

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

**AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE MATERNA NA PROGÊNIE DE
REPRODUTORAS PESADAS VACINADAS COM UM
CANDIDATO VACINAL RECOMBINANTE CONTRA
Salmonella Enteritidis.**

Roberto Alexandre Yamawaki

Médico Veterinário

2020

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

**AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE MATERNA NA PROGÊNIE DE
REPRODUTORAS PESADAS VACINADAS COM UM
CANDIDATO VACINAL RECOMBINANTE CONTRA
Salmonella Enteritidis.**

Roberto Alexandre Yamawaki

**Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho**

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.

Y19a

Yamawaki, Roberto Alexandre

Avaliação da imunidade materna na progênie de reprodutoras pesadas vacinadas com um candidato vacinal recombinante contra Salmonella Enteritidis / Roberto Alexandre Yamawaki. -- Jaboticabal, 2020

78 p. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Rafael Antonio Casarin Penha Filho

1. Salmonella Enteritidis. 2. Imunidade humoral. 3. Morfologia intestinal. 4. Progênie. 5. Vacina recombinante. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE MATERNA NA PROGÊNIE DE REPRODUTORAS PESADAS VACINADAS COM UM CANDIDATO VACINAL RECOMBINANTE CONTRA *Salmonella Enteritidis*

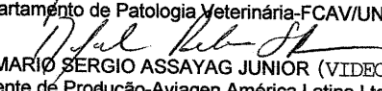
AUTOR: ROBERTO ALEXANDRE YAMAWAKI

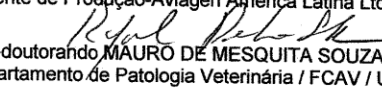
ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

COORDENADOR: RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Pesquisador Dr. RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO
Departamento de Patologia Veterinária-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP


Dr. MARIO SÉRGIO ASSAYAG JUNIOR (VIDEOCONFERÊNCIA)
Gerente de Produção-Aviagen América Latina Ltda / Campinas/SP


Pós-doutorando MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROBERTO ALEXANDRE YAMAWAKI – Nascido em Sorocaba, São Paulo, em 22 de agosto de 1990, filho de Roberto Carlos Yamawaki e Cristina de Cassia Silva Yamawaki. Em 2008, ingressou em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP/Botucatu, obtendo o título de Médico Veterinário em 2012. Durante a graduação foi bolsista FAPESP de iniciação científica tendo desenvolvido projeto de pesquisa na área de sanidade avícola e patologia animal, sob orientação do Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto. Possui especialização nível *lato sensu* - Master Business Administration (MBA) em gestão empresarial pela Fundação Getúlio Vargas – FGV (2012). Também possui especialização em metodologia e estatística - Black Belt Lean Six Sigma – pela Fundação Vanzolini (2016). Possui experiência em funções técnicas e de gestão nas agroindústrias. Atualmente, atua como Gerente de Serviços Técnicos para América do Sul na empresa Hubbard Breeders. Em agosto de 2018, ingressou no mestrado na FCAV/UNESP/Jaboticabal pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e coorientação do Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Baleki)

“You'll find that life is still worthwhile, if you just smile.”

(Charles Chaplin)

Dedico

A Deus, a minha família e a minha namorada Ana Luísa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente dedico a Deus, agradeço de todo coração por tudo. Pelo apoio, força, luz, paciência, saúde, coragem e pelo dom que me deste, o dom da vida, e pela oportunidade de estar concluindo mais esta etapa. Muito obrigado por sempre iluminar e guiar os meus passos.

A minha família, meu maior tesouro, referência e exemplo de vida. Meu eterno agradecimento por sempre me incentivarem, me apoiarem e por não medirem esforços para me verem feliz. Tudo o que faço e farei é para que vocês sempre sintam-se orgulhosos. Sou eternamente grato por tê-los em minha vida. Amo vocês.

A minha namorada Luísa, muito obrigado por encher a minha vida de leveza, amor e esperança. Ao seu lado os dias são mais leves e felizes. Sou muito grato de poder compartilhar a vida contigo. Te amo muito.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, pela oportunidade e voto de confiança. Referência de ética e profissionalismo no meio acadêmico e da avicultura. Obrigado por estar sempre com as portas abertas e por me fazer crescer tanto como profissional como pessoa.

Ao meu coorientador, Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho, meu primeiro contato no mestrado, meu eterno agradecimento pela oportunidade, voto de confiança e admiração pela sua dedicação, paciência, apoio, profissionalismo e amizade.

Aos meus colegas de pós graduação o meu eterno agradecimento e admiração, vocês foram a melhor surpresa de todo o período de mestrado. A Marcela, muito obrigado por me ajudar na condução do meu projeto dedicando fins de semana e feriados, sem a sua ajuda com certeza isso não seria possível. Ao Lucas, muito obrigado pela sua amizade, admiro o seu estado de espírito, sempre disposto a ajudar. A Adriana, muito obrigado pela sua paciência, auxílio e profissionalismo, sem a sua ajuda com certeza esse projeto não seria possível. A Val e Fernanda, muito obrigado por sempre me ajudarem e apoiarem em todos os momentos. Ao Mauro,

muito obrigado por me apoiar e pelas ideias durante a minha banca de qualificação e dissertação. A todos os estagiários (Taisa, Tulio, Bruna e Gustavo) meu eterno agradecimento pela ajuda nos manejos e nas amostras laboratoriais.

A professora Rose, meu eterno agradecimento por sempre estar disposta a contribuir e ajudar, sempre com as portas abertas e com excelentes ideias.

A empresa Hubbard Breeders, em nome do senhor Carlos Antonio Costa, meu chefe e amigo, obrigado pela liberação e apoio em todo o período do mestrado. Aos membros da minha equipe; Pedott, Dal Bosco, Livia e Fátima por sempre me incentivarem com exemplos, apoio e amizade.

Ao Dr. Mario Sergio Assayag Junior, meu agradecimento pela amizade e por sempre me ajudar na minha carreira profissional, fico muito feliz pela sua presença e ideias na minha banca de dissertação.

Aos senhores Carlos Roso, Jeo, Paulinho e José Dourado pela amizade e pela doação das aves para o experimento, pela ajuda e apoio no desenvolvimento dos experimentos.

Ao senhor Vander, muito obrigado por desde a graduação me ajudar com o empréstimo das máquinas de incubação para a realização dos meus experimentos. Obrigado pela disponibilidade, carinho, cordialidade e atenção. O senhor é um exemplo como pessoa e para a história da avicultura.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, em especial ao Departamento de Patologia Veterinária. A todos os docentes minha eterna gratidão por todo o aprendizado. Deixo também meus agradecimentos a todos os funcionários.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Descrição do gênero <i>Salmonella</i>	3
2.2. Importância da <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE).....	4
2.3. Epidemiologia da SE.....	5
2.4. Implementação de um programa vacinal como medida de controle de SE..	7
2.5. Sistema imunológico das aves.....	8
2.6. Diferentes tipos de vacinas contra SE.....	11
2.6.1. Vacinas vivas atenuadas.....	12
2.6.2. Vacinas Inativadas.....	13
2.7. Vacinas inativadas como medida de controle de SE.....	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Geral.....	18
3.2 Específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Preparo dos inóculos e candidato vacinal.....	19
4.2. Aves e desenho experimental	19
4.3. Extração de anticorpos da gema de ovos e incubação dos ovos embrionados.....	23
4.4. Extração de anticorpos da gema de ovos	24
4.5. Produção de anticorpos.....	25
4.6. Contagem bacteriana.....	25
4.7. Determinação da morfologia intestinal.....	26
4.8. Análise estatística.....	26

5. RESULTADOS.....	27
5.1. Níveis de anticorpos no soro e ovos de matrizes pesadas e no soro das progênes.....	27
5.2. Contagem de SE.....	30
5.3. Morfologia intestinal.....	32
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS.....	41

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 projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação dos títulos de anticorpos maternos em ovos embrionados e pintainhos provenientes de aves reprodutoras imunizadas com vacina inativada polivalente contra *Salmonella* spp."**, protocolo nº 015616/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 08 de novembro de 2018.

Vigência do Projeto	11/02/2019 a 10/05/2019
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Ross 308 AP 95 (corte commercial)
Nº de animais	Matrizes: 35 fêmeas e 05 machos Pintainhos: 40 aves
Peso / Idade	Matrizes: 1,8 kg / 17 semanas de vida Pintainhos: 35 g / 01 dia de vida
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Sears Alimentos LTDA – Matrizes, pintainhos serão provenientes das matrizes alojadas e criadas.

Jaboticabal, 08 de novembro de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski

Coordenadora CEUA
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via do Acesso Prof. Paulo Donato Castellana, s/n CEP 14884-900 – Jaboticabal/ SP – Brasil
tel 16 3209 7100 - www.fcav.unesp.br

**AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE MATERNA NA PROGÊNIE DE
REPRODUTORAS PESADAS VACINADAS COM UM CANDIDATO VACINAL
RECOMBINANTE CONTRA *Salmonella* Enteritidis.**

RESUMO - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) é o principal agente de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em seres humanos. Vacinação apresenta-se como uma das ferramentas mais utilizadas para prevenir a colonização e infecção por SE em aves. O presente estudo avaliou a eficácia de um candidato vacinal recombinante contra SE. Trinta aves matrizes pesadas e cinco aves machos com 10 semanas e status *Salmonella*-free foram alojadas e divididos em 3 grupos: não vacinado (NV), vacinado com candidato vacinal recombinante (VAC) e vacinado com bacterina comercial (BAC). Amostras de soro e ovos embrionados foram colhidos em dois períodos após a dose *booster*, para quantificação da taxa de transferência de IgY para os ovos e a progênie. Quarenta pintos de um dia da progênie foram divididos em dois grupos, NV e VAC, e desafiados com 10^7 UFC de SE no segundo dia de vida. Soro, fragmentos de intestino e fígado e conteúdo cecal foram colhidos em cada grupo. Os níveis de IgY foram significativamente maiores no grupo VAC comparado com o NV em todos os períodos no soro e gema de ovos embrionados de matrizes pesadas e no soro das progênies, sendo as taxas de transferências de IgY maiores no grupo VAC comparado com grupo BAC. Foram encontradas maiores relações vilo-crípta no duodeno, jejuno e íleo a 4 dpi na progênie do grupo VAC. Foi utilizado uma elevada dose desafio de SE (10^7 UFC/pinto), no entanto, apesar da forte resposta imune, não houve diferença estatística na recuperação de SE no conteúdo cecal das progênies. Assim, outros estudos sobre a capacidade de estímulo a resposta imune mediada por células, a proteção a diferentes doses desafio e capacidade de proteção direta na ave vacinada, auxiliarão na elaboração dessa vacina.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, imunidade humoral, morfologia intestinal, progênie, vacina recombinante

EVALUATION OF THE MATERNAL IMMUNITY TRANSFERENCE TO OFFSPRING FROM BROILER BREEDERS VACCINATED WITH A CANDIDATE RECOMBINANT VACCINE AGAINST *Salmonella* Enteritidis

ABSTRACT - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) is the main cause of foodborne diseases (FBD) in humans. Vaccination is one of the most used tools to prevent colonization and infection by SE in birds. The present study evaluated the effectiveness of a candidate for SE recombinant vaccine. Thirty broiler breeders and five roosters with 10 weeks age and *Salmonella*-free status were housed and divided into 3 groups: unvaccinated (UV), vaccinated with recombinant vaccine candidate (VAC) and vaccinated with commercial bacterin (BAC). Samples of serum and embryonated eggs were collected 7 and 12 weeks after the booster dose, to quantify the transfer rate of IgY to the eggs and the progeny. Forty day-old progeny chicks were divided into two groups, UV and VAC, and challenged with 10^7 CFU of SE on the second day of life. Serum, fragments of intestine and liver and cecal content were collected in each group. The IgY levels were significantly higher in the VAC group compared to the UV in all periods in the egg yolk and broiler breeders' serum and in the progeny's serum, with the IgY transfer rates being higher in the VAC group compared to the BAC group. Greater vilo-crypt ratio were found in the duodenum, jejunum and ileum at 4 dpi in the progeny of the VAC group. A high challenge dose of SE (10^7 CFU / chick) was used, however, despite the strong immune response, there were no statistical difference in the recovery of SE in the progenies' cecal contents. Thus, more studies on the ability to stimulate the cell-mediated immune response, the protection at different challenge doses and the ability to directly protect the vaccinated poultry will assist in the development of this vaccine.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, humoral immunity, intestinal morphology, progeny, recombinant vaccine

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ANOVA	Análise de variância
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AVB	Agar Verde Brilhante
BAC	Grupo vacinado com bacterina comercial
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Dai	Dias antes-infecção
DP	Desvio padrão da amostra
Dpi	Dias pós-infecção
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	Colaboradores do autor
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
h	Horas
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IFN- γ	Interferon-Gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
IL-10	Interleucina-10

IL-12	Interleucina-12
IN	Instrução Normativa
LB	Caldo Luria-Bertani
Log ₁₀	Logaritmo na base 10
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
matAc	Anticorpos maternos
mL	Mililitro
MHC	Complexo de histocompatibilidade
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
NO	Oxido nitrico
ns	Não significativo
NV	Grupo não vacinado - controle
OD	Densidade óptica
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Leucócitos Polimorfonucleares
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
RPM	Rotações por minuto
SE	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Enteritidis
SG	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> sorovar Gallinarum biovar Gallinarum
SH	<i>Salmonella</i> Heidelberg
SP	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovar Gallinarum biovar Pullorum
SPF	Specific Pathogen Free
spp.	Espécie
STM	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovar Typhimurium
subsp.	Subespécie
SV	Saco vitelino
Ta1	Linfócitos T auxiliares 1
Ta2	Linfócitos T auxiliares 2

Tc	Linfócitos T citotóxicos
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UE	União Européia
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VAC	Grupo vacinado com candidato vacinal
VB	Verde-brilhante
VCR	Relação altura de vilo dividido pela profundidade de cripta
x g	Força G

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquemas vacinais testados em aves reprodutoras pesadas.....	20
Tabela 2. Progênie desafiadas com SE.....	22
Tabela 3. Valor E ajustado médio do IgY específico em soro de matrizes pesadas, gema de ovos e soro de progênie de 1 dia após 7 semanas da dose <i>booster</i> dos tratamentos e a média da porcentagem de transferência da matriz pesada para a gema do ovo, da gema do ovo para a progênie e da matriz pesada para a progênie.....	29
Tabela 4. Valor E ajustado médio do IgY específico em soro de matrizes pesadas, gema de ovos e soro de progênie de 1 dia após 12 semanas da dose <i>booster</i> e a média da porcentagem de transferência da matriz pesada para a gema do ovo, da gema do ovo para progênie e da matriz pesada para progênie.....	30
Tabela 5. Efeito do candidato vacinal (VAC) na morfologia intestinal mensurados pela relação altura de vilo dividido pela profundidade de cripta (VCR) de progênie desafiados com SE em vários períodos antes (dai) e após desafio (dpi).....	32
Tabela 6. Altura dos vilos e profundidade das cripta em segmentos de duodeno, jejuno e íleo de progênie desafiados com SE em vários períodos antes (dai) e após desafio (dpi).....	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Matrizes pesadas distribuídas aleatoriamente em boxes metálicos em sala com cortinas, sistema de aquecimento e iluminação e ninhos para postura de ovos conforme orientação do manual da linhagem.....21
- Figura 2. Progênie de um dia de idade alojados em baterias de gaiolas dentro de salas com filtragem de ar e isoladas do ambiente externo, sob aquecimento conforme orientação do manual da linhagem, com ração e água ad libitum.....22
- Figura 3. Ovos embrionados incubados em uma incubadora de acordo com os parâmetros de humidade e temperatura indicados pela linhagem.....23
- Figura 4. Nascedouro utilizado para os ovos embrionados, temperatura e humidade estão de acordo com os parâmetros de humidade e temperatura indicados pela linhagem.....24
- Figura 5. Níveis de IgY no soro de matrizes pesadas nos grupos NV, VAC e BAC após a dose *booster* (7 e 12 semanas). Os dados representam as médias $\pm$ DP. *, $p < 0,05$; ns, não significativo.....28
- Figura 6. Níveis de IgY na gema do ovo de matrizes pesadas nos grupos NV, VAC e BAC após a dose *booster* (7 e 12 semanas). Os dados representam as médias $\pm$ DP. *, $p < 0,05$; ns, não significativo.....28
- Figura 7. Níveis de IgY no soro de pintos provenientes de matrizes pesadas nos grupos NV e VAC antes (1 dai) e após o desafio com SE (1 e 4 dpi). Os dados representam as médias $\pm$ DP. *, $p < 0,05$; ns, não significativo.....29
- Figura 8. Contagem de *S. Enteritidis* em amostras de fígado e tonsila cecal após desafio na progênie dos grupos NV e VAC. Os números da cepa desafio são expressos em log₁₀ de UFC por grama da amostra. Para amostras positivas após enriquecimento, foi utilizado o valor 2 para os cálculos. Os dados representam as médias $\pm$ DP. *, $p < 0,05$; ns, não significativo.....31
- Figura 9. Intestino do grupo NV com 4 dpi, respectivamente fragmentos de duodeno, jejuno e íleo, apresentaram menor VCR e maior descamação epitelial comparada com o grupo VAC – Letras A, C, e E. Intestino do grupo VAC com 4 dpi, duodeno, jejuno e íleo, respectivamente, apresentaram maior VCR e menor descamação epitelial comparado com grupo NV – Letras A, C, e E. Scale bar = 100 μ m.....34

1. INTRODUÇÃO

A atividade avícola desenvolveu-se intensivamente a partir da década de 1960. Em 2019 foram produzidas aproximadamente 100 milhões de toneladas de carne de frango em todo mundo (ABPA, 2019; USDA, 2019). O Brasil é um dos maiores produtores de carne de frango e maior exportador mundial desde 2006, a carne de frango é o produto de origem animal com o maior volume de exportações (ABPA, 2019).

A produção avícola moderna explora aspectos como a criação no menor espaço possível, favorecendo a introdução e a disseminação de patógenos e doenças, os quais poderão permanecer no ambiente por tempo indeterminado, comprometendo a saúde animal e a qualidade do produto final (Penha Filho, 2013). A grande demanda por proteína de origem animal e a necessidade de uma produção em grande escala com alta densidade de alojamento pode induzir efeitos negativos nas respostas fisiológicas das aves, tais como aumento dos níveis de corticosterona, aumento da peroxidação lipídica, da produção de radicais livres e da imunossupressão (Quinteiro-Filho et al., 2012; Kridtayopas et al., 2019). Esses efeitos negativos podem beneficiar a colonização e facilitar a invasão aos órgãos internos por algumas bactérias, como as do gênero *Salmonella*, as quais estão entre os microrganismos que mais causam doenças em lotes de aves comerciais (Gomes et al., 2014; Feye et al., 2016).

Na cadeia produtiva avícola, as infecções causadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* são um sério problema veterinário e humano (Mastroeni et al., 2000). Aves comerciais são um dos principais hospedeiros de *Salmonella* e produtos de origem avícola são considerados uma das principais fontes de infecção humana por *Salmonella*, constituindo um risco potencial para a saúde pública e causando perdas econômicas e zootécnicas para a cadeia produtiva avícola (Liljebjelke et al., 2005). Desde a década de 1980, *Salmonella* Enteritidis (SE) é o principal causador de surtos de *Salmonella* em seres humanos em diversos países (Huberman et al., 2019).

Devido a importância dessa enfermidade na cadeia produtiva diversas medidas preventivas de biossegurança foram adotadas, as quais incluem alojamento de aves livres de *Salmonella*, controle rígido da qualidade da matéria prima e ração das aves, higiene rigorosa dos funcionários, boas práticas de manejo e prevenção da entrada de roedores, insetos e aves silvestres, bem como evitar alojar aves de várias idades no mesmo núcleo e a adoção de outras medidas complementares, tais como uso de probiótico como "exclusão competitiva", controle de vetores e fômites, tratamento térmico das rações, incorporação de ácidos orgânicos na alimentação, desinfecção de ovos incubáveis e o uso de um programa de vacinação eficaz (Davies e Breslin, 2003; Patterson e Burkholder, 2003; Vandeplas et al., 2010; Penha Filho et al., 2015; Huberman et al., 2019).

Todas essas medidas são importantes para impedir a introdução do patógeno nas granjas de aves (Davies e Breslin, 2003; Gast, 2016). No entanto, algumas dessas medidas exigem grande quantidade de mão de obra, não sendo economicamente viáveis ou de difícil implementação em muitos países (Zhang-Barber et al., 1999; Huberman et al., 2019).

Um outro agravante para a disseminação de *Salmonella* é o uso indiscriminado de antimicrobianos, o que constitui um dos principais fatores para a seleção de cepas resistentes (CDC, 2019). Assim, dentre as principais medidas de controle da enfermidade na cadeia avícola, destaca-se o uso de vacinas contra bactéria do gênero *Salmonella*, sendo esta considerada uma das estratégias mais eficientes para o controle das infecções, devido a facilidade de implementação em diferentes processos produtivos em todo o mundo e o seu baixo custo de implementação (Barrow, 2007; Li et al., 2019).

Portanto, tem-se aumentado o investimento para o desenvolvimento de vacinas, pois a estratégia ideal para o controle de *Salmonella* spp. e SE poderia ser o estabelecimento de imunidade nas aves, com a adoção da vacinação (Barrow, 2007).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Descrição do gênero *Salmonella*

As salmoneloses aviárias são provocadas por bactérias do gênero *Salmonella*, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Todas as bactérias deste gênero são microrganismos patogênicos para o homem ou animais (Berchieri Junior, 2000). O gênero *Salmonella* consiste em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014). A espécie *S. 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* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

Dessas seis subespécies mais de 99% de todas as estirpes isoladas de *Salmonella* pertencem a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Fuche et al., 2016). Os sorovares pertencentes a *S. enterica* subsp. *enterica* são tipicamente designados por um nome geralmente relacionado à localização geográfica do local onde o sorovar foi isolado pela primeira vez (Grimont e Weill, 2007).

As bactérias do gênero *Salmonella* são bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentam a glicose, mas são incapazes de fermentar lactose e sacarose, produzem sulfeto de hidrogênio (H₂S), são bactérias não formadores de esporos (Tortora e Funke, 2002) e também são patógenos intracelulares (Marcus et al., 2000). São móveis por meio de flagelos peritríquios, com exceção dos biovares *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (SP) que não possuem flagelos (Hirsch e Zee, 2003).

Existem três enfermidades causadas por bactérias do gênero *Salmonella* em aves: a pulrose, causada por SP; o tifo aviário, cujo agente é SG; e o paratifo aviário, o qual é causado por sorovares não-tifóides (paratíficos) (Poppe, 2000). Dentre as salmonelas paratíficas, destaca-se: *Salmonella* Typhimurium (STM) e *Salmonella* Enteritidis (SE), as quais são importantes causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos (CDC, 2018; Morton et al., 2019).

2.2. Importância da *Salmonella* Enteritidis (SE)

A infecção por SE nas aves é considerada a mais importante devido aos problemas relacionados à saúde animal, as exportações e implicações na saúde pública, uma vez que os produtos de origem avícola contaminados são considerados a principal fonte de infecção humana (Antunes et al., 2003; Lin et al., 2014; Sallam et al., 2014; CDC, 2018; Eeckhaut et al., 2018; Jones-Ibarra et al., 2019; Zhang et al., 2019).

A SE pode causar doença em seres humanos e gerar prejuízos para a indústria, governos e população global. Nos Estados Unidos da América (EUA), o número de infecções por bactérias do gênero *Salmonella* reportados anualmente ao *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), é de aproximadamente 46.000 casos, sendo que destes, aproximadamente 17% são causados por SE (CDC, 2018). No entanto, estima-se que aproximadamente um milhão de casos de salmoneloses ocorra anualmente nos EUA (Huberman et al., 2019). Já em países subdesenvolvidos estima-se que são aproximadamente 10 a 20 milhões de casos de salmoneloses por ano, resultando em 100.000 a 200.000 mortes (Mogasale et al., 2014; Antillón et al., 2017).

Na UE, de acordo com o “*European Food Safety Authority*” (EFSA) houve uma diminuição dos casos confirmados de salmoneloses humana desde 2008, mas com mudança na prevalência de sorovares, pois durante o período de 2012–2016 houve um aumento da proporção de casos de SE em humanos (Huberman et al., 2019). Em 2017, foram notificados 91.662 casos confirmados (19,7 casos por 100.000 habitantes), com a proporção de salmonelose humana por SE continuando a aumentar, embora os números totais de casos confirmados tenham caído (EFSA, 2018).

Portanto, o aumento do número de casos relatados e o de recalls de produtos de origem avícola contaminados pela bactéria mantém a doença como uma questão de grande importância econômica e de saúde pública internacional (CDC, 2018; Morton et al., 2019).

2.3. Epidemiologia da SE

A epidemiologia de *Salmonella* sp. é complexa, pois muitos sorotipos geralmente colonizam o trato digestivo de animais sem causar doença. No entanto, SE é capaz de causar doença sistêmica severa em pintinhos jovens com menos de 3 dias de idade, sendo que em aves mais velhas podem levar à colonização persistente do trato gastrointestinal com baixo envolvimento sistêmico (Berchieri Junior, 2000; Juricova et al., 2013).

Os sinais da infecção por SE em aves jovens são: diarreia, refugagem, asas caídas e sonolência (Zhang-barber et al., 1999; Berchieri Junior, 2000). Em aves adultas, raramente se observam sinais clínicos, mas algumas aves podem apresentar queda na produção de ovos férteis e de consumo em função de alterações em ovário e oviduto, que podem apresentar-se com folículos necróticos, atrofiados ou irregulares (Berchieri Junior, 2000; Penha Filho et al., 2010).

A complexa epidemiologia da *Salmonella* na cadeia produtiva envolve a transmissão vertical, via ovo, causando o nascimento de pintos infectados. O ambiente de criação das aves comerciais em larga escala é propício para o aparecimento de vários sorotipos de *Salmonella*, sendo que, SE se sobressai por conseguir contaminar os ovos férteis e de consumo, mais frequentemente que os outros sorovares segundo dados obtidos em estudos com contaminação oral (Byrd et al., 1999; Gast et al., 2007, 2011, 2019). A maior incidência de contaminação por SE nos ovos, pode ser justificada devido às características do sorovar, tais como, a sua forte aderência à mucosa do trato reprodutivo e a capacidade de invasão das células da granulosa do ovário (Wales e Davies, 2011; Babu et al., 2016).

Portanto, SE tem a capacidade de colonizar os ovários das reprodutoras e contaminar o interior do ovo, penetrando através da membrana da vitelina durante ou após a oviposição, antes mesmo da formação da casca (Gast et al., 2005; Gantois et al., 2009; EFSA, 2010, 2014). Uma outra forma de contaminação por SE, se dá, através da penetração pela casca (Kingsbury et al., 2019) onde verificou-se que vários fatores influenciam a sua invasão, incluindo: condições ambientais (condensação da superfície do ovo e o diferencial de temperatura entre o ambiente externo e o interno do ovo) e integridade da casca (deposição e manutenção da

cutícula afetada pela lavagem dos ovos, porosidade da casca e rachaduras) (Chousalkar et al., 2010; Gole et al., 2014, 2017; Lublin et al., 2015; Whiley et al., 2016).

Uma vez internalizada, a SE pode sobreviver no albúmen mesmo em condições de pH alto e com limitação de ferro por um longo tempo até que a membrana vitelina se deteriore o suficiente para permitir o acesso à gema, a qual é rica em nutrientes (Baron et al., 2016).

A outra via epidemiológica envolve a transmissão horizontal, sendo que o ambiente de criação das aves é implicado como uma das principais fontes de contaminação. A contaminação pode ocorrer pelo contato direto entre as aves ou pelo contato com o conteúdo fecal, substrato de cama, poeira dos aviários, ração, fômites e ingestão de alimentos, além da existência de diferentes espécies animais que constituem reservatórios e vetores da bactéria (Berghaus et al., 2012, 2013; Jones-Ibarra et al., 2019; Zhang et al., 2019). O fluxo de pessoas, equipamentos, aerossóis e poeira em todo o galpão facilita a disseminação da bactéria (Swayne, 2020).

Sugere-se que, em poedeiras comerciais, as infecções por SE são mais comuns pela via horizontal que pela via vertical (Van de Giessen et al, 1994). Sendo muito provável que os frangos de corte e poedeiras, sejam principalmente contaminadas após o nascimento pelo contato com fezes ou fômites, o que pode ocorrer principalmente durante a primeira semana na granja, no incubatório ou através de uma contaminação persistente na granja produtora de ovos embrionados (Van Immerseel et al., 2005).

Cason et al. (1994) observaram que a presença de ovos contaminados com SE infectavam 80% dos pintos nascidos SE-free, mas armazenados nas mesmas caixas que os pintos contaminados, sendo que em 44% dessas aves havia colonização intestinal, sendo o incubatório, um local importante para o controle da disseminação de SE (Holt et al., 1999).

2.4. Implementação de um programa vacinal como medida de controle de SE

Visto a sua complexa epidemiologia e as diversas vias de contaminação é muito importante a criação de programas de controle baseados em testes bacteriológicos e sorológicos para a prevenção da infecção ou para controle da disseminação bacteriana, além de medidas estritas para um abrangente programa de biossegurança (Davies e Breslin, 2003; Patterson e Burkholder, 2003; Vandeplas et al., 2010; Penha Filho et al., 2015; Huberman et al., 2019). Dentre as medidas de biossegurança, o uso de um programa vacinal tem se apresentado com uma efetiva medida de controle contra SE em lotes de aves (Van Immerseel et al., 2005; Berghaus et al., 2011; Penha Filho et al., 2012)

As vacinas são usadas em aves para prevenir a infecção por SE através do desenvolvimento de uma imunidade adquirida (Cerquetti e Gherardi, 2000), podendo reduzir a taxa de transmissão, tanto pela via horizontal quanto pela via vertical (Inoue et al., 2007) e diminuir a prevalência de ovos comerciais contaminados com o patógeno (Darrell et al., 2014).

O uso eficiente de vacinas contra SE pode contribuir para a prevenção da doença, diminuir as manifestações clínicas, reduzir a excreção do patógeno, melhorar o bem estar das aves, bem como indiretamente reduzir o risco de uma doença zoonótica para os seres humanos (Jawale e Lee, 2014a). Assim, a vacinação em reprodutoras leves e pesadas é muito importante para a redução da concentração de SE em ovos comerciais e na sua progênie (Huberman et al., 2019).

O uso de vacinação agrega imunidade as aves por toda a sua vida produtiva (Mastroeni et al., 2000), reduz a duração e severidade da infecção e ajuda na prevenção de reinfecção (Gast et al., 2007). Também, estimulam o sistema imunológico a garantir homeostase do organismo das aves e envolvem uma variedade de reações de defesa baseadas em respostas imunes inatas e adaptativas (Huberman et al., 2019; Kowalczyk et al., 2019).

2.5. Sistema imunológico das aves

O sistema imunológico das aves é dividido em dois tipos básicos: imunidade humoral e imunidade celular. Uma boa resposta imune contra SE em aves é atribuída ao conjunto de ambas as respostas imunes (Penha Filho et al., 2012; Jawale e Lee, 2014a).

A imunidade humoral e imunidade celular são mediados pelos linfócitos B e T, respectivamente, sendo também regulados por dois subtipos de

T auxiliares (Ta1 e Ta2). Tais subpopulações de linfócitos T auxiliares são diferenciadas em função do tipo de citocinas por eles secretadas e sintetizadas (Penha Filho, 2013). Uma boa resposta imune protetora contra SE em aves é atribuída tanto a resposta imune mediada por células quanto a resposta imune humoral (Chappell et al., 2009; Jawale and Lee, 2014b; Kowalczyk et al., 2019).

A resposta imune celular é caracterizada pela participação de linfócitos T citotóxicos (Tc-CD8+) e T secretores de interleucinas (IL) pró-inflamatórias (Ta1 ou T de hipersensibilidade tardia-Ta1-CD4+), que se desenvolvem após o estímulo antigênico sobre os linfócitos T virgens (Montassier, 2000; Chamizo et al., 2001; Penha Filho, 2013). Os linfócitos Tc-CD8+ podem reconhecer e destruir células infectadas pela indução da lise celular, tornando a SE acessível para os fagócitos e outras moléculas bactericidas, também podem produzir citocinas necessárias para o recrutamento e ativação dos fagócitos (Mittrucker et al., 2002; Jawale and Lee, 2014c). A estimulação antigênica de linfócitos virgens Tc CD8+, pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) podem levar ao desenvolvimento de duas linhas; os linfócitos T CD8+ de memória e os linfócitos T citotóxicos efetores (Tc-CD8+).

A diferenciação para Tc-CD8+ é dependente principalmente da produção de IL-12 (Mescher et al., 2006). A IL-12 induz a produção de interferon gama (IFN- γ), uma citocina importante para a imunidade contra a infecção primária por SE (Jouanguy et al., 1999). A IL-10 é uma citocina reguladora que desativa os macrófagos, causando a regulação negativa das respostas inflamatórias (Farrell et al., 1998) e na expressão de IFN- γ pelas Ta1 e promovendo a proliferação de Ta2 e anticorpos (Rothwell et al., 2004; Xu et al., 2004; Penha Filho et al., 2012).

Os linfócitos T CD4⁺ são conhecidas por estarem envolvidas no controle das infecções por *Salmonella* por produzirem ou induzirem os macrófagos a ativarem as citocinas importantes como os IFN- γ e TNF- α (Mcsorley et al., 2000; Jawale and Lee, 2014c). Os macrófagos e linfócitos T CD4⁺ interagem via receptores do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) e são extremamente importantes para respostas imunes contra patógenos intracelulares como a *Salmonella* (Park et al., 2010). O CD4 interage com o complexo MHC classe II enquanto o CD8 se liga com o complexo MHC classe I (Sekelova et al., 2017). Os macrófagos aviários também são capazes de produzir altas concentrações de óxido nítrico (NO) (Crippen et al., 2003; Braukmann et al., 2015, 2016) o qual está envolvido na atividade bactericida contra infecções por *Salmonella* (Chakravorty and Hensel, 2003). Os linfócitos T CD4⁺ também auxiliam os linfócitos B na produção de imunoglobulinas e na geração de linfócitos T CD8⁺ específicas para *Salmonella* (Mittrucker e Kaufmann, 2000).

A resposta imune humoral vacinal, no caso das aves (*Gallus gallus*), está associada a três classes de imunoglobulinas: IgY, IgM e IgA, as quais são, respectivamente, homólogas às IgG, IgM e IgA dos mamíferos (Kowalczyk et al., 2019). As imunoglobulinas são produzidas por plasmócitos derivados de linfócitos B estimulados após contato e reconhecimento de antígenos, T-dependentes ou T-independentes, com e sem, respectivamente, a participação de linfócitos T auxiliares (T_H-CD4⁺) (Montassier, 2000; Chamizo et al., 2001; Penha Filho, 2013).

As imunoglobulinas são fundamentais para restringir a invasão intestinal por SE e sua posterior disseminação para tecidos linfóides e órgãos como fígado e baço (Mastroeni et al., 2000). Atividade exercida principalmente pela IgA, a qual é encontrada em grande quantidade na bile das aves, sendo secretada diretamente na luz intestinal, o que impede a aderência, invasão intestinal e multiplicação da bactéria no intestino, sendo que os leucócitos polimorfonucleares (PMN) juntamente com a IgA atua na eliminação intestinal da SE causando a sua destruição antes que a bactéria penetre na membrana celular da mucosa (Riquelme and Susan, 2012; Penha Filho, 2013; Beirão et al., 2018; Zhang et al., 2019). IgA, os leucócitos PMN e os linfócitos quando associados à mucosa constituem-se na primeira linha de defesa

contra infecções causadas por SE, mesmo que a colonização do trato entérico seja difícil de prevenir (Sheela et al., 2003; Adriaensen et al., 2007).

A IgY aviária é considerada o ancestral evolutivo da IgG e da IgE dos mamíferos e combina a função de ambos: a IgY é o principal mecanismo de defesa contra infecções sistêmicas (semelhante à IgG) mas também atua como um anticorpo sensibilizante da pele que pode mediar reações anafiláticas (similar ao IgE) (Warr et al., 1995; Ulmer-Franco et al., 2012).

A IgY como um anticorpo sistêmico, também desempenha um importante papel no controle da SE virulenta, a qual induz a apoptose de fagócitos mononucleares que escapam das células infectadas, movendo-se através do espaço extracelular para outros locais do tecido a fim de estabelecer outros focos de infecção (Dougan et al., 2011). Assim, quando a bactéria atinge o meio extracelular, os anticorpos sistêmicos opsonizam as SE, o que aumenta a captação de receptores mediados por macrófagos (Okamura et al., 2012). Os anticorpos sistêmicos e de mucosa específicos para SE auxiliam no controle da bactéria nos estágios iniciais da infecção, pois nesses períodos a bactéria é extracelular e acessível aos anticorpos, assim os anticorpos podem causar o aumento da morte e inativação bacteriana antes que a mesma penetre na membrana da célula (Riquelme e Susan, 2012; Jawale e Lee, 2014d; a).

Um outro fator que é extremamente importante para a resposta imune humoral, principalmente em aves adultas, é o correto funcionamento do sistema reprodutivo e seus mecanismos imunológicos nas aves reprodutoras, o qual tem um grande impacto na imunidade que é transferida passivamente para a progênie. Visto que, o sistema imune de um pintinho recém-nascido não é totalmente desenvolvido e incapaz de fornecer proteção completa contra patógenos, sendo os linfócitos B secretores de imunoglobulinas detectados na circulação somente em pintinhos com 6 dias de idade, e o nível máximo de IgM, IgY e IgA, somente é detectado no soro com 40, 56 e 87 dias, respectivamente (Lawrence et al., 1981; Holt et al., 1999; Ulmer-Franco et al., 2012).

O sistema imune imaturo torna os pintinhos recém nascidos extremamente susceptíveis a qualquer infecção por *Salmonella* sendo necessário menos de 100 células para infecta-los (Cox et al., 1990). Portanto, os anticorpos maternos (matAc),

IgY, IgA e IgM, transferidos para o ovo, desempenham uma função protetora importante durante o desenvolvimento embrionário e nas primeiras semanas após o nascimento até o que sistema imune do pintinho se torne totalmente eficiente (Kowalczyk et al., 2019), pois ao contrário dos mamíferos, que obtém os anticorpos maternos logo após o nascimento via colostro, todas as imunoglobulinas maternas necessárias para proteger o pintinho recém-nascido devem ser incorporadas ao ovo antes do mesmo ser produzido (Rose et al., 1974; Ulmer-Franco, 2012).

O IgY é a principal imunoglobulina transferida para a gema do ovo, sendo a IgA e a IgM presente em quantidades mínimas (Ulmer-Franco et al., 2012). A transferência do IgY da reprodutora para o pintinho ocorre em um processo de dois passos: inicialmente o IgY circulante é transferido do sistema sanguíneo da reprodutora para o folículo ovariano (gema do ovo), num processo exigente e está extremamente relacionado à concentração sérica de IgY na reprodutora (Morrison et al., 2002) e posteriormente o IgY é transferido da gema do ovo para o embrião via circulação embrionária (Ulmer-Franco et al., 2012; Bhattacharyya et al., 2018). O saco vitelino (SV), uma membrana altamente vascularizada que circunda a gema durante o desenvolvimento embrionário, é conhecida por transferir nutrientes da gema do ovo para o embrião de galinha, sendo que a absorção do seu conteúdo na primeira semana de vida dos pintinhos é extremamente essencial para o crescimento e desenvolvimento intestinal (Kawalilak et al., 2010; Ulmer-Franco et al., 2012). É importante destacar que uma infecção ou uma vacinação contra SE leva ao aumento do nível de anticorpos IgY e IgA específicos (Barrow, 1994; Huberman et al., 2019; Kowalczyk et al., 2019).

2.6. Diferentes tipos de vacinas contra SE

Devido a importância do sistema imune no controle de SE, diferentes tipos de vacinas tem sido amplamente adotadas pela indústria avícola mundial, de acordo com os desafios de cada região e a legislação vigente (Van Immerseel et al., 2005; Freitas Neto et al., 2008; Majowicz et al., 2010; Berghaus et al., 2011; Muniz et al., 2017).

Muitas vacinas foram testadas para controle de SE em aves com resultados variados, sendo os principais tipos utilizados: vacinas vivas atenuadas e vacinas inativadas (Huberman et al., 2019). As vacinas vivas com cepas atenuadas são largamente utilizadas em poedeiras, enquanto vacinas inativadas são mais comuns em lotes de reprodutoras (Eeckhaut et al., 2018).

Lotes de frango de corte não são frequentemente vacinados contra SE devido a sua alta taxa de crescimento e seu pouco tempo de criação para atingir o peso de abate, além de que, vacinas vivas nos primeiros dias de vida podem ser neutralizadas quando os títulos de anticorpos maternos são altos (Eeckhaut et al., 2018; Kowalczyk et al., 2019). Nos últimos anos, algumas vacinas vivas contra *Salmonella* Heidelberg (SH) tem sido desenvolvidas e apresentado relativo sucesso no controle de SH em aves recém eclodidas (Muniz et al., 2017). Uma outra linha de estudo, é o crescimento da produção de frangos de corte de crescimento lento ("*slow growing*"), principalmente em países da UE, os quais apresentam um tempo maior de criação até o abate podendo apresentar tempo hábil para uma adequada resposta imunológica a diferentes tipos de vacina (Aviagen, 2018; Hubbard, 2019).

Vacinas vivas também tem sido usadas com relativo sucesso na redução da contagem de SE em órgãos internos e ceco em lotes de perus (Hesse et al., 2016; 2018)

2.6.1. Vacinas vivas atenuadas

Vacinas vivas atenuadas induzem forte resposta humoral e celular (Rana and Kulshreshtha, 2006; Penha Filho et al., 2012), especialmente quando a cepa vacinal é invasiva e capaz de apresentar antígenos específicos e íntegros. Penha Filho et al. (2010) observaram que reprodutoras leves infectadas com cepas invasivas de SE apresentaram uma alta imunidade contra reinfeção. Vacinas vivas são capazes de colonizar o intestino e assim, providenciar resposta imune de mucosa, bem como potencializar a exclusão competitiva com outras estirpes de *Salmonella* no trato gastrointestinal (Holt and Gast, 2004; van Immerseel et al., 2005; Barrow, 2007; Yang et al., 2017). Também, induzem mecanismos de proteção mesmo durante o

"gap de imunidade", que compreende o tempo entre a vacinação e o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Braukmann et al., 2016).

Diferentemente das vacinas inativadas, as vacinas vivas atenuadas são capazes de produzir fortes respostas mediadas por células e respostas humorais, no entanto, possuem as desvantagens de um possível potencial de reversão de virulência e contaminação do ambiente pela excreção nas fezes (Freitas Neto et al., 2008; Kwon e Cho, 2011; Chaudhari et al., 2012). Devido a esses fatores muito países ainda não permitem o uso de vacinas vivas em plantéis de reprodutoras, sendo que o Brasil, por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) até o ano de 2017, somente permitia o uso de vacinas inativadas (bacterinas) em estabelecimentos matrizeiros de aves pesadas com intuito de reduzir a infecção por SE (BRASIL, 2003). No entanto, em 2017, o MAPA através da IN nº 41 liberou o uso de vacinas vivas em lotes de matrizes e manteve o uso facultativo de vacinas autógenas desde que estas obedeçam à legislação vigente. Todavia, em estabelecimentos avoseiros, bisavoseiros e em granjas de seleção genética de reprodutoras primárias (linhas puras) está vedado o uso de qualquer tipo de vacina contra *Salmonella* (BRASIL, 2017).

Em reprodutoras leves, vacinas vivas tem demonstrado redução na recuperação de SE em órgãos internos e conteúdo cecal em aves vacinadas e desafiadas com SE (Penha Filho et al., 2010; Springer et al., 2011). A vacinação contra SE é considerada obrigatória em diversos países da UE, incluindo a Bélgica, onde a vacinação se tornou obrigatória desde 2007, após esse período houve redução na incidência de SE em lotes de poedeiras vacinadas, bem como em ovos de consumo e consequentemente em surtos alimentares causados por SE em humanos, indicando que vacinas vivas podem funcionar como uma medida útil na redução de DTAs ocasionadas por produtos de origem avícola contaminados por SE (EFSA, 2007;2011; Collard et al., 2008).

2.6.2. Vacinas Inativadas

As vacinas inativadas estimulam uma excelente produção de anticorpos (Huberman et al., 2019), os quais produzem proteção específica contra o sorovar,

sendo está de longa (Woodward et al., 2002b) ou de curta duração (Singh, 2009), mas são ineficazes na proliferação de células do sistema imune, ou seja, em estimular a resposta imune mediada por células (Babu et al., 2003).

Mesmo assim, vários estudos tem demonstrado que os anticorpos maternos produzidos por reprodutoras vacinadas pode ser transmitido para os pintinhos fornecendo alguma proteção contra a colonização por SE (Young et al., 2007; Inoue et al., 2008; Berghaus et al., 2011; Baxter, 2015).

Um dos componentes das vacinas inativadas são os adjuvantes, que são responsáveis por auxiliar o antígeno a iniciar uma rápida resposta imune intensa e duradoura e utilizar a menor quantidade possível de antígeno (Gupta & Sibaer, 1995; He et al, 2000). Os adjuvantes também constituem um dos principais custos da vacina inativada.

Vacinas inativadas podem ser produzidas baseadas em um adjuvante oleoso ou em um gel alumínio e ferro restrito, podendo ser monovalente contra SE (Gast et al., 1992; Woodward et al., 2002b; Babu et al., 2003; Hedegaard e Heegaard, 2016), ou conter mais de um sorotipo de *Salmonella*, pois a proteção cruzada entre diferentes sorogrupos é limitada (Bailey et al., 2007; Baxter, 2015). Esses tipos de vacinas podem ser bivalente contendo os sorovares Enteritidis e Typhimurium (Clifton-Hadley et al., 2002; Okamura et al., 2007), trivalente contendo os sorovares Enteritidis, Typhimurium e Gallinarum (Deguchi et al., 2009), ou Enteritidis, Typhimurium, e Kentucky (Ibrahim et al., 2018).

Como pontos negativos, as vacinas inativadas convencionais durante o seu processo de produção envolvem o uso de processo térmicos ou químicos para inativar as células bacterianas, os quais podem afetar a estrutura físico química ou estrutural dos antígenos bacterianos de superfície reduzindo assim a sua imunogenicidade (Meeusen et al., 2007; Jawale e Lee, 2014a)

Nas vacinas inativadas, também podem ocorrer perdas nas suas aplicações, pois as vacinas precisam de uma administração conjunta com um adjuvante químico requerendo sempre um método de injeção, que não é nada pratico na indústria avícola devido ao grande número de animais nos lotes de aves (Yang et al., 2017).

Além disso, pode ser necessário múltiplas doses para atingir a proteção imunológica de longa duração, sendo que esse processo pode gerar um grande

risco de reações alérgicas ou sarcomas nos locais da vacinação que podem ser observados no momento do abate das aves (Jalava et al., 2002; Jawale e Lee, 2014a).

A eficácia e qualidade das vacinas inativadas estão relacionadas com a cepa utilizada e com o procedimento de inativação, além do adjuvante e do meio de cultura utilizados no preparo da vacina (Barbour et al., 1993). Sendo portanto, uma tarefa difícil a comparação precisa da eficácia das vacinas disponíveis atualmente, visto as diferentes cepas e procedimentos de inativação utilizados (van Immerseel et al., 2005).

2.7. Vacinas inativadas como medida de controle de SE

O uso de vacinas contra SE na indústria de aves pode reduzir a transmissão da doença, prevenir as manifestações clínicas e melhorar o bem estar das aves, reduzindo o potencial zoonótico da doença para seres humanos e diminuindo seus prejuízos econômicos. No entanto, estudos a respeito de vacinas de SE inativadas tem apresentados resultados controversos sobre a sua proteção contra o patógeno (Methner e Steinbach, 1997; Miyamoto et al., 1999; Woodward et al., 2002b; Young et al., 2007; Inoue et al., 2008; van Immerseel et al., 2005; Dórea et al., 2010; Berghaus et al., 2011; Baxter, 2015; Wigley and Barrow, 2017; Huberman et al., 2019).

Vacinas inativadas contra SE têm sido usadas em vários países em larga escala em lotes de reprodutoras pesadas e leves com satisfatório nível de sucesso contra o patógeno (Miyamoto et al., 1999; Woodward et al., 2002b; van Immerseel et al., 2005; Wigley and Barrow, 2017; Huberman et al., 2019).

O uso em lotes de reprodutoras pesadas tem como objetivo, a redução da transmissão de SE pela via vertical, além de fornecer anticorpos maternos à progênie, assim reduzindo a prevalência e a carga de SE em lotes de frangos de corte e no abatedouro, diminuindo o número de casos de contaminação por SE em produtos avícolas (Young et al., 2007; Dórea et al., 2010; Berghaus et al., 2011; Baxter, 2015).

Em reprodutoras leves, esquemas vacinais utilizando vacinas inativadas tem sido utilizado com sucesso em diversos países, pois como a SE pode contaminar os ovos sem causar sinais clínicos evidentes ou redução acentuada de produtividade nas aves, sua presença pode permanecer despercebida, por isso a adoção de um esquema vacinal se torna imprescindível (Miyamoto et al., 1999; Huberman et al., 2019). Um exemplo de sucesso foi descrito no Reino Unido que após a introdução de vacinas inativadas para lotes de reprodutoras leves, observaram uma diminuição na prevalência de SE, acompanhada de uma diminuição no número de casos de DTAs por SE (Cogan and Humphrey, 2003; Wigley and Barrow, 2017).

Em 8 países europeus, onde a vacinação contra SE não é obrigatória, a proporção de amostras positivas para SE foi significativamente maior em lotes não vacinados em comparação com lotes vacinados (EFSA, 2006). Diversos trabalhos anteriores têm sugerido que vacinas inativadas constitui-se como uma ferramenta viável para o controle de SE seja para a redução da prevalência de SE em ovos férteis ou comerciais, seja na redução da recuperação de SE em órgãos internos e fragmentos intestinais de progênie provenientes de reprodutoras vacinadas com bacterina e desafiadas com SE nos primeiros dias de vida (Holt et al., 1996, 1999; Methner e Steinbach, 1997; Miyamoto et al., 1999; Cogan e Humphrey, 2003; Davies e Breslin, 2003; Inoue et al., 2008; Atterbury et al., 2009; Dórea et al., 2010; Berghaus et al., 2011; Liu et al., 2014; Baxter, 2015; Wigley and Barrow, 2017).

No entanto, resultados contraditórios de proteção contra SE foram encontrados principalmente pela característica desta bactéria ser um patógeno intracelular facultativo, de forma que quando a bactéria está se multiplicando no ambiente intracelular, fica inacessível aos anticorpos e o controle é realizado por uma resposta imune específica mediada por células que são capazes de lisar e destruir as células infectadas (Tran et al., 2010; Penha Filho et al., 2012; Baxter, 2015; Huberman et al., 2019).

Assim é extremamente importante compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune e buscar a melhor proteção vacinal contra SE, principalmente devido aos impactos financeiros e de saúde pública que a bactéria pode causar. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a eficácia de um candidato a vacina inativada recombinante contra SE mensurando a sua capacidade

de produzir imunoglobulinas (IgY) em matrizes pesadas, ovos embrionados e progênie, avaliando a proteção contra SE na progênie de aves vacinadas, por meio da avaliação histopatológica da morfologia intestinal e contagem bacteriana no fígado e conteúdo cecal.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar a eficácia de um candidato vacinal inativado recombinante contra SE
- Avaliar a proteção induzida pela imunidade materna contra SE

3.2. Específicos

- Mensurar a indução de imunoglobulinas (IgY) pela candidata vacinal em matrizes pesadas, em ovos embrionados e progênes
- Avaliar a recuperação de SE em fígado e conteúdo cecal em progênes desafiadas com SE
- Avaliar a morfologia intestinal em progênes desafiadas com SE

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo dos inóculos e candidato vacinal

As culturas do inóculo de SE^{NalSpec}, utilizado no desafio foram semeadas em caldo Luria-Bertani (LB) (Invitrogen 12780-052) e incubadas por 24 horas a 37°C, em agitação (100rpm). Uma amostra da cultura foi diluída decimalmente em 0,9 mL de tampão salina, pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10. De cada diluição foi retirado 0,1 mL e despejado em placas com ágar verde brilhante (Oxoid CM0263) contendo novobiocina (1 µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VB Nal/Nov), e incubados a 37°C/24h. O número de colônias por mililitro de caldo LB foi transformado em log₁₀ para apresentação dos resultados. A cultura utilizada no desafio continha aproximadamente 10⁷ UFC por pinto. As 3 proteínas vacinais foram expressas em *E. coli* BL21, de acordo com Sambrook et al. (1989). No grupo vacinado, 100ug do pool de proteínas recombinantes (FinO, PndC e YadA) adicionados de nanopartículas de dióxido de silício (1µg/mL), foram administrados por via intramuscular no músculo peitoral em cada reprodutora às 17 semanas e uma dose *booster* às 20 semanas de idade.

4.2. Aves e desenho experimental

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Ornitopatologia e no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária, Departamento de Patologia Veterinária, da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal. Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Uso Ético dos Animais - CEUA - UNESP e cumpriram os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (CEUA n.015616 / 2018).

Foram alojadas 30 aves matrizes de corte fêmeas com 10 semanas de idade e 5 aves machos da mesma idade, todas com status *Salmonella*-free, obtidas de uma empresa avícola da região, e submetidos a testes bacteriológicos e sorológicos

para verificação do status *Salmonella*-free (Penha Filho et al., 2012). As aves foram acondicionadas ao acaso em boxes metálicos em sala com cortinas, sistema de aquecimento e iluminação e ninhos para postura de ovos conforme orientação do manual da linhagem. Machos e fêmeas foram criados separados até o acasalamento e seguiram os manejos necessários conforme sugerido pelo manual de manejo da linhagem. As aves não foram vacinadas contra *Salmonella* e seguiram o protocolo de colheita e identificação de *Salmonella* estabelecido no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil (BRASIL, 2003).

No experimento I, 3 grupos contendo 35 aves no total foram alojados e a vacinação foi realizada as 17 e 20 semanas de idade, conforme descrito na tabela 1 e demonstrado na Figura 1.

Tabela 1. Esquemas vacinais testados em aves reprodutoras pesadas

Grupos	Números de aves fêmeas	Números de aves machos	1ª dose (17 semanas)	2ª dose (20 semanas)
Não vacinado (NV)	13	2	Não vacinado	Não vacinado
Vacinado com candidato vacinal (VAC)	13	2	Candidato vacinal	Candidato vacinal
Bacterina comercial (BAC)	4	1	Bacterina	Bacterina

Candidato vacinal e bacterina (0,5 mL - intramuscular). As vacinas foram aplicadas na musculatura peitoral das aves.



Figura. 1: Matrizes pesadas acondicionadas ao acaso em boxes metálicos em sala com cortinas, sistema de aquecimento e iluminação e ninhos para postura de ovos conforme orientação do manual da linhagem.

No experimento II, 40 pintos progênie de um dia de idade foram alojados em baterias de gaiolas, sob aquecimento, ração e água *ad libitum*, dentro de salas com filtragem de ar e isoladas do ambiente externo conforme descrito na tabela 2 e ilustrado na figura 2.

Tabela 2. Progênes desafiadas com SE

Grupos	Número de aves
Não vacinado (NV)	20
Vacinado com candidato vacinal (VAC)	20

As progênes dos grupos NV e VAC são provenientes dos ovos embrionados do experimento I.



Figura. 2: Progênes de um dia de idade alojados em baterias de gaiolas dentro de salas com filtragem de ar e isoladas do ambiente externo, sob aquecimento conforme orientação do manual da linhagem, com ração e água ad libitum.

No segundo dia de vida as aves foram desafiadas por via oral (diretamente no papo) com 0,2 mL de inóculo contendo 10^7 UFC de SE^{NalSpec} por pinto. Um dia antes do desafio (1 dai) e um e quatro dias pós-infecção (dpi) cinco aves de cada grupo foram sacrificadas para a colheita de sangue, amostras de fígado e conteúdo cecal e fragmentos de intestino.

4.3. Extração de anticorpos da gema de ovos e incubação dos ovos embrionados

Foram colhidos ovos embrionados e soro das matrizes entre 7 e 12 semanas após a dose *booster* para quantificação de IgY. A extração de IgY da gema foi realizada de acordo com método descrito por Kowalczyk et al. (2019) e no item 4.4. Foram coletados 50 ovos embrionados dos grupos NV e VAC, 7 semanas após a dose *booster* e incubados em uma incubadora e um nascedouro caseiro conforme ilustrado nas figuras 3 e 4, de acordo com os parâmetros de humidade e temperatura indicados pelo manual da linhagem, conforme demonstrado nas figuras 3 e 4. Após o início da eclosão foi definido uma janela de nascimento para a colheita dos pintainhos, conforme descrito por Tong et al. (2013).



Figura. 3: Ovos embrionados incubados em uma incubadora de acordo com os parâmetros de humidade e temperatura indicados pelo manual da linhagem



Figura. 4: Nascedouro utilizado para os ovos embrionados, temperatura e humidade estão de acordo com os parâmetros de humidade e temperatura indicados pelo manual da linhagem

4.4. Extração de anticorpos da gema de ovos

Os ovos embrionados foram colocados em placas de Petri e lavadas com tampão salina, pH 7,4 (PBS) para remoção dos resíduos da clara do ovo. Foram rompidas a membrana da gema com o auxílio de tesouras e o conteúdo coletado com seringas. As gemas dos ovos (3 mL / ovo) foram transferidas para tubos de ensaio tipo Falcon de 15 mL, e adicionadas um volume duplo (6 mL) de solução salina tamponada (PBS). Após serem cuidadosamente agitadas em um vórtex, foi-se adicionado 6 mL de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 1,000× g em temperatura ambiente por 30 minutos em uma centrífuga. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 ° C até serem analisados (Kowalczyk et al., 2019).

4.5. Produção de anticorpos

O método ELISA foi realizado para quantificar as imunoglobulinas IgY presentes no soro das matrizes pesadas e progênie e nas gemas dos ovos conforme descrito por Penha Filho et al. (2012), utilizando o candidato a vacina diluído em PBS na proporção 1:40.000 como antígeno. Os valores de densidade óptica (DO) foram usados para calcular o valor E ajustado conforme a seguinte fórmula : $ELISA\ valor = (S_{OD492} - NEG_{OD492}) / (POS_{OD492} - NEG_{OD492})$, onde S_{OD492} , NEG_{OD492} , e POS_{OD492} representam as densidades ópticas a 492 nm da amostra, controle negativo e controle positivo, respectivamente. Os soros positivos contra SE foram obtidos após triagem de amostras de aves imunizadas. Os soros negativos foram obtidos de galinhas SPF com 10 semanas de idade. A porcentagem de IgY transferido das matrizes pesadas para os ovos embrionados e para a progênie foi calculada de acordo com as fórmulas descritas por Kowalczyk et al. (2019). Para o cálculo foram usadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Transferência da matriz para o ovo} = \frac{\text{média do valor E ajustado na gema dos ovos}}{\text{média do valor E ajustado no soro de matrizes}} \times 100$$

$$\text{Transferência do ovo para a progênie} = \frac{\text{média do valor E ajustado no soro das progênies}}{\text{média do valor E ajustado na gema dos ovos}} \times 100$$

$$\text{Transferência da matriz para a progênie} = \frac{\text{média do valor E ajustado no soro das progênies}}{\text{média do valor E ajustado no soro de matrizes}} \times 100$$

4.6. Contagem bacteriana

As amostras de fígado e conteúdo cecal foram colhidas e colocadas em tampão salina tamponada pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10, maceradas (o conteúdo cecal foi homogeneizado) e diluídas decimalmente em 0,9 mL de PBS. De cada diluição foi retirado 0,1 mL, e despejado em ágar verde brilhante (AVB) contendo espectinomicina (100 µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VBNal/Spec), as placas foram incubadas a 37°C por 24h. O número de colônias por grama de órgão foi transformado em log10 para análise dos resultados. Na ausência de

crescimento, aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10), foi adicionado igual volume de caldo selenito contendo novobiocina (0,04%), preparado em concentração dupla. O frasco foi incubado a 37°C por 24h e o seu conteúdo semeado em VBNal/Spec, com nova incubação a 37°C por 24h.

4.7. Determinação da morfologia intestinal

Três aves de cada grupo foram eutanasiadas a 1 dai, 1 e 4 dpi para a colheita de material. Segmentos de 3 cm do duodeno, jejuno e íleo foram removidos cuidadosamente e fixados em solução de formaldeído a 10%. Todas as amostras de cada um dos pintinhos foram coletadas da mesma área de cada segmento do trato intestinal conforme descrito por Jazi et al. (2018). Os segmentos foram processados e coloridos com hematoxilina-eosina conforme descrito por Zhang et al. (2019).

A altura das vilosidades e a profundidade das criptas foram observadas e medidas de acordo com Özdoğan et al. (2011) sob microscopia de luz (Olympus®, BX50) e a razão entre a altura da vilosidade e a profundidade da cripta (VCR) foram calculadas conforme descrito por Santin et al. (2001).

4.8. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados para verificar a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, em seguida foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), quando a diferença entre os dados foram significativa, as médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando-se nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$) (Zar, 2009). As análises estatísticas foram feitas utilizando o Prism software version 6.02 for Windows (GraphPad Software, Inc.).

5. RESULTADOS

5.1. Níveis de anticorpos no soro e ovos de matrizes pesadas e no soro das progênies

A eficácia de cada esquema de vacinação foi primeiramente avaliada pelo nível de anticorpos. Os níveis de IgY no soro de matrizes pesadas foram significativamente maiores no grupo VAC comparado com o grupo NV as 7 e 12 semanas após a dose *booster* ($p < 0,05$; Fig. 5).

Na gema dos ovos embrionados, os níveis de IgY foram significativamente maiores no grupo VAC comparado com os demais grupos nos dois períodos ($p < 0,05$; Fig. 6).

No soro de pintos provenientes de matrizes pesadas houve diferença significativa no grupo VAC em todos os períodos antes e pós desafio com SE, 1 dai, 1 e 4 dpi ($p < 0,05$; Fig. 7). Não foram utilizados as progênies do grupo bacterina, pois não houve diferença significativa na concentração de IgY na gema de ovos embrionados dos grupos NV e BAC e o intuito do trabalho foi avaliar o candidato vacinal (VAC) em relação ao grupo não vacinado (NV).

Os valores de Média E ajustado no soro de matrizes e pintos e na gema de ovo estão descritos nas Tab. 3 e Tab. 4, com uma taxa de transferência de IgY do soro de matrizes pesadas para a gema de ovos de 93,44% e 67,14%, respectivamente, nos grupos VAC e BAC no primeiro período e 78,89% e 41,94%, respectivamente nos grupos VAC e BAC no segundo período. A taxa de transferência de IgY da gema do ovo para a progênie do grupo VAC foi de 98,59% e a taxa de transferência do soro de matrizes pesadas para o soro de progênies do grupo VAC foi de 92,11%. A porcentagem de transferência de anticorpos foi calculada de acordo com as fórmulas descritas acima.

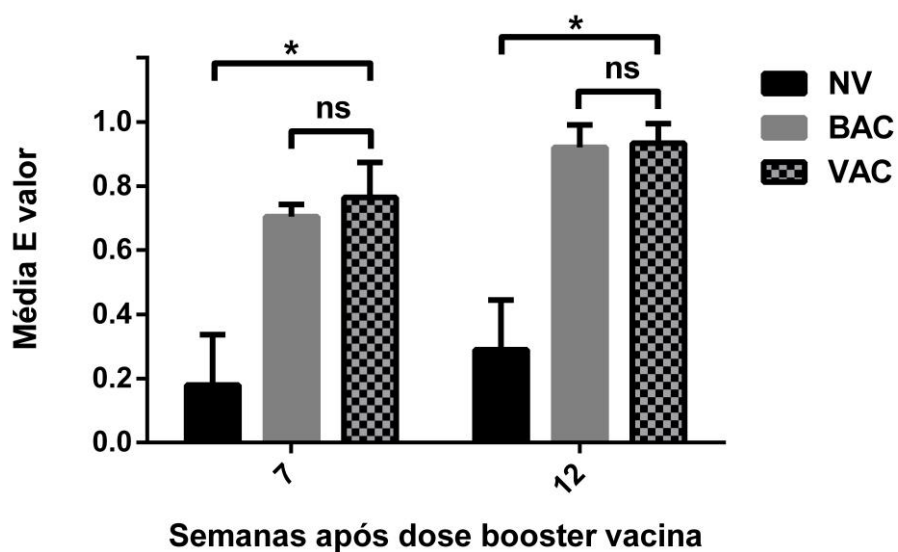


Figura 5. Níveis de IgY no soro de matrizes pesadas nos grupos NV, VAC e BAC após a dose *booster* (7 e 12 semanas). Os dados representam as médias $\pm$ DP. *, $p < 0,05$; ns, não significativo.

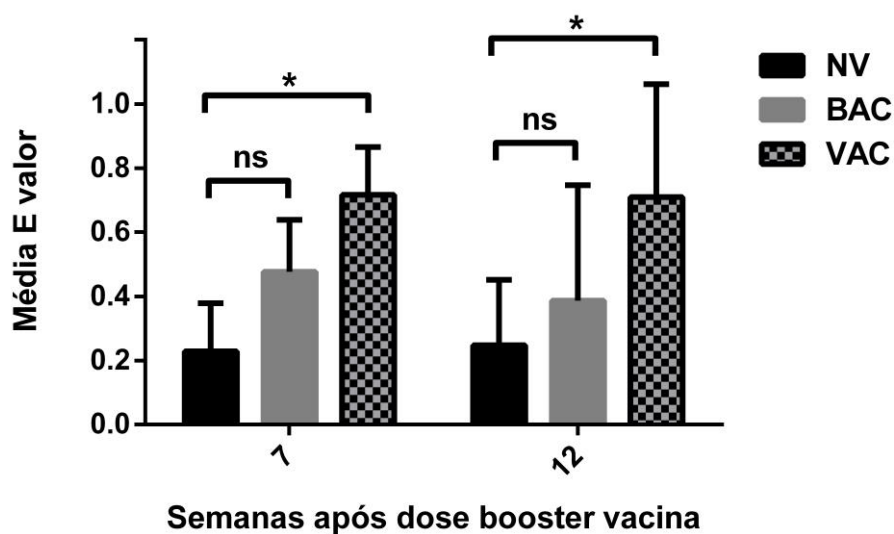


Figura 6. Níveis de IgY na gema do ovo de matrizes pesadas nos grupos NV, VAC e BAC após a dose *booster* (7 e 12 semanas). Os dados representam as médias $\pm$ DP. *, $p < 0,05$; ns, não significativo.

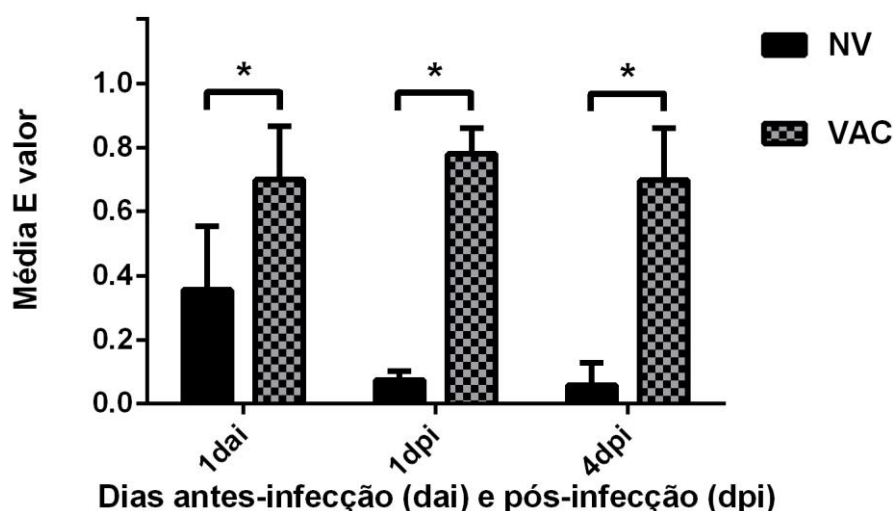


Figura 7. Níveis de IgY no soro de pintos provenientes de matrizes pesadas nos grupos NV e VAC antes (1 dai) e após o desafio com SE (1 e 4 dpi). Os dados representam as médias $\pm$ DP. *, $p < 0,05$; ns, não significativo.

Tabela 3. Valor E ajustado médio do IgY específico em soro de matrizes pesadas, gema de ovos e soro de progênie de 1 dia após 7 semanas da dose *booster* dos tratamentos e a média da porcentagem de transferência da matriz pesada para a gema do ovo, da gema do ovo para a progênie e da matriz pesada para a progênie

Grupos	Média do valor E ajustado no soro de matrizes	Média do valor E ajustado na gema dos ovos	Média do valor E ajustado na progênie de 1 dia de idade	Média da transferência de IgY do soro das matrizes para as gemas dos ovos (%)	Média da transferência de IgY do soro das matrizes para as progênies (%)	Média da transferência de IgY das gemas dos ovos para as progênies (%)
NV	0,21 $\pm$ 0,18b	0,25 $\pm$ 0,20b	0,36 $\pm$ 0,20b	-	-	-
VAC	0,76 $\pm$ 0,10a	0,71 $\pm$ 0,19a	0,70 $\pm$ 0,17a	93,42	92,11	98,59
BAC	0,70 $\pm$ 0,03a	0,47 $\pm$ 0,16ab	-	67,14	-	-
P- value	<0,001	<0,001	0,018			

a,b na mesma coluna, médias com sobrescritos diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). Dados são expressos como média $\pm$ DP.

Tabela 4. Valor E ajustado médio do IgY específico em soro de matrizes pesadas, gema de ovos e soro de progênie de 1 dia após 12 semanas da dose *booster* e a média da porcentagem de transferência da matriz pesada para a gema do ovo, da gema do ovo para progênie e da matriz pesada para progênie.

Grupos	Média do valor E ajustado no soro de matrizes	Média do valor E ajustado na gema dos ovos	Média da transferência de IgY das matrizes para as gemas dos ovos (%)
NV	0,30 ± 0,20b	0,26 ± 0,23b	-
VAC	0,90 ± 0,09a	0,71 ± 0,35a	78,89
BAC	0,93 ± 0,09a	0,39 ± 0,36ab	41,94
P- Value	<0,001	0,001	

a,b na mesma coluna, médias com sobrescritos diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). Dados são expressos como média ± DP.

5.2. Contagem de SE

Foi avaliada a contagem bacteriana após desafio com a cepa de SE no fígado e conteúdo cecal (Fig. 8). A 1 dpi, a cepa de desafio foi detectada somente nas amostras de conteúdo cecal nos grupos NV e VAC sem diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). A 4 dpi, a SE foi recuperada no fígado e conteúdo cecal de todos os grupos, porém não foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p > 0,05$). Não foi encontrada nenhuma mortalidade ou sinal clínico nas progênies do estudo.

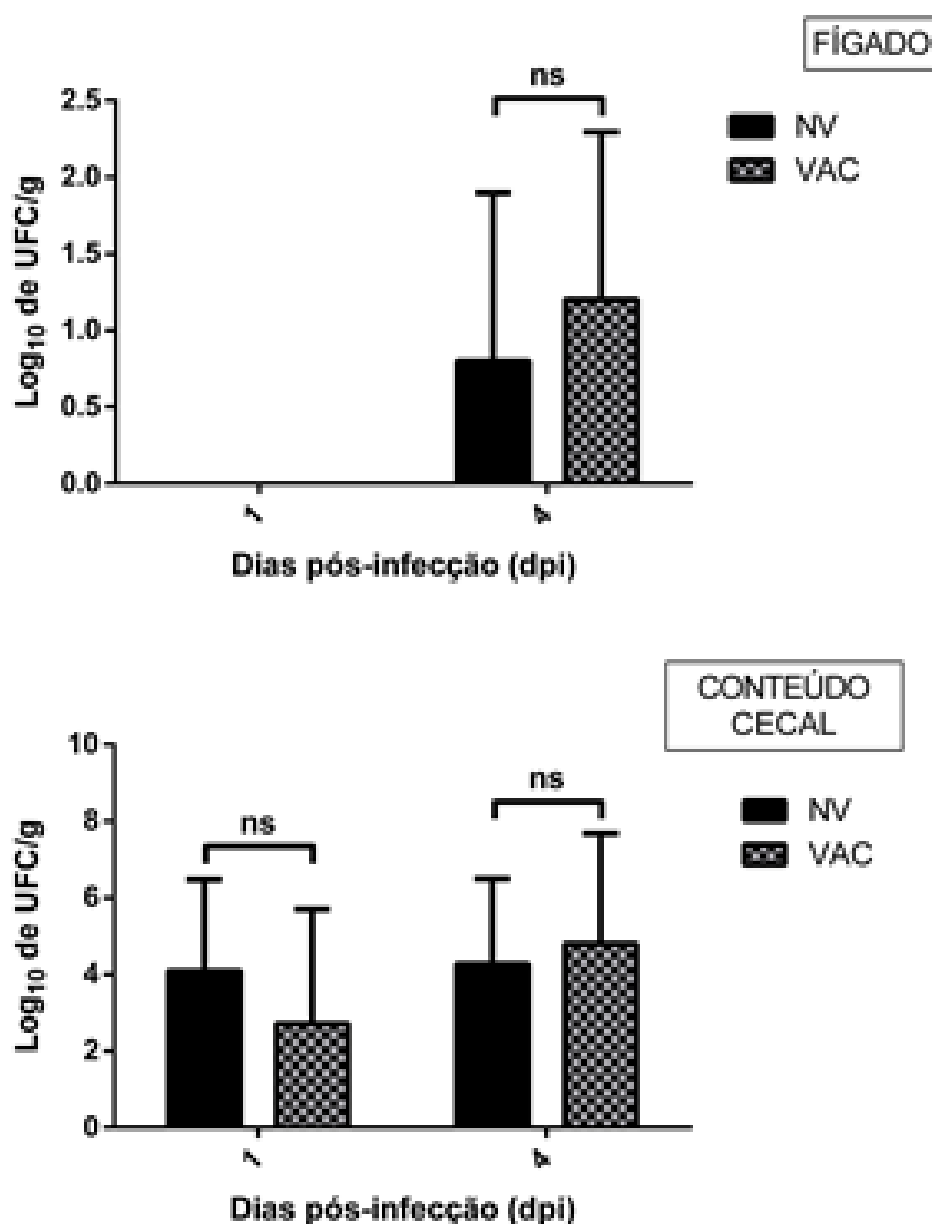


Figura 8. Contagem de *S. Enteritidis* em amostras de fígado e tonsila cecal após desafio na progênie dos grupos NV e VAC. Os números da cepa desafio são expressos em log₁₀ de UFC por grama da amostra, para amostras positivas após enriquecimento, foi utilizado o valor 2 para os cálculos. Os dados representam as médias $\pm$ DP. *, $p < 0,05$; ns, não significativo.

5.3. Morfologia intestinal

Os resultados histopatológicos das progênes desafiadas foram mostrados na Tab. 5, Tab. 6 e na Fig. 9. Aos 4 dpi o VCR do duodeno, jejuno e íleo foram significativamente maiores ($P < 0,05$) no grupo VAC; no entanto, não houve diferença significativa nos demais períodos. A VCR do íleo no grupo VAC foi significativamente maior ($P < 0,05$) a 4 dpi em comparação com os demais períodos. A 4 Dpi a VCR do jejuno foi menor no grupo NV ($P < 0,05$) em comparação com 1 Dai. Foi encontrado maior descamação epitelial no duodeno do grupo NV em comparação com o grupo VAC (Fig. 10).

A altura dos vilos foram significativamente maiores ($P < 0,05$) no grupo VAC comparado com o grupo NV nos segmentos de jejuno e íleo a 4 dpi. A 4 dpi a altura dos vilos foram significativamente maiores ($P < 0,05$) no jejuno comparado com os demais períodos. A profundidade das criptas também foram significativas maiores ($P < 0,05$) a 4 dpi no grupo NV comparado com o grupo VAC nos segmentos de duodeno e jejuno.

Tabela 5. Efeito do candidato vacinal (VAC) na morfologia intestinal mensurados pela relação altura de vilo dividido pela profundidade de cripta (VCR) de progênie desafiados com SE em vários períodos antes (dai) e após desafio (dpi).

Segmento intestinal	Tratamentos	1 Dai	1 Dpi	4 Dpi	P- Value
Duodeno	NV	6,92 ± 1,37	7,18 ± 2,30	5,52 ± 2,00 b	0,383
	VAC	6,28 ± 1,99	7,41 ± 2,88	9,10 ± 2,19 a	0,169
	P- Value	0,454	0,897	0,019	
Jejuno	NV	5,73 ± 0,55 A	4,95 ± 1,69 AB	3,78 ± 0,31 Bb	0,035
	VAC	6,35 ± 1,64	6,07 ± 0,50	7,80 ± 0,95 a	0,071
	P- Value	0,444	0,192	<0,001	
Íleo	NV	5,74 ± 2,67	4,18 ± 0,66	3,82 ± 0,33b	0,204
	VAC	4,40 ± 0,54 AB	4,06 ± 0,63 B	5,90 ± 1,50 Aa	0,029
	P- Value	0,316	0,817	0,016	

a,b na mesma coluna e A,B na mesma linha, médias com sobrescritos diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). Dados são expressos como média ± DP.

Tabela 6. Altura dos vilos e profundidade das criptas em segmentos de duodeno, jejuno e íleo de progênie desafiados com SE em vários períodos antes (dai) e após desafio (dpi).

Tratamentos		1 Dai	1 Dpi	4 Dpi	P- Value
Duodeno					
Altura dos vilos (µm)	NV	444,3 ± 171,5	626,6 ± 97,4	520,6 ± 171,2	0,256
	VAC	461,4 ± 133,9	491,9 ± 125	669,8 ± 177,9	0,092
	P- Value	0,864	0,122	0,213	
Profundidade das criptas (µm)	NV	67,3 ± 33,7	93,7 ± 32	97,5 ± 19,2 a	0,242
	VAC	78,5 ± 36,3	72,4 ± 24,1	73,5 ± 7,52 b	0,922
	P- Value	0,627	0,288	0,031	
Jejuno					
Altura dos vilos (µm)	NV	254,1 ± 108,5	248,3 ± 102	352,0 ± 26,0 b	0,150
	VAC	299,4 ± 43,3B	354,6 ± 52,4AB	393,5 ± 26,3Aa	0,013
	P- Value	0,410	0,072	0,036	
Profundidade das criptas (µm)	NV	44,9 ± 20,4B	49,4 ± 8,7B	93,6 ± 9,4Aa	<0,001
	VAC	50,8 ± 19,1	58,5 ± 7,8	51,5 ± 9,9 b	0,608
	P- Value	0,652	0,120	<0,001	
Íleo					
Altura dos vilos (µm)	NV	196,2 ± 77,6	242,6 ± 31,8	293,9 ± 52,6	0,069
	VAC	223,5 ± 27,9B	230,4 ± 39,1B	345,1± 14,6A	<0,001
	P- Value	0,454	0,897	0,019	
Profundidade das criptas (µm)	NV	45,1 ± 30,0	58,6 ± 5,6	76,1 ± 11,0	0,075
	VAC	50,8 ± 7,8	57,1 ± 8,6	61,4 ± 14,0	0,318
	P- Value	0,689	0,765	0,091	

a,b na mesma coluna e A,B na mesma linha, médias com sobrescritos diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05). Dados são expressos como média ± DP.

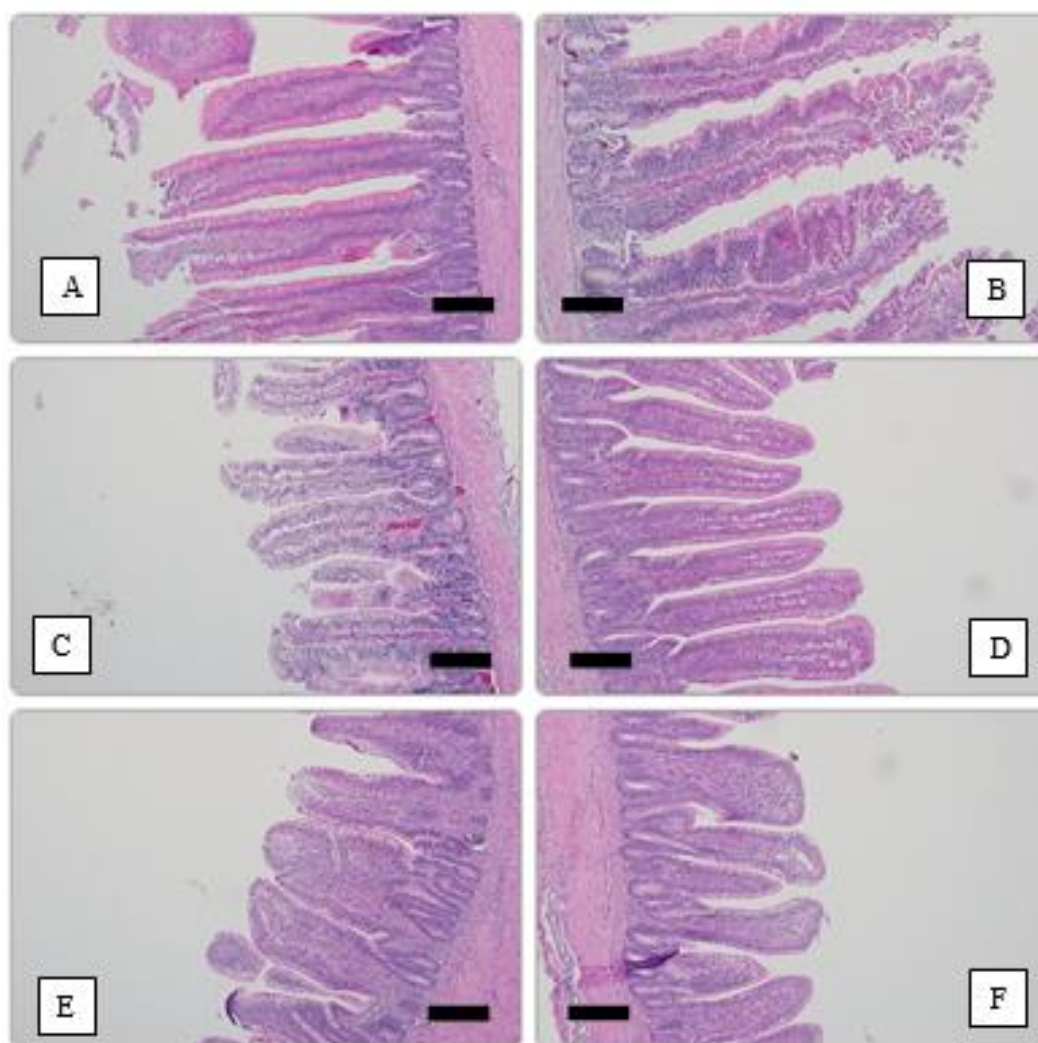


Fig. 9. Foto imagem dos segmentos do intestino das progênes

Onde; A, C, e E – Representa imagens dos segmentos de intestino do grupo NV com 4 dpi, respectivamente, duodeno, jejuno e íleo, apresentaram menor VCR e maior descamação epitelial no duodeno (A) comparado com o grupo VAC (B). B,D e F, segmentos do intestino do grupo VAC com 4 dpi, duodeno, jejuno e íleo, respectivamente, apresentaram maior VCR e menor descamação epitelial no duodeno (B) comparado com grupo NV (A). Coloração Hematoxilina-Eosina. Barra de escala = 100 μ m

6. DISCUSSÃO

Como os anticorpos são transferidos da reprodutora para o ovo e através destes para o embrião e consequente para os pintinhos, o nível de anticorpos transferidos para progênie depende dos antígenos e infecções que a reprodutora teve contato, e principalmente com o tipo de vacina e esquema vacinal utilizado (Kowalczyk et al., 2019). É reconhecido que vacinas inativadas são capazes de produzir anticorpos ao longo de toda a vida produtiva das reprodutoras diferentemente de aves vacinadas com vacinas vivas, sendo observadas proteção contra SE até 10 meses após o uso de bacterinas comerciais (Ishida et al., 2018; Armwood et al., 2019).

Conforme descrito nas tabelas 3 e 4, os níveis de IgY no soro de matrizes pesadas foram maiores no grupo VAC comparado com o grupo NV às 7 e 12 semanas após dose *booster*, o que demonstra que a candidato vacinal mesmo sem a incorporação de nenhum tipo de adjuvante oleoso apresentou uma excelente capacidade de produção de IgY ao longo da vida produtiva das reprodutoras, além de uma capacidade de transferência de anticorpos para a gema do ovo e progênie superior a bacterina comercial utilizada no experimento. Sendo os níveis de IgY na gema dos ovos embrionados maiores no grupo VAC comparado com os demais grupos em ambos os períodos pós vacinação.

A taxa de transferência de IgY do grupo VAC do soro de reprodutoras para as gemas dos ovos foram maiores que a taxas médias encontradas por Hamal et al. (2006), Agrawal et al. (2016) e Kowalczyk et al. (2019), com 46,90%, 51,86% e 59,50%, respectivamente. Kowalczyk et al. (2019) vacinaram matrizes de peru contra diversas enfermidades e mediram a taxa de transferência de anticorpos em vários períodos da vida do lote. Hamal et al. (2006) e Agrawal et al. (2016) vacinaram diversas linhagens de aves contra diversas doenças, entre elas SE, e avaliaram as suas taxas de transferência de anticorpos.

Já a taxa de transferência de IgY do ovo para a progênie do grupo VAC foi muito maior que a taxa de aproximadamente 30% encontrada em outros estudos utilizando vacinas contra *Infectious Bursal Disease* vírus (Loeken and Roth, 1983; Al-

Natour et al., 2004). Hamal et al. (2006), Agrawal et al. (2016) e Kowalczyk et al. (2019) também encontraram uma menor transferência de IgY do ovo para a progênie, com uma taxa de 61,71%, 59,86% e 57,3%, respectivamente.

A taxa de transferência de IgY do soro de matrizes para o soro das progênies no grupo VAC também foi bem superior ao valor encontrado por Hamal et al. (2006), Agrawal et al. (2016) e Kowalczyk et al. (2019), os quais encontraram uma taxa de aproximadamente 30%.

Conforme descrito nas tabela 5 e 6, foram encontrados maiores VCR nas progênies a 4 dpi em todos os segmentos de intestino no grupo VAC em comparação com o grupo NV. A morfologia intestinal é um dos principais indicadores da integridade e saúde intestinal das aves (Paiva et al., 2014). A altura das vilosidades intestinais, a profundidade das criptas e a VCR não afetam apenas a função da digestão e absorção intestinal, mas também estão relacionados à colonização por bactérias nocivas, sendo que um elevado VCR é geralmente associado com uma boa integridade e saúde intestinal (Paiva et al., 2014; Zhang et al., 2019). O desafio por bactérias do gênero *Salmonella* reduz a altura das vilosidades intestinais, aumenta a profundidade das criptas e reduz a VCR (Borsoi et al., 2011; Jazi et al., 2019; Mora et al., 2019; Zhang et al., 2019).

As vilosidades mais curtas e criptas mais profundas estão associadas à presença de toxinas das bactérias, sendo que a mucosa tenta restaurar as células epiteliais afetadas (Laudadio et al., 2011). Além disso, a presença de bactérias patogênicas ou de suas toxinas causam um aumento na taxa de "turnover" das células epiteliais e requer quantidades maiores de energia e proteína para manter a rápida produção de novas células, o que pode aumentar a taxa energética para manutenção intestinal, utilizando assim a energia e proteína que participariam do processo de deposição muscular (Marković et al., 2009; Deng et al., 2012).

Uma cripta mais profunda pode indicar um "turnover" mais rápido do tecido com o intuito de permitir a renovação da vilosidade, que sugere que o mecanismo de resposta intestinal está tentando compensar a descamação normal ou atrofia das vilosidades devido à inflamação causada pelos patógenos e suas toxinas (Tufarelli et al., 2010; Naghi Shokri et al., 2016).

Não foram encontrados trabalhos correlacionando a VCR com o uso de vacinas vivas ou inativadas para SE, no entanto, a mensuração da morfologia intestinal é amplamente utilizada na avaliação de outros produtos contra SE, tais como probióticos e combinações de óleo essenciais e ácidos orgânicos, os quais também encontraram maiores VCR nos segmentos intestinais dos grupos tratados em relação aos grupos controle desafiados com SE (Biloni et al., 2013; Shang et al., 2015; Zhang et al., 2019) .

O fígado é um dos principais órgãos internos para detecção de SE em aves, e o ceco é o principal local de multiplicação da bactéria (Inoue et al., 2008). Nos órgãos internos, a SE pode ser recuperada após 1 hora da inoculação experimental (He et al., 2010), sendo que os maiores níveis de contaminação são observados 3 dias após a infecção (Van Immerseel et al., 2002). Também foi relatado por Asheg et al. (2003), Santana (2011) e Upadhyaya et al. (2013) que a aderência, a penetração e a colonização do ceco por SE em aves é dose desafio dependente.

No presente estudo, mesmo havendo diferença significativa nos níveis de IgY no soro do grupo de pintos VAC em todos os períodos e no VCR de todos os segmentos do intestino a 4 dpi, não houve diferença na recuperação de SE no fígado e conteúdo cecal entre os grupos, sendo que a 1 dpi a SE foi somente recuperada nas amostras de conteúdo cecal.

Sendo a adesão e colonização por SE dose desafio dependente (Ashef et al., 2003), um fator que pode comprometer a proteção contra SE em órgãos internos e conteúdo cecal é a alta dose de SE utilizada para o desafio, pois a dose utilizada no estudo foi de 10^7 UFC por pinto, a qual é maior que a dose de 10^2 UFC/pinto utilizada por Methner e Steinbach, (1997), 10^5 UFC/pinto utilizada por Inoue et al. (2008) e Baxter (2015) e 10^3 e 10^5 UFC/pinto utilizada por Armwood et al. (2019).

Utilizando uma baixa dose desafio (10^2 UFC/ave), determinada proteção contra SE foi encontrada por Methner e Steinbach (1997) que vacinaram matrizes pesadas com uma bacterina comercial e além de observarem altos títulos de IgY no soro das progênes, também encontraram menor recuperação de SE em conteúdo cecal nos pintos do grupo vacinado entre os dias 6 e 20 após o desafio com SE. Resultados semelhantes foram encontrados por Inoue et al. (2008) que observaram diferença na prevalência e menor recuperação de SE em fígado, baço e conteúdo

cecal com 3 dpi em progênies de matrizes vacinadas com uma bacterina comercial e desafiadas com SE com 1 dia de idade, no entanto, também foram utilizadas cargas de desafio menores (10^5 UFC/ave) que o presente estudo.

Armwood et al. (2019) vacinaram matrizes pesadas com vacinas vivas, bacterina comercial e vacina inativada autógena e desafiaram sua progênie com *Salmonella* Heidelberg (SH), encontrando diferenças significativas na prevalência de aves positivas no conteúdo cecal provenientes de matrizes com títulos de IgY maiores, no entanto, houve maior recuperação de SH em fígado e conteúdo cecal em aves que receberam a dose desafio maior (10^5 UFC/pinto) comparado com o grupo desafiado com dose menor mesmo em aves com altos títulos de IgY. Assim, é possível que a imunidade materna exerça efeito adicional na progênie contra SE, em situações onde os desafios sejam menores (Atterbury et al., 2009).

No entanto, resultados de proteção fraca também foram encontrados em doses desafios menores que o presente estudo, Baxter (2015) avaliou diversos esquemas vacinais com vacinas vivas e inativadas em matrizes pesadas e desafiou suas progênies com SE na dose 10^5 UFC/pinto, não encontrando diferenças significativas na prevalência e recuperação de SE no conteúdo cecal das progênie de matrizes pesadas de 34 semanas de idade, a qual representa uma idade muito parecida com a utilizada no estudo (27 semanas).

A fraca proteção contra SE nas progênies, pode ser justificada, pois a resposta imune humoral confere somente uma proteção parcial contra a colonização por SE nos órgãos internos e ceco, pois a SE sendo uma bactéria intracelular facultativa pode sobreviver e replicar-se dentro das células, especialmente nos macrófagos, conforme relatado por Tran et al. (2010), que observaram que um grupo de aves com alto títulos de IgY específicos não foram capazes de eliminar SE intracelular, sendo necessário, para uma resposta imune completa, além da resposta humoral, a indução de uma resposta imune específica mediada por células (Barrow, 2007; Inoue et al., 2008; Chappell et al., 2009; Penha Filho et al., 2012; Huberman et al., 2019).

Visto que, a maioria das bacterinas comerciais disponíveis são desenvolvidas para fornecer proteção diretamente nas aves vacinadas e reduzir a transmissão vertical (Atterbury et al., 2009). A vacinação em massa em reprodutoras leves e

pesadas, epidemiologicamente, poderia reduzir significativamente os casos relacionados a produtos contaminados por *Salmonella* como ocorreu no Reino Unido e UE (Cogan e Humphrey, 2003; EFSA, 2007, 2011; Collard et al., 2008; Griffin e O'Brien, 2013).

Holt et al. (1996) e Atterbury et al. (2009) vacinaram matrizes leves em início de postura com bacterina comercial e observaram redução na recuperação de SE em conteúdo cecal e órgãos internos em baixa e alta dose desafio (10^2 e 10^8 UFC/pinto, respectivamente). Assim, a vacina inativada além de produzir elevados níveis de anticorpos na progênie, também, é capaz de proteger a ave reprodutora vacinada e reduzir o número de ovos contaminados, podendo reduzir o ciclo de transmissão vertical de SE e consequentemente a prevalência de progênies contaminadas, o que se faz muito importante para a epidemiologia da infecção visto que a exposição precoce ao SE interfere na capacidade de resposta humoral e outros estímulos antigênicos, sendo esses efeitos observados por pelo menos 23 semanas (Holt et al., 1999).

Diversos estudos tem relatado que a contaminação por SE por via oral pode facilmente colonizar o intestino, mas dificilmente o oviduto (Nakamura et al., 1994; Woodward et al., 2002a; Ishida et al., 2018), sendo que a contaminação pela via intravenosa pode causar bacteremia sistêmica com consequente colonização de ovários e ovidutos (Ishida et al., 2018). Ishida et al. (2018) observaram que um alto índice de IgA e IgY no sangue e mucosa de intestino e oviduto de aves SPF vacinadas com uma bacterina comercial protegeu contra bacteremia sistêmica causada por SE e consequente colonização do sistema reprodutivo.

Diante dos resultados obtidos e outros estudos sobre este tema, podemos notar um importante papel da imunidade materna, principalmente devido à grande possibilidade de exposição precoce a SE em lotes de aves, apesar da completa erradicação de SE nos lotes de aves ser uma tarefa complexa.

7. CONCLUSÃO

O alto nível de IgY no soro de reprodutoras, além de ser importante para a transmissão de anticorpos maternos para a progênie, é extremamente importante para o controle de SE, principalmente nos estágios iniciais da infecção, pois nesses períodos a bactéria se encontra no meio extracelular e é acessível a opsonização pelas imunoglobulinas específicas. Já os anticorpos maternos são importantes para as progênies recém eclodidas que ainda não possuem o seu sistema imunológico totalmente desenvolvido.

O candidato vacinal mesmo sem a inclusão de nenhum tipo de adjuvante oleoso demonstrou excelente capacidade de produção de imunoglobulinas, após duas doses, com uma taxa transferência de IgY para a gema do ovo e progênie superior a bacterina comercial utilizada, demonstrando potencial para atuar como uma importante ferramenta de baixo custo no controle de SE, seja na redução da contaminação na progênie, seja na própria reprodutora, reduzindo também a transmissão vertical da doença.

A despeito da excelente produção e transmissão de IgY, bem como maiores VCR em todos os segmentos intestinais de progênies provenientes do grupo vacinado, não houve diferença estatística na recuperação de SE entre as progênies desafiadas, no entanto, a dose desafio realizada foi bem maior que a utilizada em outros trabalhos.

Apesar de todos os resultados relevantes encontrados com o candidato vacinal no presente trabalho, ainda são necessários estudos mais aprofundados sobre a sua capacidade de estímulo a resposta imune mediada por células, sua resposta a diferentes doses desafio de SE e capacidade de proteção na própria reprodutora vacinada.

8. REFERÊNCIAS

ABPA (2019) **Associação brasileira de proteína animal - Relatório anual de 2019**. São Paulo, 167p.

Adriaensen C, Greve H De, Tian JQ, Craeye D, Gubbels E, Eeckhaut V, Immerseel F Van, Ducatelle R, Kumar M, Hernalsteens J (2007) A Live *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis Vaccine Allows Serological Differentiation between Vaccinated and Infected Animals. **Infection and Immunity** 75:2461–2468.

Agrawal R, Hirpurkar SD, Sannat C, Gupta AK (2016) Comparative study on immunoglobulin Y transfer from breeding hens to egg yolk and progeny chicks in different breeds of poultry. **Veterinary World** 9:425–431.

Al-Natour MQ, Ward LA, Saif YM, Stewart-Brown B, Keck LD (2004) Effect of Different Levels of Maternally Derived Antibodies on Protection Against Infectious Bursal Disease Virus. **Avian Diseases** 48:177–182.

Antillón M, Warren JL, Crawford FW, Weinberger DM (2017) The burden of typhoid fever in low- and middle-income countries: A meta-regression approach. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 11:1–21.

Antunes P, Reu C, Sousa JC, Peixe L, Pestana N (2003) Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology** 82:97–103.

Asheg AA, Levkut M, Revajová V, Ševčíková Z, Kolodzieyski L, Pistl J, Pilipčinec E (2003) Spreading of *Salmonella* enteritidis in the cecum of chickens. **Folia Microbiology** 48:277-279.

Aviagen (2018) **Rowan Range – Broiler performance Objectives**. Huntsville, Alabama, USA, 16p.

Armwood BT, Rieth A, Baldwin L, Roney CS, Barbieri NL, Logue CM (2019) Assessing the Ability of Maternal Antibodies to Protect Broiler Chicks Against Colonization by *Salmonella* Heidelberg. **Avian Diseases** 63:289.

Atterbury RJ, Carrique-Mas JJ, Davies RH, Allen VM (2009) *Salmonella* colonisation of laying hens following vaccination with killed and live attenuated commercial *Salmonella* vaccines. **Veterinary Records** 165:493–496.

Babu U, Scott M, Myers MJ, Okamura M, Gaines D, Yancy HF, Lillehoj H, Heckert RA, Raybourne RB (2003) Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 91:39–44.

Babu US, Harrison LM, Patel IR, Ramirez GA, Williams KM, Pereira M, Balan K V (2016) Differential antibacterial response of chicken granulosa cells to invasion by *Salmonella* serovars. **Poultry Science** 95:1370–1379.

Bailey J, Rolon A, Holt P, Hofacre CL, Wilson JL, Cosby DE, Richardson L, Cox N (2007) Humoral and mucosal-humoral immune response to a *Salmonella* vaccination program in broiler breeders. **International Journal Poultry Science** 6:172–181.

Barbour EK, Frerichs WM, Nabbut NH, Poss PE, Brinton MK (1993) Evaluation of bacterins containing three predominant phage types of *Salmonella* enteritidis for prevention of infection in egg-laying chickens. **American Journal of Veterinary Research** 54:1306–1309.

Baron F, Nau F, Guérin-dubiard C, Bonnassie S, Andrews SC, Jan S (2016) Egg white versus *Salmonella* Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. **Food Microbiology** 53:82–83.

Barrow PA (1994) Serological diagnosis of *Salmonella* serotype enteritidis infections in poultry by ELISA and other tests. **International Journal of Food Microbiology** 21:55–68.

Barrow PA (2007) *Salmonella* infections: Immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathology** 36:1–13.

Baxter VA (2015) **Assessment of killed *Salmonella* vaccine efficacy in broiler breeders and their progeny**. 60 f. Dissertação (Master of Science) - The University of Georgia- Athens – Georgia.

Beirão BCB, Ingberman M, Fávaro C, Mesa D, Bittencourt LC, Fascina VB, Caron LF (2018) Effect of an *Enterococcus faecium* probiotic on specific IgA following live *Salmonella* Enteritidis vaccination of layer chickens. **Avian Pathology** 47:325–333.

Berchieri Junior A (2000) Doenças das aves. In.: Berchieri Junior A, Macari M (Eds.) **Doença das Aves** Campinas: FACTA, p 2.488.

Berghaus RD, Thayer SG, Maurer JJ, Hofacre CL (2011) Effect of vaccinating breeder chickens with a killed *Salmonella* vaccine on *Salmonella* prevalences and loads in breeder and broiler chicken flocks. **Journal of Food Protection** 74:727–734.

Berghaus RD, Mathis DL, Bramwell RK, Macklin KS, Wilson JL, Wineland MJ, Maurer JJ, Lee MD (2012) Multilevel analysis of environmental *Salmonella* prevalences and management practices on 49 broiler breeder farms in four south-eastern states, USA. **Zoonoses Public Health**. 59:365–374.

Berghaus RD, Thayer SG, Law BF, Mild RM, Hofacre CL, Singer RS (2013) Enumeration of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from commercial broiler chicken flocks. **Applied Environment Microbiology** 79:4106–4114.

Bhattacharyya A, Majumdar S, Bhanja SK, Mandal AB, Dash BB (2018) Effect of dietary manipulation and vaccination of turkey breeder hens on immunoglobulin levels of yolk, yolk sac and neonate poults. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)** 102:957–963.

Biloni A, Quintana CF, Menconi A, et al (2013) Evaluation of effects of EarlyBird associated with FloraMax-B11 on *Salmonella* Enteritidis, intestinal morphology, and performance of broiler chickens. **Poultry Science** 92:2337–2346.

Borsoi A, Santos LR, Rodrigues LB, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP (2011) Behavior of *Salmonella* heidelberg and salmonella enteritidis strains following broiler chick inoculation: evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. **Brazilian Journal of Microbiology** 42:266-273.

BRASIL (2003) Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Instrução Normativa no 78, de 03 de novembro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, p.06.

BRASIL (2017) Instrução Normativa no 41, de 04 de dezembro de 2017. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, p.05.

Braukmann M, Methner U, Berndt A (2015) Immune Reaction and Survivability of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Infantis after Infection of Primary Avian Macrophages. **PLoS One** 10:1–19.

Braukmann M, Barrow PA, Berndt A, Methner U (2016) Combination of competitive exclusion and immunisation with a live *Salmonella* vaccine in newly

hatched chickens: Immunological and microbiological effects. **Research in Veterinary Science** 107:34–41.

Byrd JA, Deloach JR, Corrier DE, Nisbet DJ, Stanker LH (1999) Evaluation of *Salmonella* Serotype Distributions from Commercial Broiler Hatcheries and Grower Houses. **Avian Disease** 43:39–47.

Cason JA, Cox NA, Bailey JS (1994) Transmission of *Salmonella* typhimurium during Hatching of Broiler Chicks. **Avian Disease** 38:583–588.

CDC (National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases) (2018) **National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2016**. Atlanta, GA: U.S.

CDC (2019) **Antibiotic resistance threats in the United States**. Atlanta, GA: U.S.

Cerquetti MC, Gherardi MM (2000) Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella* Enteritidis. **Vaccine** 18:1140–1145.

Chakravorty D, Hensel M (2003) Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. **Microbes and Infection** 5:621–627.

Chamizo C, Rubio JM, Moreno J, Alvar J (2001) Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 83:191–202.

Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P (2009) The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 128:53–59.

Chaudhari AA, Jawale C V, Kim SW, Lee JH (2012) Construction of a *Salmonella* Gallinarum ghost as a novel inactivated vaccine candidate and its protective efficacy against fowl typhoid in chickens. **Veterinary Research** 43:1–11.

Chen T, Jiang J, Ye C, Xie J, Chen X, Xu D, Zeng Z, Peng Y, Hu DL, Fang R (2019) Genotypic characterization and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolated from chicken, pork and the environment at abattoirs and supermarkets in Chongqing, China. **BMC Veterinary Research** 15:1–8.

Chousalkar KK, Flynn P, Sutherland M, Roberts JR, Cheetham BF (2010) International Journal of Food Microbiology Recovery of *Salmonella* and *Escherichia*

coli from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. **International Journal of Food Microbiology** 142:207–213.

Clifton-Hadley FA, Breslin M, Venables LM, Sprigings KA, Cooles SW, Houghton S, Woodward MJ (2002) A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella* enterica serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. **Veterinary Microbiology** 89:167–179.

Cogan TA, Humphrey TJ (2003) The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement** 94:114–119.

Collard JM, Bertrand S, Dierick K, Godard C, Wildemaue C, Vermeerch K, Duculot J, Van Immerseel, Pasman F, Imberecht H, Quinet C. (2008) Drastic decrease of *Salmonella* Enteritidis isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence on foodborne outbreaks. **Epidemiology & Infection** 136:771–781.

Cox NA, Bailey JS, Blankenship LC, Metnersmann RJ, Stern NI, Mchan F (1990) Fifty Percent Colonization Dose for *Salmonella* typhimurium Administered Orally and Intracloacally to Young Broiler Chicks. **Poultry Science** 68:1809–1812.

Crippen TL, Sheffield CL, He H, Lowry VK, Kogut MH (2003) Differential nitric oxide production by chicken immune cells. **Developmental and Comparative Immunology** 27:603–610.

Darrell T, Thomas H, Richard G (2014) Integrated farm management to prevent *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs. **Journal Applied Poultry Research** 23:353–365.

Davies, RH, Wray C (1996). Persistence of *Salmonella* enteritidis in poultry units and poultry food. **Brazil Poultry Science** 37:589–596.

Davies RH, Breslin M (2003) Persistence of *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. **Environment Microbiology** 5:79–84.

Deguchi K, Yokoyama E, Honda T, Mizuno K (2009) Efficacy of a Novel Trivalent Inactivated Vaccine against the Shedding of *Salmonella* in a Chicken Challenge Model. **Avian Diseases** 53:281–286.

Deng W, Dong XF, Tong JM, Zhang Q (2012) The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut

morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. **Poultry Science** 91:575–582.

Dórea FC, Cole DJ, Hofacre C, Zamperini K, Mathis D, Doyle MP, Lee MD, Maurer JJ (2010) Effect of *Salmonella* vaccination of breeder chickens on contamination of broiler chicken carcasses in integrated poultry operations. **Applied Environment Microbiology** 76:7820–7825.

Eeckhaut V, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F (2018) Oral vaccination with a live *Salmonella* Enteritidis/Typhimurium bivalent vaccine in layers induces cross-protection against caecal and internal organ colonization by a *Salmonella* Infantis strain. **Veterinary Microbiology** 218:7–12.

EFSA (2006) Preliminary report on Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in laying hen flocks of *Gallus gallus*. **EFSA Journal** 81:1–71.

EFSA (2007) Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. **EFSA Journal** 97:1–84.

EFSA (2010) Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. **EFSA Journal** 8:1–86.

EFSA (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, and food-borne outbreaks in 2009. **EFSA Journal**. 2090:1– 378.

EFSA (2014) Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. **EFSA Journal** 12:1–147.

EFSA (2018) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal** 16:1–262.

Farrell AO, Liu Y, Moore KW, Mui AL (1998) IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. **EMBO Journal** 17:1006–1018.

Feye KM, Anderson KL, Scott MF, McIntyre DR, Carlson SA (2016) Inhibition of the virulence, antibiotic resistance, and fecal shedding of multiple antibiotic-

resistant *Salmonella* Typhimurium in broilers fed Original XPCTM. **Poultry Science** 95:2902–2910.

Freitas Neto OC, Mesquita AL, Paiva JB, Zotesso F, Bechieri Junior A (2008) Control of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in laying hens by inactivated *Salmonella* Enteritidis vaccines. **The Brazilian Journal of Microbiology** 39:390–396.

Fuche FJ, Sow O, Simon R, Tennant SM (2016) *Salmonella* Serogroup C: Current Status of Vaccines and Why They Are Needed. **Clinical and Vaccine Immunology** 23:737–745.

Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Immerseel F Van (2009) Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology Reviews** 33:718–738.

Gast RK, Stone HD, Holt PS, Beard CW (1992) Evaluation of the Efficacy of an Oil-Emulsion Bacterin for Protecting Chickens against *Salmonella* Enteritidis. **Avian Diseases** 36:992

Gast RK, Guard-Bouldin J, Holt PS (2005) The Relationship Between the Duration of Fecal Shedding and the Production of Contaminated Eggs by Laying Hens Infected with Strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. **Avian Disease** 49:382–386.

Gast RK, Guraya R, Guard-bouldin J, Holt PS, Moore RW (2007) Colonization of Specific Regions of the Reproductive Tract and Deposition at Different Locations Inside Eggs Laid by Hens Infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. **Avian Disease** 51:40–44.

Gast RK, Guraya R, Guard J, et al (2011) The Relationship Between the Numbers of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg, or *Salmonella* Hadar Colonizing Reproductive Tissues of Experimentally Infected Laying Hens and Deposition Inside Eggs. **Avian Disease** 55:243–247.

Gast RK (2016) Microbiology of shell egg production in the United States. In Ricke C, GAST RK (Eds.) **Producing Sage Eggs - Microbial Ecology of Salmonella**. London: Academic Press, p 25–44.

Gast RK, Regmi P, Guraya R, Jones DR, Anderson KE, Karcher DM (2019) Contamination of eggs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying

hens of four commercial genetic lines in conventional cages and enriched colony housing. **Poultry Science** 98:5023–5027.

Gast RK e Porter Junior RE (2020). *Salmonella* Infections In.: Swayne DE (Eds.) **Diseases of Poultry**. Iowa: Wiley, p 719-753.

Gole VC, Roberts JR, Sexton M, May D, Chousalkar K (2014) Effect of Egg Washing and Correlation between Cuticle and Egg Penetration by Various *Salmonella* strains. **International Journal of Food Microbiology** 16:18–25.

Gole VC, Woodhouse R, Caraguel C, Moyle T, Rault JL, Sexton M, Chousalkar K (2017) Dynamics of *Salmonella* shedding and welfare of hens in free range egg production systems. **Applied Environment Microbiology** 83:1–17.

Gomes AVS, Quinteiro-Filho WM, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Baskeville E, Akamine AT, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJP, Palermo-Neto J (2014) Overcrowding stress decreases macrophage activity and increases *Salmonella* Enteritidis invasion in broiler chickens. **Avian Pathology** 43:82–90.

Griffin PM, O'Brien SJ (2013) The “decline and Fall” of nontyphoidal *Salmonella* in the United Kingdom. **Clinical Infectious Diseases** 56:705–710.

Grimont PAD, Weill FX (2007) **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**, 9th ed. Institut Pasteur, Paris, p.167.

Gupta RK, Sibaer GR. (1995) Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. **Vaccine** 13:1263-1276.

Hamal KR, Burgess SC, Pevzner IY, Erf GF (2006) Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. **Poultry Science** 85:1364–1372.

He GZ, Tian WY, Qian N, Cheng AC, Deng SX (2010) Quantitative studies of the distribution pattern for *Salmonella* Enteritidis in the internal organs of chicken after oral challenge by a real-time PCR. **Veterinary Research Communications** 34:669–676.

He Q, Mitchell AR, Johnson SL, Wagner-Bartak C, Morcol T, Bell SJD (2000) Calcium Phosphate Nanoparticle Adjuvant. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 7:899-903.

Hedegaard CJ, Heegaard PMH (2016) Passive immunisation, an old idea revisited: Basic principles and application to modern animal production systems. **Vet Veterinary Immunology and Immunopathology** 174:50–63.

Hesse M, Stamm A, Weber R, Glunder G, Berndt A (2016) Immune response of turkey poults exposed at 1 day of age to either attenuated or wild *Salmonella* strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 174:1–10.

Hesse M, Stamm A, Weber R, Glunder G (2018) Efficacy of a *Salmonella* live vaccine for turkeys in different age groups and antibody response of vaccinated and non-vaccinated turkeys. **BMC Research Notes**: 11:431.

Hirsh D, Zee Y (2003) **Microbiologia Veterinária**, 1st ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro p.446.

Holt PS, Stone HD, Gast RK, Porter RE (1996) Growth of *Salmonella* Enteritidis (SE) in egg contents from hens vaccinated with an SE bacterin. **Food Microbiology** 13:417–426

Holt PS, Gast RK, Porter RE, Stone HD (1999) Hyporesponsiveness of the Systemic and Mucosal Humoral Immune Systems in Chickens Infected with *Salmonella* enterica serovar enteritidis at One Day of Age. **Poultry Science** 78:1510–1517.

Holt PS, Gast RK (2004) Effects of Prior Coinfection with Different *Salmonella* Serovars on the Progression of a *Salmonella* enterica serovar enteritidis Undergoing Induced Molt. **Avian Diseases** 48:160–166.

Hubbard (2019) **Leaflet - Hubbard Premium Range - Intermediate and Conventional Growth Products**. Le Foeil – Quintin – França, 2p.

Huberman YD, Velilla A V., Terzolo HR (2019) Evaluation of different live *Salmonella* Enteritidis vaccine schedules administered during layer hen rearing to reduce excretion, organ colonization, and egg contamination. **Poultry Science** 98:2422–2431.

Ibrahim H, Sayed R, Shereen A (2018) Efficacy of a locally prepared inactivated trivalent vaccine against salmonellosis in poultry. **International Journal of Veterinary Science** 7:82–87.

Inoue AY, Berchieri A, Bernardino A, Paiva JB, Sterzo E V. (2008) Passive Immunity of Progeny from Broiler Breeders Vaccinated with Oil-Emulsion Bacterin Against *Salmonella* Enteritidis. **Avian Diseases** 52:567–571.

Ishida Y, Sakai E, Sato K, Sugiyama E, Mima K, Taneno A, Shimomura H, Cui L, Hirai Y (2018) Induction of Mucosal Humoral Immunity by Subcutaneous Injection of an Oil-emulsion Vaccine against *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Enteritidis in Chickens. **Food Safety** 6:151–155.

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, De Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology** 165:526–530.

Jalava K, Hensel A, Szostak M, Resch S, Lubitz W (2002) Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications. **Journal Control Release** 85:17–25.

Jawale C V., Lee JH (2014) An immunogenic *Salmonella* ghost confers protection against internal organ colonization and egg contamination. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 162:41–50.

Jawale C V., Lee JH (2014) Characterization of adaptive immune responses induced by a new genetically inactivated *Salmonella* Enteritidis vaccine. **Comparative Immunology, Microbiology and Infection Diseases** 37:159–167.

Jawale C V., Lee JH (2014) Comparative evaluation of *Salmonella* Enteritidis ghost vaccines with a commercial vaccine for protection against internal egg contamination with *Salmonella*. **Vaccine** 32:5925–5930.

Jawale C V., Lee JH (2014) *Salmonella* enterica serovar Enteritidis ghosts carrying the Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit are capable of inducing enhanced protective immune responses. **Clinical Vaccine Immunology** 21:799–807.

Jazi V, Foroozandeh AD, Dastar B, Rezaie Koochaksaraie R, Toghyani M (2018) Effects of *Pediococcus acidilactici*, mannan-oligosaccharide, butyric acid and their combination on growth performance and intestinal health in young broiler chickens challenged with *Salmonella* Typhimurium. **Poultry Science** 97:2034–2043.

Jazi V, Mohebodini H, Ashayerizadeh A, Shabani A, Barekatain R (2019) Fermented soybean meal ameliorates *Salmonella* Typhimurium infection in young broiler chickens. **Poultry Science** 0:1–13.

Jones-Ibarra AM, Alvarado CZ, Caldwell DH, Byrd JA, Taylor TM (2019) *Salmonella* recovery from chicken bone marrow and cecal counts differ by pathogen challenge method. **Poultry Science** 98:4104–4112.

Jouanguy E, Ddffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova J-L (1999) IL-12 and IFN- γ host defense against mycobacteria and *Salmonella* in mice and men. **Current Opinion in Immunology** 11:346–351.

Juricova H, Videnska P, Lukac M, Faldynova M, Babak V, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2013) Influence of *Salmonella* enterica Seroovar Enteritidis Infection on the Development of the Cecum Microbiota in Newly Hatched Chicks. **Applied Environment Microbiology** 79:745–747.

Kawalilak LT, Franco AMU, Fasenko GM (2010) Impaired intestinal villi growth in broiler chicks with unhealed navels. **Poultry Science** 89:82–87.

Kingsbury JM, Thom K, Soboleva T (2019) Effect of Storage Temperature on the Survival of New Zealand Egg-Associated *Salmonella* Isolates in and on Eggs. **Journal of Food Protection** 82:2161–2168.

Kowalczyk J, Śmiałek M, Tykałowski B, Dziewulska D, Stenzel T, Koncicki A (2019) Field evaluation of maternal antibody transfer from breeder turkey hens to egg yolks, egg whites, and poults. **Poultry Science** 0:1–10.

Kridtayopas C, Rakangtong C, Bunchasak C, Loongyai W (2019) Effect of prebiotic and synbiotic supplementation in diet on growth performance, small intestinal morphology, stress, and bacterial population under high stocking density condition of broiler chickens. **Poultry Science** 98:4595–4605.

Kwon H, Cho S (2011) Pathogenicity of SG 9R, a rough vaccine strain against fowl typhoid. **Vaccine** 29:1311–1318.

Laudadio V, Passantino L, Perillo A, Lopresti G, Passantino A, Khan RU, Tufarelli V (2011) Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. **Poultry Science** 91:265–270.

Lawrence EC, Grayson J, Irma R, Dooley NJ, Muchmore A V, Cellular RMB (1981) Ontogeny of humoral immune function in normal chickens: a comparison of immunoglobulin-secreting cells in bone marrow, spleen, lungs and intestine. **Clinical Immunology** 43:450–457.

Li Q, Zhu Y, Ren J, Qiao Z, Yin C, Xian H, Yuan Y, Geng S, Jiao X (2019) Evaluation of the Safety and Protection Efficacy of spiC and nmpC or rfaL Deletion Mutants of *Salmonella* Enteritidis as Live Vaccine Candidates for Poultry Non-Typhoidal Salmonellosis. **Vaccines** 7: 202.

Liljebjelke KA, Hofacre CL, Liu T, White DG, Ayers S, Young S, Maurer JJ (2005) Vertical and horizontal transmission of *salmonella* within integrated broiler production system. **Foodborne Pathogens and Disease** 2:90–102.

Lin D, Yan M, Lin S, Chen S (2014) Increasing prevalence of hydrogen sulfide negative *Salmonella* in retail meats. **Food Microbiology** 43:1–4.

Liu W, Yang Y, Chung N, Kwang J (2014) Induction of Humoral Immune Response and Protective Immunity in Chickens against *Salmonella* Enteritidis after a Single Dose of Killed Bacterium-Loaded Microspheres Induction of Humoral Immune Response and Protective Immunity in Chickens Against *Salmonella*. **Avian Diseases** 45:797–806.

Loeken MR, Roth TF (1983) Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. **Immunology** 49:21–28.

Lublin A, Maler I, Mechani S, Pinto R, Sela-Saldinger S (2015) Survival of *Salmonella* enterica Serovar Infantis on and within Stored Table Eggs. **Journal of Food Protection** 78:287–292.

Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, Brien SJO, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM (2010) The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases** 50:882–889.

Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: Big virulence in small packages. **Microbes and Infection** 2:145–156.

Marković R, Šefer D, Krstić M, Petrujkić B (2009) Effect of different growth promoters on broiler performance and gut morphology. **Archivos de Medicina Veterinaria** 41:163–169.

Mastroeni P, Simmons C, Fowler R, Hormaeche CE (2000) Igh-6 $\times / \times$ (B-Cell-Deficient) Mice Fail To Mount Solid Acquired Resistance to Oral Challenge with Virulent *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium and Show Impaired Th1 T-Cell Responses to *Salmonella* Antigens. **Infection and Immunity** 68:46–53.

Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G (2001) *Salmonella*: immune responses and vaccines. **Veterinary Journal** 161:132–164.

Mcsorley SJ, Cookson BT, Jenkins MK (2000) Characterization of CD4 + T Cell Responses During Natural Infection with *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Immunology** 164:986–993.

Meeusen ENT, Walker J, Peters A, Meeusen ENT, Walker J, Peters A, Pastoret P, Jungersen G (2007) Current Status of Veterinary Vaccines Current Status of Veterinary Vaccines. **Clinical Microbiology Reviews** 20:489–510.

Mescher MF, Curtsinger JM, Casey KA, Hammerbeck CD, Popescu F, Xiao Z (2006) Signals required for programming effector and memory development by CD8 + T cells. **Immunological Reviews** 211:81–92.

Methner U, Steinbach G (1997) Efficacy of maternal *Salmonella* antibodies against oral infection of chicks with *Salmonella* Enteritidis. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift** 110:373–377

Mittrucker H, Kaufmann SHE (2000) Immune response to infection with *Salmonella* Typhimurium in mice. **Journal of Leukocyte Biology** 67:457–463.

Mittrucker H-W, Kohler A, Kaufmann SHE (2002) Characterization of the Murine T-Lymphocyte Response to *Salmonella* enterica Seroovar Typhimurium Infection. **Infection and Immunity** 70:199–203.

Miyamoto T, Kitaoka D, Withanage GSK, Fukata T, Sasai K, Baba E (1999) Evaluation of the Efficacy of *Salmonella* Enteritidis Oil-Emulsion Bacterin in an Intravaginal Challenge Model in Hens. **Avian Diseases** 43:497–505.

Mogasale V, Maskery B, Ochiai RL, Lee JS, Mogasale V V, Ramani E, Kim YE, Park JK (2014) Burden of typhoid fever in low-income and middle-income countries: a systematic, literature-based update with risk-factor adjustment. **The Lancet Global Healthy** 2:570–580.

Montassier H (2000) Bronquite infecciosa das galinhas. In.: Berchieri Junior A Macari M (Eds.) **Doença das Aves**. Campinas: FACTA, p 2.488.

Mora Z V, Nuño K, Vazquez-Paulino O, Avalos H, Castro-rosas J, Gomez-Aldapa C, Angulo C, Ascencio F, Villarruel-Lopez A (2019) Synbiotic Mix on Intestinal Structural Changes, and *Salmonella* Typhimurium and *Clostridium* Perfringens Colonization in Broiler Chickens. **Animals** 9:777–797.

Morrison SL, Mohammed MS, Wims LA, Trinh R, Etches R (2002) Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 38:619–625.

Morton VK, Kearney A, Coleman S, Viswanathan M, Chau K, Orr A, Hexemer A (2019) Outbreaks of *Salmonella* illness associated with frozen raw breaded chicken products in Canada, 2015–2019. **Epidemiology and Infection** 147:1–3.

Muniz EC, Verdi R, Leão JA, Back A, Nascimento VP do (2017) Evaluation of the effectiveness and safety of a genetically modified live vaccine in broilers challenged with *Salmonella* Heidelberg. **Avian Pathology** 46:676–682.

Naghi Shokri A, Ghasemi HA, Taherpour K (2016) Evaluation of Aloe vera and synbiotic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, gut morphology, immune responses and blood constituents of broiler chickens. **Animal Science Journal** 88:306–313.

Nakamura M, Nagamine N, Takahashi T, Suzuki S, Sato S (1994) Evaluation of the Efficacy of a Bacterin against *Salmonella* Enteritidis Infection and the Effect of Stress after Vaccination. **Avian Diseases** 38:717–24.

Okamura M, Tachizaki H, Kubo T, Kikuchi S, Suzuki A, Takehara K, Nakamura M (2007) Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella* enterica serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. **Vaccine** 25:4837–4844.

Özdoğan M, Wellmann K, Paksuz E (2011) Effect of gossypol on blood serum parameters and small intestinal morphology of male broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** (Berl) 96:95–101.

Paiva D, Walk C, Audrey M (2014) Dietary calcium, phosphorus, and phytase effects on bird performance, intestinal morphology, mineral digestibility, and bone ash during a natural necrotic enteritis episode. **Poultry Science** 93:2752–2762.

Park S, Jeong J, Choy HE, Rhee JH, Na H, Lee T, Her M, Cho K, Hong Y (2010) Immune Response Induced by ppGpp-Defective *Salmonella* enterica serovar Gallinarum in Chickens. **Journal of Microbiology** 48:674–681.

Patterson JA, Burkholder KM (2003) Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. **Poultry Science** 82:627–631.

Penha Filho RAC, Paiva JB, Silva MD, Almeida AM, Berchieri Junior A (2010) Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. **Vaccine** 28:2853–2859.

Penha Filho RAC, Moura BS, de Almeida AM, Montassier HJ, Barrow PA, Berchieri Junior A (2012) Humoral and cellular immune response generated by different vaccine programs before and after *Salmonella* Enteritidis challenge in chickens. **Vaccine** 30:7637–7643.

Penha Filho RAC (2013) **RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM AVES (*Gallus gallus*) VACINADAS, ANTES E APÓS O DESAFIO COM *Salmonella* Enteritidis**. 84 p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Penha Filho RAC, Díaz SJA, Fernando FS, Chang YF, Andreatti Filho RL, Berchieri Junior A (2015) Immunomodulatory activity and control of *Salmonella* Enteritidis colonization in the intestinal tract of chickens by Lactobacillus based probiotic. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 167:64–69.

Poppe C (2000) *Salmonella* Infections in the Domestic Fow. In: Wray C, Wray A (eds) ***Salmonella* Domest. Anim.**, 1a ed. CABI Publishing, New York, pp 107–132

Quinteiro-Filho WM, Gomes AVS, Pinheiro ML, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJP, Palermo-Neto J (2012) Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. **Avian Pathology** 41:421–427.

Rana N, Kulshreshtha RC (2006) Cell-mediated and humoral immune responses to a virulent plasmid-cured mutant strain of *Salmonella* enterica serotype gallinarum in broiler chickens. **Veterinary Microbiology** 115:156–162.

Riquelme A, Susan M (2012) IgG keeps virulent *Salmonella* from evading dendritic cell uptake. **Immunology** 136:291–305.

Rose ME, Orlans E, Buttress N (1974) Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in the hen's egg: their segregation in yolk and white. **European Journal of Immunology** 4:521–523.

Rothwell L, Young JR, Zoorob R, Whittaker CA, Hesketh P, Archer A, Smith AL, Kaiser P (2004) Cloning and Characterization of Chicken IL-10 and Its Role in

the Immune Response to *Eimeria maxima*. **The Journal of Immunology** 173:2675–82.

Sallam KI, Mohammed MA, Hassan MA, Tamura T (2014) Prevalence, molecular identification and antimicrobial resistance profile of *salmonella* serovars isolated from retail beef products in mansoura, egypt. **Food Control** 38:209–214.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor p 1.626.

Santana ES (2011) **INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE *Salmonella* Enteritidis EM PERUS ECONTROLE DA INFECÇÃO COM O USO DA LACTULOSE NA DIETA** 135 p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Santin E, Maiorka A, Macari M (2001) Performance and intestinal mucosa development of broilers chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Applied Poultry Research** 10:236–244.

Shang Y, Regassa A, Kim JH, Kim WK (2015) The effect of dietary fructooligosaccharide supplementation on growth performance, intestinal morphology, and immune responses in broiler chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis lipopolysaccharides. **Poultry Science** 94:2887-2897.

Sekelova Z, Polansky O, Stepanova H, Fedr R, Faldynova M, Rychlik I, Vlasatikova L (2017) Different roles of CD4, CD8 and $\gamma\delta$ T-lymphocytes in naive and vaccinated chickens during *Salmonella* Enteritidis infection. **Proteomics** 17:1–28.

Sheela RR, Babu U, Mu J, Elankumaran S, Bautista DA, Raybourne RB, Heckert RA, Song W (2003) Immune Responses against *Salmonella* enterica Seroovar Enteritidis Infection in Virally Immunosuppressed Chickens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 10:670–679.

Singh BR (2009) *Salmonella* Vaccines for Animals and Birds and Their Future Perspective. **Open Vaccine Journal** 2:100–112.

Springer S, Lindner T, Ahrens M, Woitow G, Prandini F, Selbitz HJ (2011) Duration of immunity induced in chickens by an attenuated live *Salmonella* Enteritidis vaccine and an inactivated *Salmonella* Enteritidis/Typhimurium vaccine. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift** 124:89–93.

Su LH, Chiu CH (2007) *Salmonella*: Clinical Importance and Evolution of

Nomenclature. **Chang Gung Medical Journal**, 30:210-219.

Thomas ME, Klinkenberg D, Ejeta G, Knapen F Van, Bergwerff AA, Stegeman JA, Bouma A (2009) Quantification of Horizontal Transmission of *Salmonella* enterica Seroovar Enteritidis Bacteria in Pair-Housed Groups of Laying Hens. **Applied Environment Microbiology** 75:6361–6366.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2002) **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, p.827.

Tran TQL, Quessy S, Letellier A, Desrosiers A, Boulianne M (2010) Immune response following vaccination against *Salmonella* Enteritidis using 2 commercial bacterins in laying hens. **Canadian Journal of Veterinary Research** 74:185–192.

Tufarelli V, Desantis S, Zizza S (2010) Archives of Animal Nutrition Performance, gut morphology and carcass characteristics of fattening rabbits as affected by particle size of pelleted diets. **Archivos of Animal Nutrition** 64:373–382.

Ulmer-Franco AM (2012) Transfer of chicken immunoglobulin Y (IgY) from the hen to the chick. **Avian Biology Research** 5:81–87.

Ulmer-Franco AM, Cherian G, Quezada N, Fasenko GM, McMullen LM (2012) Hatching egg and newly hatched chick yolk sac total IgY content at 3 broiler breeder flock ages. **Poultry Science** 91:758–764.

Upadhyaya I, Upadhyay A, Kollanoor-Johny A, Darre MJ, Venkitanarayanan K (2013) Effect of Plant Derived Antimicrobials on *Salmonella* Enteritidis Adhesion to and Invasion of Primary Chicken Oviduct Epithelial Cells in vitro and Virulence Gene Expression. **International Journal of Molecular Sciences** 14:10608-10625.

USDA (2019) **Livestock and poultry: world markets and trade**. United States Dep Agric Foreign Agric Serv 38.

Van de Giessen, AW, Ament AJHA, Notermans SHW. (1994). Intervention strategies for *Salmonella* enteritidis in poultry flocks: A basic approach. **International Journal of Food Microbiology**. 21:145–154.

Van Immerseel F, De Buck J, De Smet I, Mast J, Haesebrouck F, Ducatelle R (2002) The effect of vaccination with a *Salmonella* Enteritidis aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. **Vaccine** 20:3034–3041.

Van Immerseel F, Methner U, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, Barrow PA (2005) Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: Exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiology and Infection** 133:959–978.

Vandeplas S, Dauphin RD, Beckers Y, Thonart P, Théwis A (2010) *Salmonella* in Chicken: Current and Developing Strategies to Reduce Contamination at Farm Level. **Journal of Food Protection** 73:774–785.

Wales AD, Davies RH (2011) A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. **Avian Pathology** 40:429–436.

Warr GW, Magor KE, Higgins DA (1995) IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today** 16:392–398.

Whiley A, Fallowfield H, Ross K, Evoy VMC, Whiley H (2016) Higher Storage Temperature Causes Greater *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Internal Penetration of Artificially Contaminated, Commercially Available, Washed Free Range Eggs. **Journal of Food Protection** 79:1247–1251.

Wigley P, Barrow P (2017) ***Salmonella* in Preharvest Chickens: Current Understanding and Approaches to Control**. Prod Safe Eggs Microb Ecol *Salmonella*.

Woodward MJ, Gettinby G, Breslin MF, Corkish JD, Houghton S (2002) The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. **Avian Pathology** 31:383–392.

Xu Q, Katakura Y, Yamashita M, et al (2004) IL-10 Augments Antibody Production in in Vitro Immunized Lymphocytes by Inducing a Th2-Type Response and B Cell Maturation IL-10 Augments Antibody Production in in Vitro Immunized Lymphocytes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 68:2279–2284.

Yang Y, Wolfenden A, Mandal RK, Faulkner O, Hargis B, Kwon YM, Bielke L (2017) Evaluation of recombinant *Salmonella* vaccines to provide cross-serovar and cross-serogroup protection. **Poultry Science** 96:4352–4360.

Young SD, Olusanya O, Jones KH, Liu T, Liljebjelke KA, Hofacre CL (2007) *Salmonella* incidence in broilers from breeders vaccinated with live and killed *Salmonella*. **The Journal of Applied Poultry Research** 16:521–528.

Zar J (2009) Biostatistical analysis, 5th ed. Prentice Hall, New Jersey. p. 944.

Zhang S, Shen YR, Wu S, Xiao YQ, He Q, Shi SR (2019) The dietary combination of essential oils and organic acids reduces *Salmonella* enteritidis in challenged chicks. **Poultry Science** 0:1–7.

Zhang-barber L, Turner AK, Barrow PA (1999) Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine** 17:2538–2545.