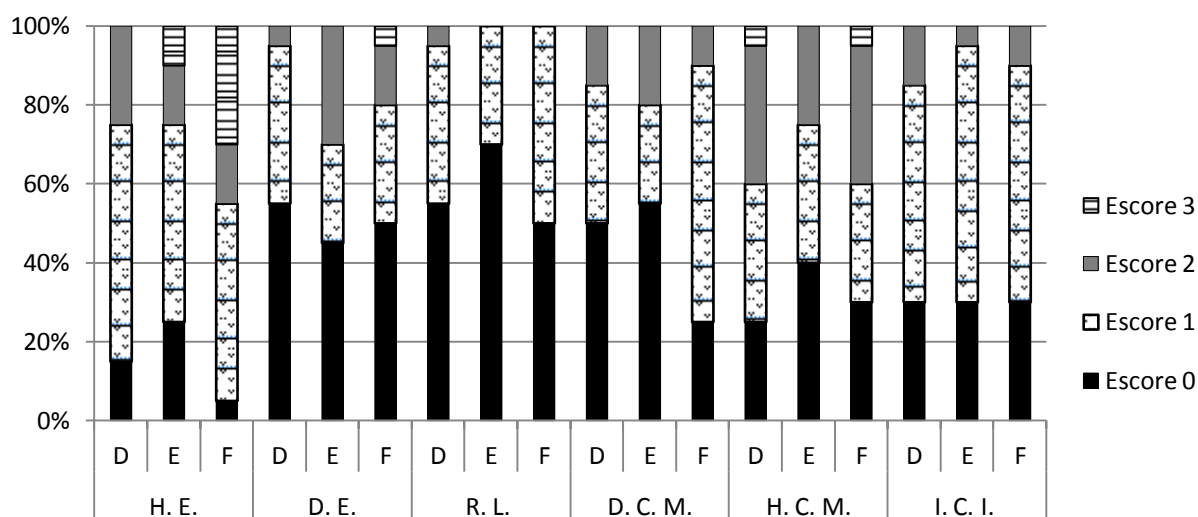


Figura 6. Proporções de escores de lesões microscópicas em glúvulo de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escores de intensidade de lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: H.E. (Hiperplasia epitelial); D.E. (Descamação epitelial); R.L. (Reatividade linfóide em lâmina própria); D.C.M. (Degeneração da camada muscular); H.C.M. (Hipertrofia de células musculares); I.C.I. (Infiltrado de células inflamatórias na camada muscular).

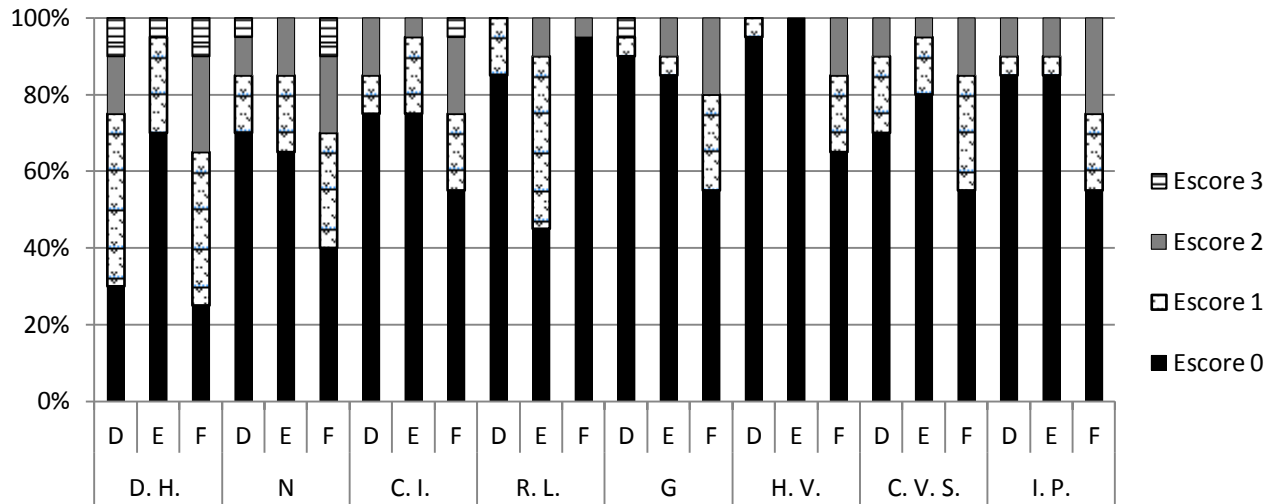


Figura 7. Proporções de escores de lesões microscópicas em fígado de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: D.H. (Degeneração hepática); N (Áreas de necrose); C.I. (Células inflamatórias na região de necrose); R.L. (Reatividade linfóide em parênquima hepático); G (Granulomas); H.V. (Hipertrofia da parede dos vasos); C.V.S. (Congestão de vasos e sinusóides); I.P. (Inflamação perivascular).

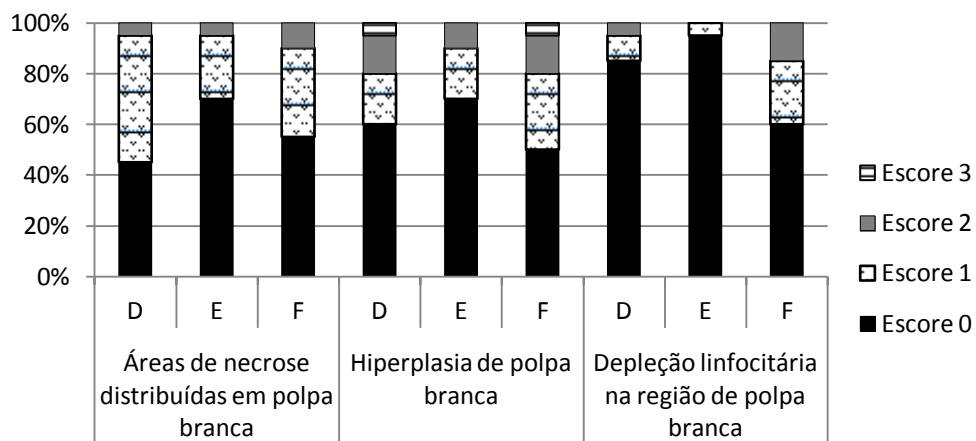


Figura 8. Proporções de escores de lesões microscópicas em baço de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas).

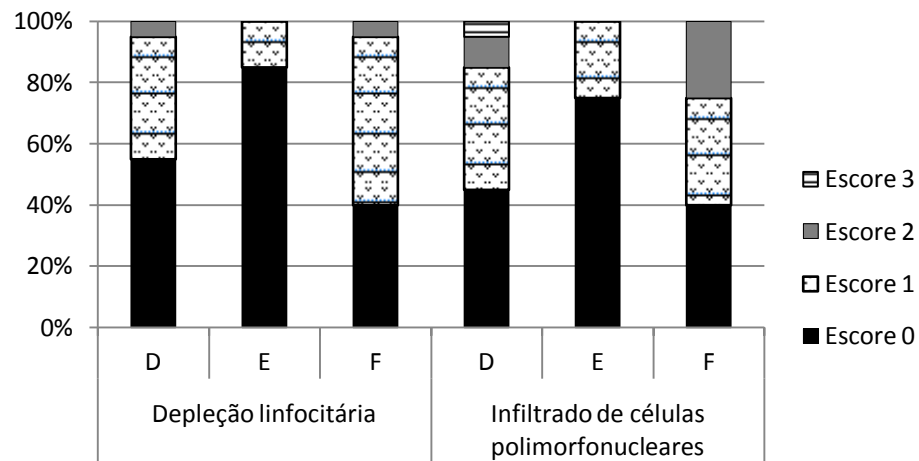


Figura 9. Proporções de escores de lesões microscópicas em bolsa cloacal de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas).

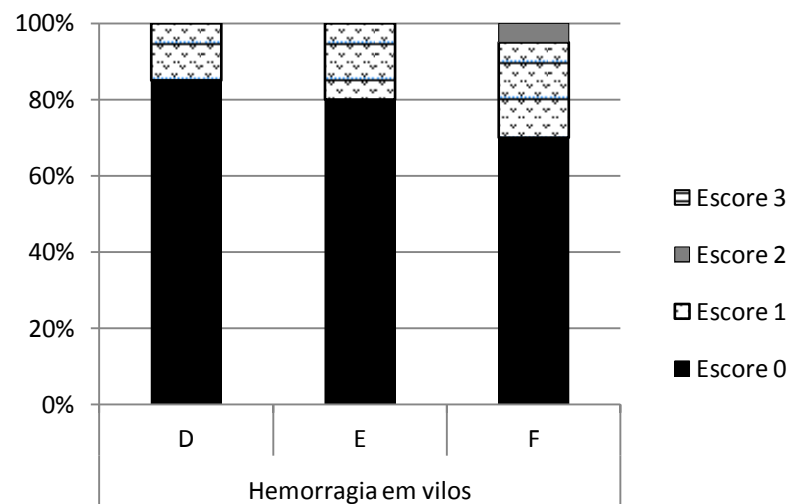


Figura 10. Proporções de escores de lesões microscópicas em tonsila cecal de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas).

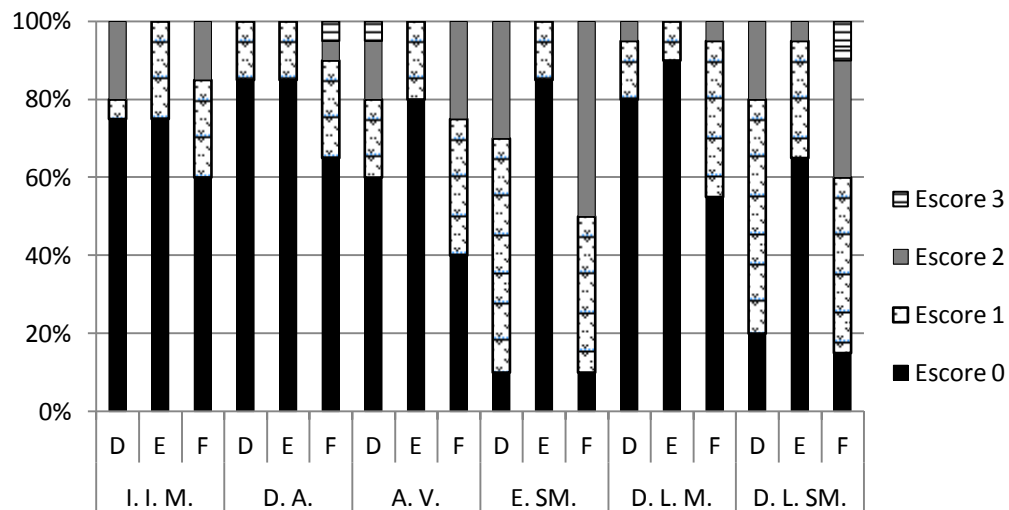


Figura 11. Proporções de escores de lesões microscópicas em ceco de aves infectadas no 5º dia de vida com as estirpes selvagem de SG (D) e mutantes SG Fla⁺ (E) e SG Fla⁻ (F) e avaliadas nos momentos 1, 2, 5, 7 dpi. Escore de intensidade das lesões foram classificadas: 0 (sem alterações); 1 (alterações discretas); 2 (alterações moderadas); 3 (alterações acentuadas). As lesões foram descritas na Figura da seguinte forma: I.I.M. (Infiltrado inflamatório mononuclear); D.A. (Desnudamento apical de vilos); A.V. (Atrofia de vilosidade); E.SM. (Edema de submucosa); D.L.M. (Dilatação linfática de mucosa); D.L.SM. (Dilatação linfática de submucosa).

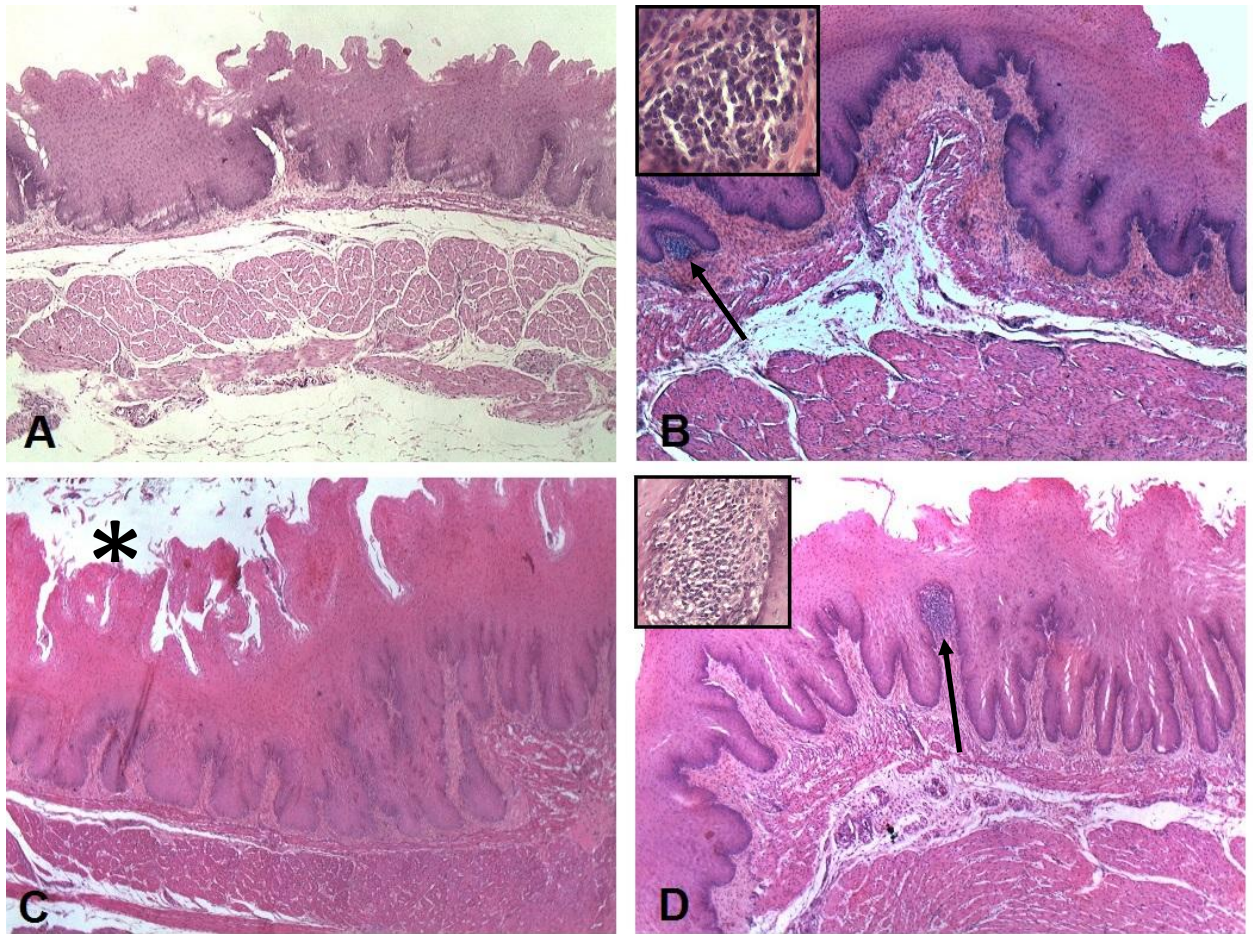


Figura 12. Fotomicrografia do inglúvio de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 1º dpi. (A) Inglúvio sem alterações de ave não desafiada; (B) Notar a reatividade linfóide em lâmina própria (seta) e hiperplasia do epitélio da mucosa em aves desafiadas com SG (grupo D); (C) Notar descamação epitelial (asterisco) e hiperplasia do epitélio da mucosa em ave desafiada com SG Fla⁺ (grupo E) (D) Notar a reatividade linfóide em lâmina própria (seta) e hiperplasia do epitélio da mucosa em aves desafiadas com SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 4x.

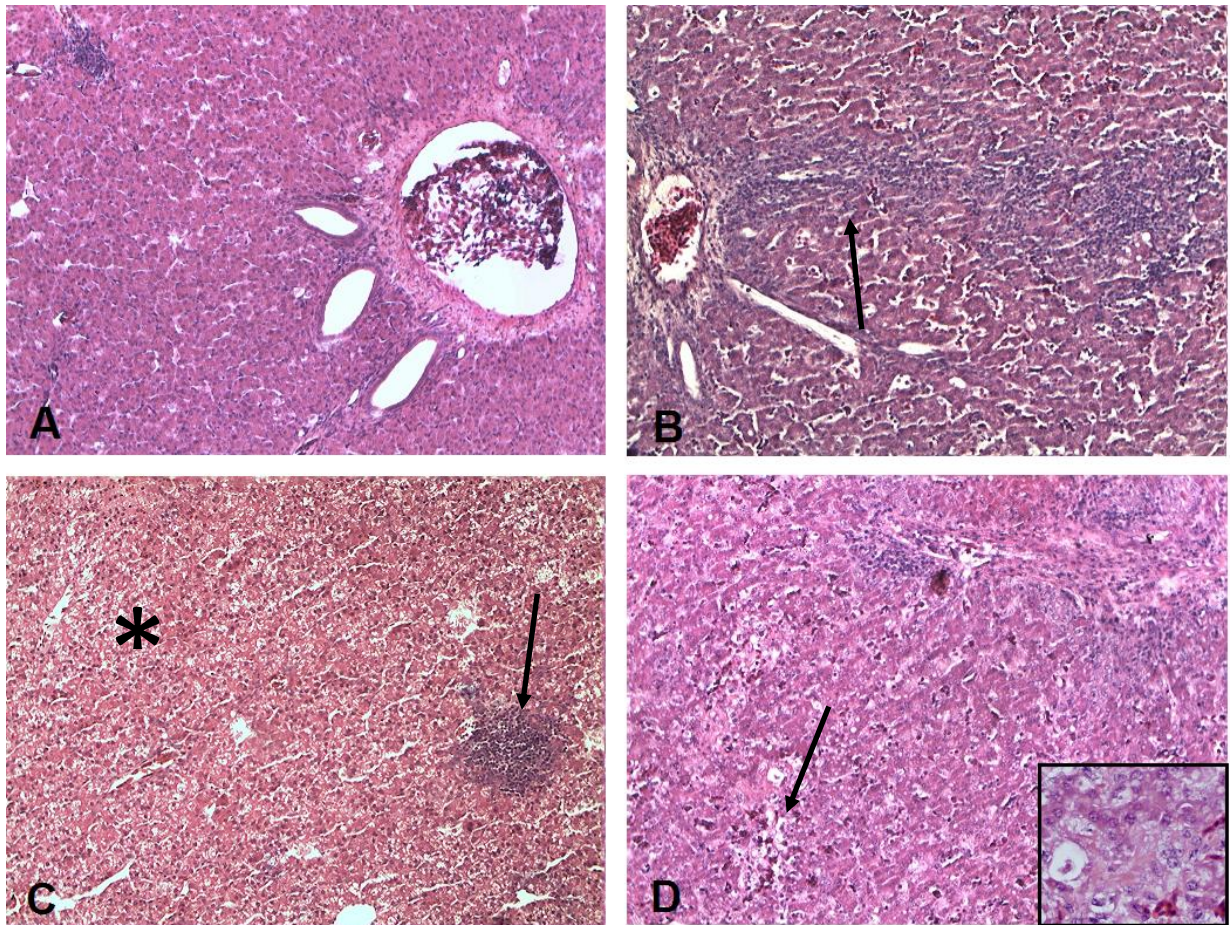


Figura 13. Fotomicrografia de fígado de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 7º dpi. (A) Fígado sem alterações de ave não desafiada; (B) Notar inflamação focalmente extensa (seta) em ave desafiada com SG (grupo D); (C) Notar degeneração hepática difusa (asterisco) e reatividade linfóide no parênquima hepático (seta) em ave desafiada com SG Fla⁺ (grupo E); (D) Notar área de necrose no parênquima hepático (seta) em ave desafiada com SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 10x.

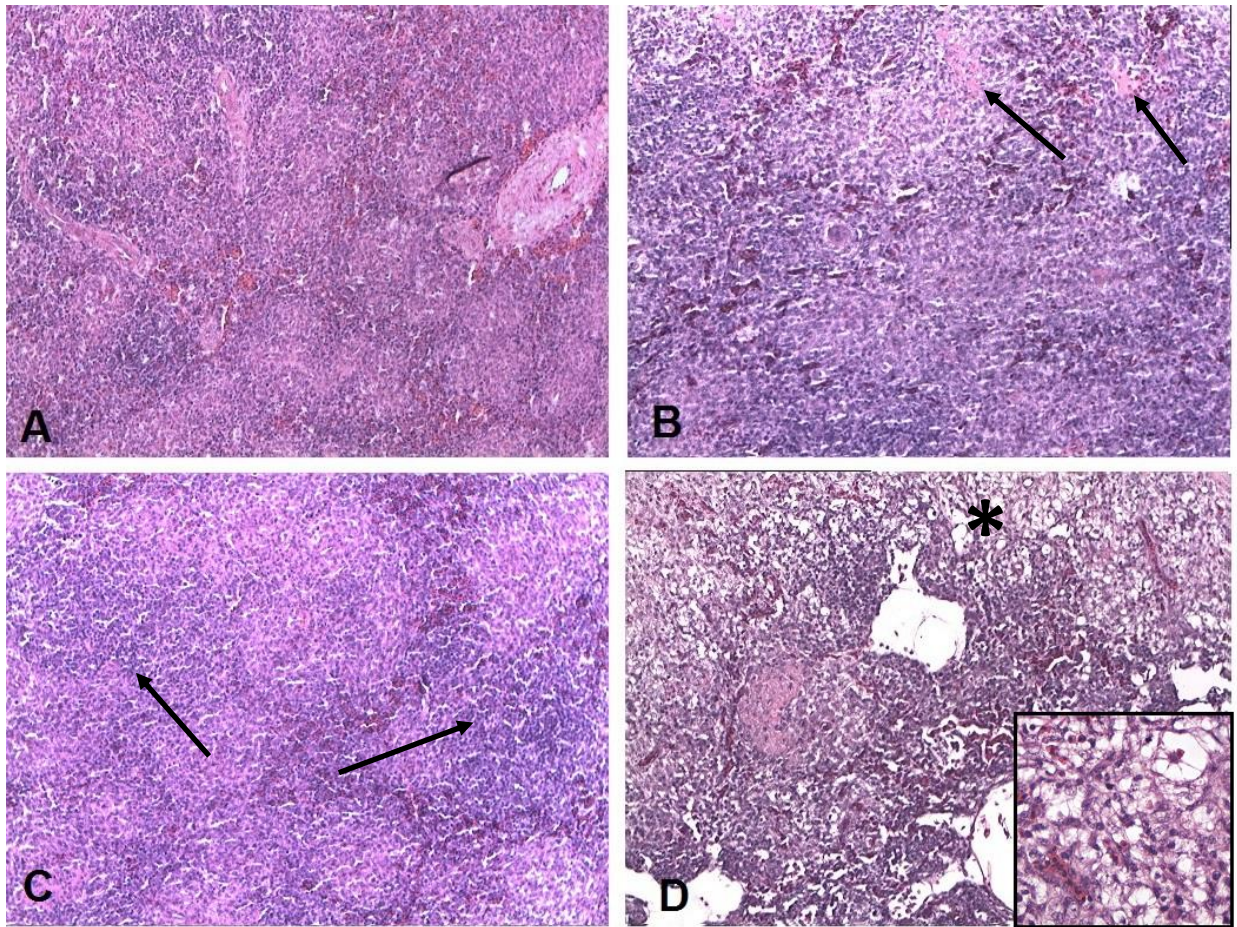


Figura 14. Fotomicrografia do baço de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 5º dpi. (A) Baço sem alterações de ave não desafiada; (B) Notar rarefação linfóide na polpa branca (seta) em ave desafiada com SG (grupo D); (C) Notar hiperplasia de polpa branca (seta) em ave desafiada com SG Fla⁺ (grupo E); (D) Notar depleção linfocitária (asterisco) em ave desafiada com SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 10x.

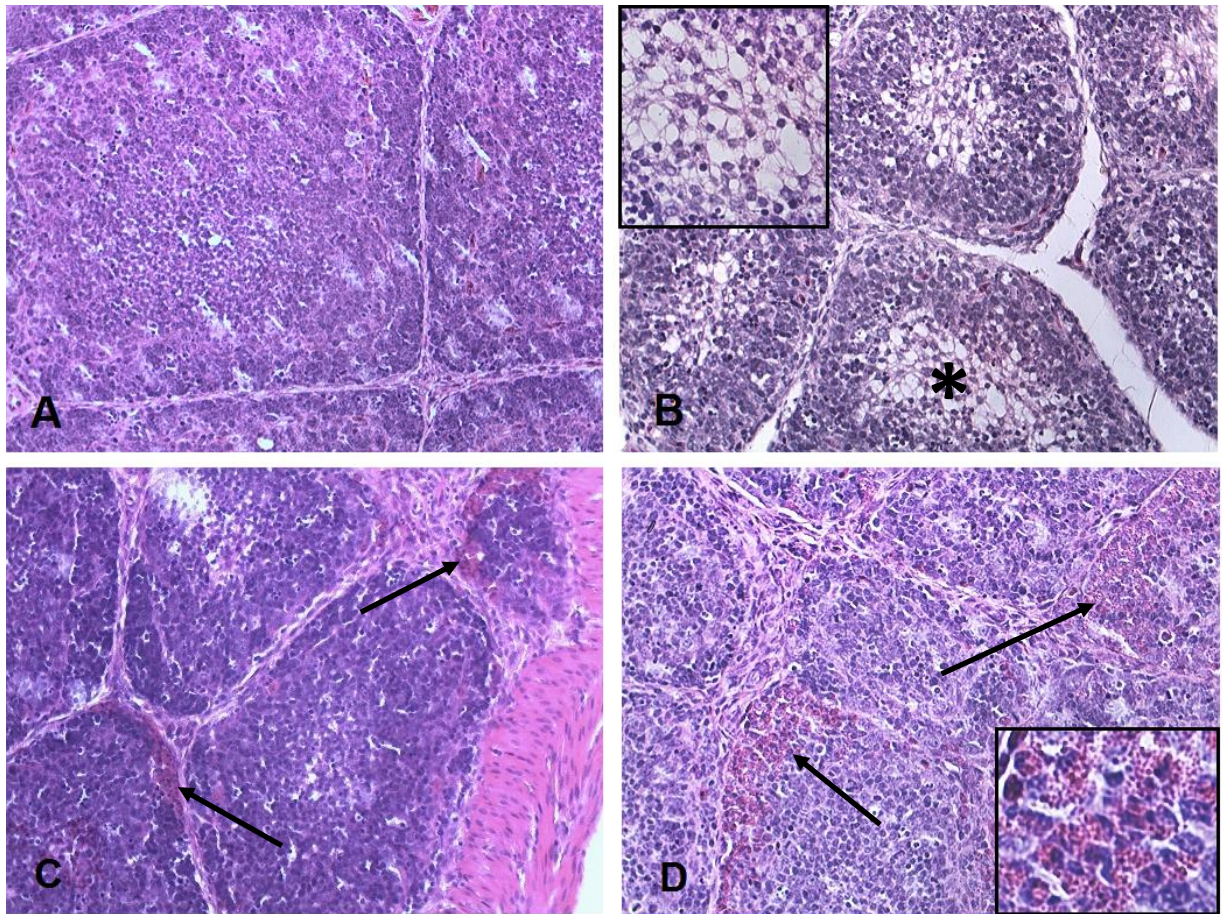


Figura 15. Fotomicrografia da bolsa cloacal de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 7º dpi. (A) Bolsa cloacal sem alterações de ave não desafiada; (B) Notar depleção linfocitária na região medular dos folículos (asterisco) em ave desafiada com SG (grupo D); (C e D) Notar infiltrado de células polimorfonucleares (heterófilos) nas regiões corticais dos folículos (seta) em aves desafiadas com SG Fla⁺ (grupo E) e SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 20x.

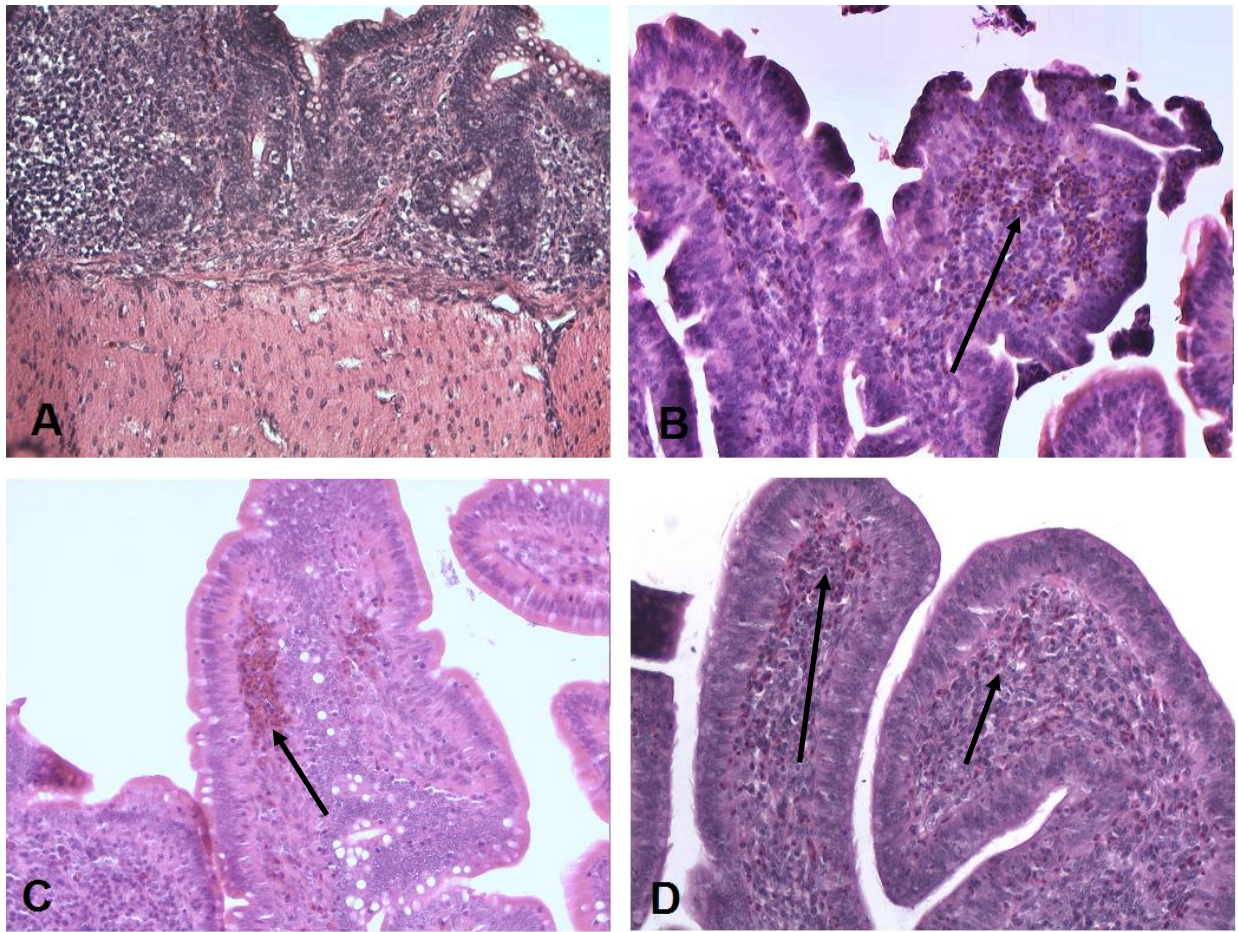


Figura 16. Fotomicrografia da tonsila cecal de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻. (A) Tonsila cecal sem alterações de ave não desafiada; (B, C e D) Notar discretas áreas de hemorragia em aves desafiadas com SG (grupo D), SG Fla⁺ (grupo E) e SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 20x.

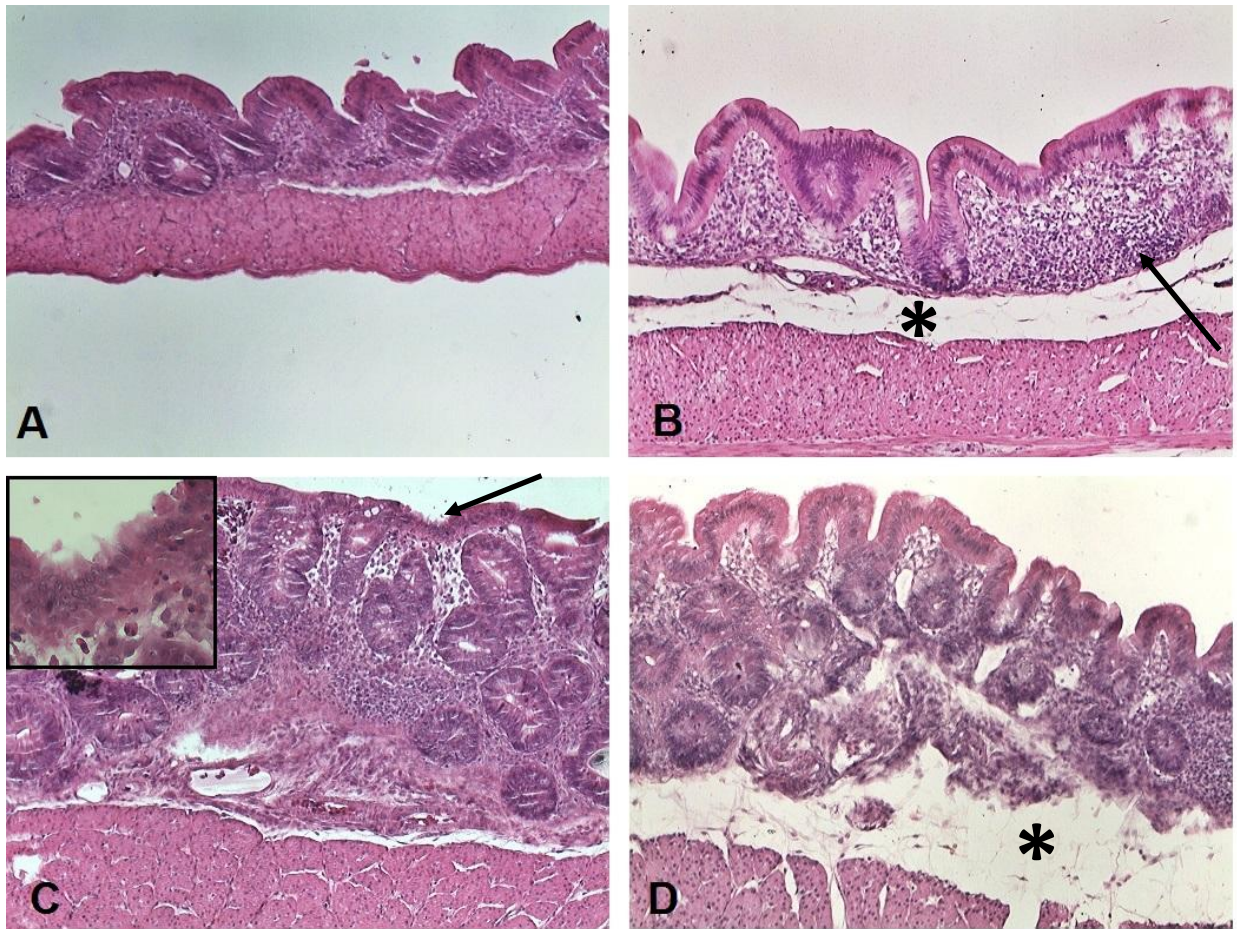


Figura 17. Fotomicrografia do ceco de aves não desafiada ou desafiadas com SG (selvagem), SG Fla⁺ e SG Fla⁻ no 2º dpi. (A) Ceco sem alterações de ave não desafiada; (B) Observar infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa (seta) e edema de submucosa (asterisco) em ave desafiada com SG (grupo D); (C) Notar desnudamento apical (seta) em ave desafiada com SG Fla⁺ (grupo E); (D) Notar edema de submucosa (asterisco) em ave desafiada com SG Fla⁻ (grupo F). Hematoxilina e eosina, objetiva 10x.

7. DISCUSSÃO

Foi demonstrado que *S. Enteritidis* (SE) e *S. Gallinarum* (SG) são filogeneticamente próximos (LI et al., 1993; THOMSON et al., 2008). Estes micro-organismos apresentam conteúdo e organização genética semelhantes, possuem os mesmos antígenos somáticos, no entanto SG não possui flagelos (LI et al., 1993; GRIMONT; WEILL, 2007; THOMSON et al., 2008). A relação parasita-hospedeiro desses micro-organismos com as aves apresenta algumas particularidades. SG provoca enfermidade sistêmica, colonizando o intestino de forma pouco intensa (SHIVAPRASSAD; BARROW, 2008). Por outro lado, SE causa infecção sistêmica apenas em aves imunossuprimidas ou com sistema imune imaturo. De forma geral, provoca uma gastroenterite autolimitante, caracterizada por elevada taxa de colonização intestinal e excreção fecal (GAST, 2008).

A ausência de flagelos em SG tem sido considerada uma das possíveis causas de diferenças entre a patogenia da doença causada por esse micro-organismo e o paratifo provocado por SE em aves. De acordo com essa hipótese, por não possuir flagelos, SG seria pouco reconhecida pelo sistema imune. Deste modo provocaria inflamação de menor intensidade na mucosa, atravessando as barreiras intestinais com mais facilidade e assim desencadeando enfermidade sistêmica severa (KAISER et al., 2000; IQBAL et al., 2005; CHAPPELL et al., 2009). Com intuito de investigar essa hipótese, em estudo prévio, um mutante de SG capaz de produzir flagelos (SG Fla⁺) foi construído por métodos moleculares (FREITAS NETO et al., 2013). SG Fla⁺ é menos patogênico e capaz de desencadear resposta pró-inflamatória de maior intensidade em aves que a estirpe selvagem de SG (FREITAS NETO et al., 2013). No entanto, quando cultivado por repetidas vezes em ágar nutriente, deixa de produzir flagelos (SG Fla⁻), requerendo, portanto, condições de cultivo especiais para manter seu fenótipo flagelado. A síntese do flagelo é um processo que consome elevada quantidade de energia da célula bacteriana (TERASHIMA; KOJIMA; HOMMA, 2008). SG é naturalmente menos eficiente na produção de energia por possuir muitos *pseudogenes* envolvidos no metabolismo energético (THOMSON et al., 2008). Provavelmente, SG Fla⁺ tende a

parar a produção de flagelos, tornando-se SG Fla⁻, para priorizar outras funções celulares essenciais. Uma análise comparativa dos transcriptomas de SG, SG Fla⁺ e SE, cultivadas em diferentes meios, permitiria explicar a reversão de fenótipo em SG Fla⁺ e poderia ser objeto de futuros estudos.

A curiosidade em saber se durante a infecção de aves, o mutante SG Fla⁻ teria comportamento semelhante à SG Fla⁺ ou à SG, motivou a elaboração do presente estudo. Sabe-se que moléculas presentes no epitélio intestinal de mamíferos, como os lisofosfolipídeos, podem induzir a síntese da proteína do flagelo em STM (SUBRAMANIAN; QADRI, 2005); talvez o mesmo pudesse ocorrer com SG Fla⁻ durante a infecção de aves.

No presente estudo, comparou-se a patogenicidade de SG Fla⁺, SG Fla⁻ e SG durante a infecção de aves. Aves de todos os grupos apresentaram diarreia amarelo-esverdeada, apatia, prostração e diminuição do consumo de água e ração; sinais comumente observados no tifo aviário (SHIVAPRASAD, 2000; OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005; FREITAS NETO et al., 2007). No entanto, em aves infectadas com SG Fla⁺, os sinais foram mais tardios. As taxas de mortalidade provocadas pelas estirpes foram dose-dependente, sendo que o inóculo contendo 10⁸ UFC provocou mortalidade acentuada em aves dos três grupos, a semelhança do descrito por outros autores (AUDISIO; TERZOLO, 2002; OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005; FREITAS NETO et al., 2007; GARCIA et al., 2010). Quando aves foram desafiadas com 10⁶ UFC, SG Fla⁺ provocou mortalidade inferior às estirpes aflageladas. Resultado semelhante foi descrito por Freitas Neto et al. (2013) em aves desafiadas com as estirpes SG e SG Fla⁺. Parker e Guard-Petter (2001), ao investigarem a importância do flagelo na patogenicidade do sorotipo Enteritidis para aves, também observaram que o mutante de SE aflagelado causou mortalidade mais elevada que a estirpe selvagem. Ao que parece a ausência de flagelos alterou a patogenicidade desses micro-organismos para aves.

Durante a necropsia das aves que sobreviveram ao desafio (28 dpi), observou-se que aquelas inoculadas com SG e SG Fla⁻ apresentaram alteração macroscópicas como hepatoesplenomegalia e pontos brancos em fígado, baço e rim, entretanto o mesmo não foi observado em aves desafiadas com SG Fla⁺. O

processo de destruição de SG no organismo é realizado pelo sistema imune por meio de resposta do tipo Th-1, a qual é caracterizada por elevados níveis de IFN- γ (WIGLEY et al., 2002; WIGLEY et al., 2006; CHAPPELL et al., 2009). Ao que tudo indica, houve desencadeamento de resposta imune do tipo Th-1 em aves de todos os grupos. Contudo, naquelas desafiadas com SG Fla⁺ a resposta imune parece ter sido mais eficiente e melhor modulada, pois a estirpe não foi isolada dos órgãos e nem desencadeou lesões macroscópicas evidentes. De acordo com Sanders et al. (2006) e Pan et al. (2012), a flagelina possui, entre outras, as funções de estimular e modular as respostas do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro, o que explicaria a ausência de lesões macroscópicas em aves desafiadas com SG Fla⁺.

Sorotipos causadores do paratifo aviário, como SE e *S. Typhimurium* (STM), geralmente colonizam o trato entérico das aves, além de serem excretados nas fezes de forma persistente (BERCHIERI JUNIOR et al., 2001; SETTA et al., 2012) ao contrário de SG, que geralmente é excretado e isolado do conteúdo intestinal apenas durante a fase de bacteremia; no momento próximo à morte (OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005). No presente estudo, os resultados dos suabes de cloaca indicaram que SG Fla⁺ foi mais excretada que as estirpes SG e SG Fla⁻. Segundo alguns autores, o flagelo, e não as fímbrias, teria importância na colonização do intestino de aves por SE (ALLEN-VERCOE; WOODWARD, 1999b). Portanto, é possível que o flagelo tenha auxiliado SG Fla⁺ a colonizar e persistir no trato entérico de maneira mais eficiente que as estirpes aflageladas.

No conteúdo cecal, SG e SG Fla⁻ foram recuperadas quantidades mais elevadas entre o 5º e 14º dpi; momentos onde se pôde observar maior intensidade de lesões macro e microscópicas nas aves. De acordo com Oliveira, Berchieri Junior e Fernandes (2005), nesse período SG provoca um quadro de anemia e septicemia e também lesões que se estendem ao trato entérico, sendo comum encontrar o micro-organismo no conteúdo cecal da ave. As contagens de SG Fla⁺ em conteúdo cecal foram inferiores as das demais estirpes. Foi observado que aves infectadas com a estirpe flagelada sofreram uma infecção sistêmica mais branda, demonstrada pela menor intensidade de lesões macro e microscópicas. Portanto, provavelmente uma menor quantidade de SG Fla⁺ originada da infecção sistêmica tenha atingido o ceco.

No presente estudo, todas as estirpes provocaram doença sistêmica nas aves. No entanto, SG e SG Fla⁻ foram mais invasivas que SG Fla⁺. Uma vez que ambas foram recuperadas em fígado e baço a partir do 2º dpi, sendo que SG Fla⁺ foi isolada partir do 5º dpi e em menor quantidade que as estirpes aflageladas. Provavelmente SG e SG Fla⁻ desencadearam resposta pró-inflamatória de menor intensidade que SG Fla⁺ no trato gastrointestinal, sendo por isso menos reconhecidas pelo sistema imune da ave; o que facilitou a invasão (IQBAL et al., 2005; PAN et al., 2012).

Outros estudos foram realizados para verificar se a ausência ou presença do flagelo influenciaria na invasão de *Salmonella* spp. (ALLEN-VERCOE; SAYERS; WOODWARDS, 1999; DIBB-FULLER; WOODWARD, 2000; PARKER; GUARD-PETTER, 2001; IQBAL ET AL., 2005; PAN et al., 2012). Pan et al. (2012) infectaram aves com STM e um mutante aflagelado, encontrando no 3º dpi, uma quantidade do mutante em fígado e baço maior que a da estirpe selvagem. No entanto, no 5º dpi não houve diferença entre as quantidades das estirpes e por isso, foi sugerindo que o flagelo teria retardado o início da infecção. Resultados semelhantes foram observados por Iqbal et al. (2005) em aves desafiadas com STM e um mutante aflagelado. Parker e Guard-Petter (2001) também observaram que a ausência de flagelos alterou a patogenicidade de um mutante de SE, o qual se tornou mais invasivo. Por outro lado, Allen-Vercoe, Sayers e Woodward (1999) e Dibb-Fuller e Woodward (2000) observaram resultados que contradizem os do presente estudo. Estirpe mutante aflagelada de SE foi recuperada em menor quantidade que a estirpe selvagem em fígado e baço de aves. Embora não seja possível afirmar, sabe-se que fatores como a linhagem de aves, estirpes utilizadas e vias de inoculação poderiam ter interferido nos resultados. Diante de divergências nos achados experimentais, acredita-se que outros estudos sejam necessários.

SG provoca lesões macro e microscópicas severas durante a fase aguda do tifo aviário, principalmente em fígado e baço (SHIVAPRASSAD, 2000; FREITAS NETO et al., 2007; GARCIA et al., 2010). SG Fla⁻ e SG se comportaram de forma semelhante durante todo o experimento. Essas estirpes provocaram hepatoesplenomegalia discreta a partir do 2º dpi e alterações degenerativas hepáticas, bem como, aumento de volume e congestão em fígado e baço a partir do

5º dpi. SG Fla⁺ provocou alterações semelhantes às aquelas causadas pelas demais estirpes, porém mais discretas e mais tardias. A presença de flagelos em SG Fla⁺ seria a única diferença desta com as outras estirpes. Pode-se sugerir que essa organela conferiu grau de atenuação em SG Fla⁺, possivelmente por estimular resposta imune de maior intensidade na ave.

No decorrer dos primeiros dias após o desafio, o ingluvío foi um dos órgãos em que lesões microscópicas foram mais evidentes. Todas as três estirpes provocaram hiperplasia e descamação epitelial, reatividade linfóide em lamina própria e alterações na camada muscular, lesões ainda não descritas em infecções pelo biotipo Gallinarum. Foi relatado que SE pode colonizar o ingluvío de aves e induzir reatividade linfóide com consequente secreção de IgA anti SE na mucosa (SEO et al., 2003). Provavelmente as estirpes de SG também colonizaram este órgão e por isso provocaram as alterações descritas.

Degeneração hepática, hiperplasia de polpa branca em baço e áreas de necrose nos dois órgãos foram as principais alterações encontradas em aves desafiadas com SG e SG Fla⁻. Durante a fase sistêmica do tifo aviário, SG se multiplica no interior de fagócitos, principalmente localizados em fígado e baço, provocando lesões microscópicas acima descritas (FREITAS NETO et al., 2007; GARCIA et al., 2010). O fenótipo flagelado (SG Fla⁺) provocou lesões microscópicas menos acentuadas em fígado e baço. No entanto, é importante ressaltar que a reatividade linfóide no parênquima hepático foi mais evidente em aves desafiadas com essa estirpe. Whitanage et al. (2005) constataram que o aumento da expressão de INF- γ com consequente destruição de STM no fígado de aves coincidiu com intensificação da reatividade linfóide e aumento da população de células T CD4⁺ e T CD8⁺. É provável que o mesmo tenha ocorrido em aves infectadas com SG Fla⁺, uma vez que reatividade linfóide foi mais evidente nestas aves e SG Fla⁺ foi isolada em menor quantidade de fígado e baço que as demais. Shippy et al. (2011) observaram uma correlação positiva entre a intensidade de lesões microscópicas e a quantidade de STM em fígado e baço de camundongos. O mesmo foi observado no presente estudo, no qual aves desafiadas com estirpes (SG e SG Fla⁻) que foram recuperadas em maiores quantidades em fígado e baço apresentaram lesões de maior intensidade nestes órgãos.

SG e SG Fla⁻ provocaram depleção linfocitária e infiltrado de células polimorfonucleares na bolsa cloacal, lesões também observadas por outros autores em trabalhos com o biótipo Gallinarum (GARCIA et al., 2010). No ceco, essas estirpes provocaram atrofia de vilosidade, edema e dilatação linfática em submucosa e mucosa nos primeiros dias após o desafio. Por outro lado, SG Fla⁺ provocou lesões microscópicas menos evidentes na bolsa cloacal e no ceco. Vijay-Kumar et al. (2006) observaram que, ao contrário da estirpe selvagem, mutantes de STM aflagelados ativaram a caspase 1, consequentemente induzindo apoptose no epitélio intestinal de camundongos. Foi observado que, além de induzir resposta imune pró-inflamatória, a flagelina possui ainda ação anti-apoptótica (ZENG et al., 2003; SUBRAMANIAN; QADRI, 2006; VIJAY-KUMAR et al., 2006). A apoptose de células do epitélio intestinal favorece a invasão e disseminação bacteriana. Acredita-se que por esse motivo, SG e SG Fla⁻ tenham provocado mais lesões no ceco e em outros tecidos que SG Fla⁺.

Embora não seja possível afirmar, os resultados deixaram entrever que a presença de flagelos em SG Fla⁺ ativou os TLR-5 (IQBAL et al., 2005), levando à produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e desencadeamento de resposta imune adaptativa do tipo Th-1 mais eficiente (ZENG et al., 2003; SUBRAMANIAN; QADRI, 2006; PAN et al., 2012). Por isso o organismo da ave teria conseguido um melhor controle da infecção por SG Fla⁺. Mesmo sendo capaz de produzir flagelos, SG Fla⁻ comportou-se de forma semelhante à SG. Ao que tudo indica a síntese dessa organela não foi estimulada no organismo da ave. SG e SG Fla⁻ foram mais patogênicas para as aves possivelmente por estimularem resposta imune menos eficiente.

8. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos neste estudo permitiu as seguintes conclusões:

- SG Fla⁻ apresentou patogenicidade semelhante à estirpe selvagem, sendo mais patogênica que SG Fla⁺.
- SG Fla⁻ e SG provocaram mortalidade em aves superior à SG Fla⁺, quando o inóculo diluído foi utilizado.
- SG Fla⁻ comportou-se de forma semelhante à SG, tendo sido isolada em maior quantidade em fígado e baço que SG Fla⁺.
- As lesões foram mais evidentes em fígado, baço, bolsa cloacal e ceco de aves desafiadas com SG Fla⁻ e SG.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, S. I. Flagella, prokaryotic. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology**. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2009. p. 393-403.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

ALLEN-VERCOE, E.; SAYERS, A. R.; WOODWARD, M. J. Virulence of *Salmonella enteric* serotype Enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. **Epidemiology and infection**, Cambridge, v. 122, n. 3, p. 395-402, 1999.

ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M. J. Colonisation of the chicken caecum by afimbriate and aflagellate derivatives of *Salmonella enteric* serotype Enteritidis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 4, p. 265-275, 1999b.

ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M. J. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. **Journal of Medical Microbiology**, Berks, v. 48, n. 8, p. 771-780, 1999a.

AUDISIO, M. C.; TERZOLO, H. R. Virulence analysis of a *Salmonella Gallinarum* strain by oral inoculation of 20-day-old chickens. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 46, n. 1, p. 186-191, 2002.

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

BARROW, P. A. *Salmonella* control - past, present and future. **Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.**, Abingdon, v. 22, n. 4, p. 651-669, 1993.

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

BEACH, J. R.; DAVIS, D. E. Acute infection in chicks and chronic infection of the ovaries of hens caused by the fowl typhoid organisms. **Hilgardia**, California, v. 2, n. 12, p. 411- 424, 1927.

BEAUDETTE, R. F. Fowl typhoid and bacillary white diarrhea. In: INTERNATIONAL VETERINARY CONGRESS, 11., 1930, Londres. **Resumos...** Londres: [s.n.], 1930. p. 705-723.

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

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. Seção 4, p. 435-454.

BERCHIERI JUNIOR, A.; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C. K.; BARROW, P. A. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A**, Abingdon, v. 30, n. 4, p. 297-310, 2001.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

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

CHAMBERS, J. M. **Software for data analysis: programming with R**. New York: Springer, 2008.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 53-59, 2009.

CHEN, G.; SHAW, M. H.; KIM, Y. G.; NUÑEZ, G. NOD-Like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, Michigan, v. 4, p. 365-398, 2009.

CHEVANCE, F. F. V.; HUGHES, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 6, p. 455-465, 2008.

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

DIBB-FULLER, M. P.; WOODWARD, M. J. Contribution of fimbriae and flagella of *Salmonella* Enteritidis to colonization and invasion of chicks. **Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A**, Abingdon, v. 29, n. 4, p. 295-304, 2000.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. E149-E162, 2008. Supplement 14.

FREITAS NETO, O. C.; ARROYAVE, W.; ALESSI, A. C.; FAGLIARI, J. J.; BERCHIERI JUNIOR, A. Infection of commercial laying hens with *Salmonella* Gallinarum: clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 133-141, 2007.

FREITAS NETO, O. C.; SETTA, A.; IMRE, A.; BUKOVINSKI, A.; ELAZOMI, A.; KAISER, P.; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P.; JONES, M. A flagellated motile *Salmonella* Gallinarum mutant (SG Fla⁺) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 165, n. 3-4, p. 425-33 2013.

GARCIA, K. O.; SANTANA, A. M.; FREITAS NETO, O. C.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G.; ALESSI, A. C.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FAGLIARI, J. J. Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum strain: blood serum components and histopathological changes. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Santa Maria, v. 3, n. 2, p. 111-117, 2010.

GAST, R. K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 12. ed. USA: Blackwell Publishing, 2008. p. 619-674.

GEWIRTZ, A. T.; NAVAS, T. A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P. J.; MADARA, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR-5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 167, n. 4, p. 1882-1885, 2001.

GREENWOOD, P. E.; NIKULIN, M. S. In: _____. **A guide to chi-squared testing**. New York: John Wiley, 1996. p. 280.

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

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

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLDORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenecity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.

HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 249-273, 2003.

HENSEL, M. *Salmonella* Pathogenicity Island 2. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 1015-1023, 2000.

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

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

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology**, Reading, v. 146, pt. 12, p. 3217-3226, 2000.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 13, n. 5, p. 816 – 825, 2006.

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

MACNAB, R. M. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 26, p. 131-158, 1992.

MATHUR, R.; OH, H.; ZHANG, D.; PARK, S. G.; SEO, J.; KOBLANSKY, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. A mouse model of *Salmonella* Typhi infection. **Cell**, Cambridge, v. 151, n. 3, p. 590-602, 2012.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 1, n. 2, p. 135-145, 2001.

MIAO, E. A.; ANDERSEN-NISSEN, E.; WARREN, S. E.; ADEREM, A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. **Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 29, n. 3, p. 275-288, 2007.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **The Journal of Higyene**, London, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

MORGAN, E. *Salmonella* Pathogenicity Islands. In: RHEN, M.; MASKELL, D.; MASTROENI, P.; THRELFALL, J. **Salmonella**: molecular biology and pathogenesis. Londres: Horizon Bioscience, 2007. Cap. 4, p. 67-88.

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.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE). Fowl typhoid and Pullorum disease. In: _____ (Ed.). **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 7th. ed. Paris: OIE, 2012. Cap. 2.3.11, p. 538-548. Disponível em:
<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.11_FOWL_TYPHOID.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2013.

PAN, Z.; CONG, Q.; GENG, S.; FANG, Q.; KANG, X.; YOU, M.; JIAO, X. Flagellin from recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a fundamental role in chicken innate immunity. **Clinical and Vaccine Immunology: CVI**, Washington, v. 19, n. 3, p. 304-312, 2012.

PARKER, C. T.; GUARD-PETTER, J. Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in chicks. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 204, n. 2, p. 287-291, 2001.

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

PORTER JÚNIOR, R. E. Bacterial enteritides of poultry. **Poultry Science**, Savoy, v. 77, n. 8, p. 1159-1165, 1998.

SANDERS, C. J.; YU, Y.; MOORE, D. A. 3RD.; WILLIAMS, I. R.; GEWIRTZ, A. T.; Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, Bethesda, v. 177, n. 5, p. 2810-2818, 2006.

SEO, K. H.; HOLT, P. S.; VAUGHN, L. E.; GAST, R. K.; STONE, H. D. Detection of *Salmonella enteritidis*-specific immunoglobulin A antibodies in crop samples from chickens infected with *Salmonella enteritidis*. **Poultry science**, Savoy, v. 82, n. 1, p. 67-70, 2003.

SETTA, A. M.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars enteritidis, infantis, pullorum and gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 397- 410, 2012.

SHIPPY, D. C.; EAKLEY, N. M.; BOCHSLER, P. N.; CHOPRA, A. K.; FADL, A. A. Biological and virulence characteristics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene. **Microbial pathogenesis**, London, v. 50, n. 6, p. 303-313, 2011.

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Pullorum disease and fowl typhoid. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 12. ed. Ames: Iowa State Press, 2008. p. 620-636.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SHI, Z.; CAI, Z.; YU, J.; ZHANG, T.; ZHAO, S.; SMEDS, E.; ZHANG, Q.; WANG, F.; ZHAO, C.; FU, S.; GHOSH, S.; ZHANG, D. Toll-like receptor 11 (TLR11) prevents *Salmonella* penetration into the murine Peyer Patches. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 287, n. 52, p. 43.417 – 43.423, 2012.

STEINER, T. S. How flagellin and Toll-Like receptor 5 contribute to enteric infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 2, p. 545-552, 2007.

SUBRAMANIAN, N.; QADRI, A. Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic salmonella. **Nature Immunology**, London, v. 7, n. 6, p. 583-589, 2006.

TERASHIMA, H.; KOJIMA, S.; HOMMA, M. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. **International review of cell and molecular biology**, Amsterdam, v. 270, p. 39 - 85, 2008.

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

VIJAY-KUMAR, M.; WU, H.; JONES, R.; GRANT, G.; BABBIN, B.; KING, T. P.; KELLY, D.; GEWIRTZ, A. T.; NEISH, A. S. Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. **The American journal of pathology**, Philadelphia, v. 169, n. 5, p. 1686-1700, 2006.

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

ZENG, H.; CARLSON, A. Q.; GUO, Y.; YU, Y.; COLLIER-HYAMS, L. S.; MADARA, J. L.; GEWIRTZ, A. T.; NEISH, A. S. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, Bethesda, v. 171, n. 7, p. 3668-3674, 2003.

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, n. 11, p. 1.111-1.120, 2002.

WIGLEY, P.; HULME, S.; ROTHWELL, L.; BUMSTEAD, N.; KAISER, P.; BARROW, P. macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 2, p. 1419-1424, 2006.

WITHANAGE, G. S.; WIGLEY, P.; KAISER, P.; MASTROENI, P.; BROOKS, H.; POWERS, C.; BEAL, R.; BARROW, P.; MASKELL, D.; MCCONNELL, I. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 8, p. 5173-5182, 2005.

APÊNDICES

Tabela 1A: Média ($\log_{10}$) do número de células viáveis (UFC/g) em amostras de fígado, baço e conteúdo cecal de aves desafiadas aos cinco dias de vida com SG, SG Fla⁺ e SG Fla⁻ em diferentes intervalos.

Grupos	FÍGADO			BAÇO			CECO		
	D	E	F	D	E	F	D	E	F
6 hpi	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,40 A $\pm$ 0,89	0,40 A $\pm$ 0,89	1,52 A $\pm$ 2,44
12 hpi	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,40 A $\pm$ 0,89	0,00 A $\pm$ 0,00	0,80 A $\pm$ 1,10
1 dpi	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	0,40 A $\pm$ 0,89	0,00 A $\pm$ 0,00
2 dpi	1,06 A $\pm$ 1,53	0,00 A $\pm$ 0,00	0,80 A $\pm$ 1,10	0,80 A $\pm$ 1,10	0,00 A $\pm$ 0,00	1,00 A $\pm$ 1,41	0,00 A $\pm$ 0,00	0,80 A $\pm$ 1,10	0,00 A $\pm$ 0,00
5 dpi	5,93 A $\pm$ 0,55	3,36 A $\pm$ 3,08	5,55 A $\pm$ 0,63	5,32 A $\pm$ 0,69	2,98 A $\pm$ 2,72	5,14 A $\pm$ 0,73	0,00 A $\pm$ 0,00	0,00 A $\pm$ 0,00	1,16 A $\pm$ 2,58
7 dpi	6,66 AB $\pm$ 0,61	3,56 B $\pm$ 3,29	6,90 A $\pm$ 0,36	6,47 A $\pm$ 0,75	3,49 A $\pm$ 3,22	6,47 A $\pm$ 0,48	2,96 A $\pm$ 2,52	0,00 A $\pm$ 0,00	2,92 A $\pm$ 3,20
14 dpi	1,33 A $\pm$ 1,15	1,25 A $\pm$ 2,79	M	1,33 A $\pm$ 1,15	1,26 A $\pm$ 2,83	M	2,00 A $\pm$ 0,00	0,00 B $\pm$ 0,00	M

hpi: horas pós-infecção; dpi: dias pós-infecção; D= estirpe selvagem de SG; E= estirpe mutante de SG Fla⁺; F= estirpe de SG Fla⁻. Aves dos grupos D, E e F receberam 0,2 mL de cultura contendo aproximadamente 5×10^8 UFC/ mL. Médias e desvio padrão da contagem bacteriana em fígado, baço e ceco em cada momento. *Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha para cada órgão diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. M: aves que não foram inspecionadas devido à mortalidade.

Tabela 1B: Alterações microscópicas observadas em diferentes intervalos de aves desafiadas com a estirpe selvagem de *Salmonella Gallinarum* no quinto dia de vida.

GRUPO D (SG)																								
Local inspecionado					INGLÚVIO																			
Dias pós-infecção					1				2				5				7				14**			
Escore					-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hiperplasia epitelial						1		4		1		4		1		4		1		3		1		1
Descamação epitelial					3		2			4		1		1		3		1		3		2		3
Reatividade linfoide em lâmina própria					4		1			2		3		2		3		3		1		1		1
Degeneração da camada muscular					3		2			2		2		1		2		2		1		3		1
Hiperplasia de células musculares						2		3		1		1		2		1		1		3		1		1
Infiltrado inflamatório na camada muscular						3		2			4		1		2		3		4		1		2	1
Local inspecionado					FÍGADO																			
Dias pós-infecção					1				2				5				7				14**			
Escore					-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Degeneração de hepatócitos					1		3			1		1		2		1		1		3		2		3
Áreas de necrose					5					5				3		2		1		1		2		1
Células inflamatórias regiões de necrose					5					5				4		1		1		1		3		3
Reatividade linfoide em parênquima hepático*					5					5				2		3		5				1		1
Granulomas					5					5				5				3		1			1	2

Hipertrofia da parede dos vasos	5	5	5	4	1	3														
Congestão de vasos e sinusóides	5	5	3	2	1	2	1													
Inflamação perivascular	5	5	5	2	1	2	1													
Local inspecionado	BAÇO																			
Dias pós-infecção	1	2	5	7	14**															
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++				
Áreas de necrose	3	2			5				1	4			4	1			2	1		
Hiperplasia de polpa branca	4			1	2	1	2		3	1	1		3	2			1		2	
Depleção linfocitária (polpa branca)	5				5				4		1		3	2			3			
Local inspecionado	BOLSA CLOACAL																			
Dias pós-infecção	1	2	5	7	14**															
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Depleção linfocitária (folículos)	5				3	2			1	4			2	2	1		2	1		
Infiltrado de células polimorfonucleares	5				4	1				4	1			3	1	1	2	1		
Local inspecionado	TONSILA CECAL																			
Dias pós-infecção	1	2	5	7	14**															
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hemorragia em vilos	5				3	2			4	1			5				1	2		

Local inspecionado Dias pós-infecção	CECO																			
	1				2				5				7				14**			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear	5				3		2		2	1	2		5					2	1	
Desnudamento apical de vilos	5				4	1			5				3	2			1	1		1
Atrofia de vilosidades	3	1		1	1	2	2		3	1	1		5				3			
Edema de submucosa		4	1		1	2	2		1	2	2			4	1		1	2		
Dilatação linfática de mucosa	4	1			3	2			5				4		1		3			
Dilatação linfática de submucosa		5			2	3			1	2	2		1	2	2		2	1		

*Agregado linfocitário hepático; Cada ave recebeu 0,2 mL de cultura contendo aproximadamente 5×10^8 UFC/ mL; Em cada intervalo foram eutanasiadas 5 aves. ** No 14º dpi foram eutanasiadas 3 aves e as necropsias foram cessadas devido a mortalidade.

Tabela 2B: Alterações microscópicas observadas em diferentes intervalos de aves desafiadas com a estirpe mutante de *Salmonella Gallinarum* Fla⁺ no quinto dia de vida.

GRUPO E (SG Fla ⁺)																			
Local inspecionado				INGLÚVIO															
Dias pós-infecção				1				2				5				7			
Escore				-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hiperplasia epitelial					4	1		3	2			2	2	1			2	1	2
Descamação epitelial				3	2			4	1			1	4			1	2	2	
Reatividade linfóide em lâmina própria				4	1			5				3	2			2	3		
Degeneração da camada muscular				1	3	1		4		1		3	1	1		3	1	1	
Hiperplasia de células musculares				1	3	1		4		1		2	3			1	1	3	
Infiltrado inflamatório na camada muscular				1	4			2	3			2	2	1		1	4		
Local inspecionado				FÍGADO															
Dias pós-infecção				1				2				5				7			
Escore				-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Degeneração de hepatócitos				4	1			1	3		1	5				4	1		
Áreas de necrose				5				5				1	2	2		2	2	1	
Células inflamatórias regiões de necrose				5				5				3	2			2	2	1	
Reatividade linfóide em parênquima hepático*				3	2			4	1				3	2		2	3		
Granulomas				5				5				5				2	1	2	

Hipertrofia da parede dos vasos	5	5	5	5	5
Congestão de vasos e sinusóides	5	4 1	5	2 2 1	2 1 1 1
Inflamação perivascular	5	5	5	2 1 2	3 1 1
Local inspecionado	BAÇO				
Dias pós-infecção	1	2	5	7	14
Escore	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++
Áreas de necrose	5	5	2 3	2 2 1	4 1
Hiperplasia de polpa branca	5	4 1	2 1 2	3 2	2 3
Depleção linfocitária (polpa branca)	5	5	5	4 1	5
Local inspecionado	BOLSA CLOACAL				
Dias pós-infecção	1	2	5	7	14
Escore	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++
Depleção linfocitária (folicúlos)	5	5	4 1	3 2	1 4
Infiltrado de células polimorfonucleares	5	4 1	4 1	2 3	3 2
Local inspecionado	TONSILA CECAL				
Dias pós-infecção	1	2	5	7	14
Escore	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++
Hemorragia em vilos	3 2	4 1	5	4 1	3 1 1

Local inspecionado Dias pós-infecção	Ceco																			
	1				2				5				7				14**			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear	5				3	2			4	1			3	2			2	1	1	1
Desnudamento apical de vilos	5				2	3			5				5				4			1
Atrofia de vilosidades	4	1			3	2			4	1			5				4	1		
Edema de submucosa	5				2	3			5				5				4	1		
Dilatação linfática de mucosa	5				3	2			5				5				2	3		
Dilatação linfática de submucosa	4	1			4	1			5				3	1	1		2	3		

*Agregado linfocitário hepático; Cada ave recebeu 0,2 mL de cultura contendo aproximadamente 5×10^8 UFC/ mL; Em cada intervalo foram eutanasiadas 5 aves. As últimas necropsias foram realizadas no 14º dpi devido à mortalidade.

Tabela 3B: Alterações microscópicas observadas em diferentes intervalos de aves desafiadas com a estirpe mutante de *Salmonella Gallinarum* Fla⁻ no quinto dia de vida.

GRUPO F (SG Fla ⁻)																	
Local inspecionado		INGLÚVIO															
Dias pós-infecção		1				2				5				7**			
Escore		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hiperplasia epitelial			2	2	1		2		3		4		1	1	2	1	1
Descamação epitelial		4		1		3	2			2	1	2		1	3		1
Reatividade linfoide em lâmina própria		3	2			1	4			2	3			4	1		
Degeneração da camada muscular			5			1	3	1		1	3	1		3	2		
Hiperplasia de células musculares		1		3	1	1	1	3		1	3	1		3	2		
Infiltrado inflamatório na camada muscular		1	4			1	2	2		2	3			2	3		
Local inspecionado		FÍGADO															
Dias pós-infecção		1				2				5				7**			
Escore		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Degeneração de hepatócitos			2	2	1	1	3	1		2	2	1		2	1	1	1
Áreas de necrose		3	2			4	1				2	3		1	1	1	2
Células inflamatórias regiões de necrose		5				5					3	2		1	1	2	1
Reatividade linfoide em parênquima hepático*		5				5				4		1		5			
Granulomas		5				5				1	2	2			3	2	

Hipertrofia da parede dos vasos	5	5	2	3	3	2										
Congestão de vasos e sinusóides	4	1	4	1	3	2	3	2								
Inflamação perivascular	5	5	1	1	3	3	2									
Local inspecionado	BAÇO															
Dias pós-infecção	1	2	5	7**												
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++				
Áreas de necrose	5				5				1	3	1		4	1		
Hiperplasia de polpa branca	4	1			3	1	1		2	1	1	1	1	3	1	
Depleção linfocitária (polpa branca)	5				5				1	3	1		1	2	2	
Local inspecionado	BOLSA CLOACAL															
Dias pós-infecção	1	2	5	7**												
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Depleção linfocitária (folículos)	5				3	2			5				4	1		
Infiltrado de células polimorfonucleares	5				3	2			4	1			1	4		
Local inspecionado	TONSILA CECAL															
Dias pós-infecção	1	2	5	7**												
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Hemorragia em vilos	3	2			5				2	2	1		4	1		

Local inspecionado Dias pós-infecção	CECO															
	1				2				5				7**			
Escore	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Infiltrado inflamatório mononuclear	5				3	1	1		4	1				3	2	
Desnudamento apical de vilos	5				4	1			3	1		1	1	3	1	
Atrofia de vilosidades	0	2	2			4	1		4		1		3	1	1	
Edema de submucosa	4	1			4	1			4	1			4	1		
Dilatação linfática de mucosa	4	1			2	3			2	3			3	1	1	
Dilatação linfática de submucosa	2	3					4	1		4	1		1	2	1	1

*Agregado linfocitário hepático; Cada ave recebeu 0,2 mL de cultura contendo aproximadamente 5×10^8 UFC/ mL; Em cada intervalo foram eutanasiadas 5 aves. ** As últimas necropsias foram realizadas no 7º dpi, devido à mortalidade.