

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

**RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM AVES
(*Gallus gallus*) VACINADAS, ANTES E APÓS O DESAFIO
COM *Salmonella* ENTERITIDIS**

Rafael Antonio Casarin Penha Filho

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

- 2013 -

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

**RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM AVES
(*Gallus gallus*) VACINADAS, ANTES E APÓS O DESAFIO
COM *Salmonella* ENTERITIDIS**

Rafael Antonio Casarin Penha Filho

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

- 2013 -

P399r Penha Filho, Rafael Antonio Casarin
Resposta imune celular e humoral em aves (*Gallus gallus*)
vacinadas, antes e após o desafio com *Salmonella* Enteritidis. / Rafael
Antonio Casarin Penha Filho. -- Jaboticabal, 2013
xix, 40 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Angelo Berchieri Junior
Banca examinadora: Luiz Felipe Caron, Marcelo Brocchi, Raphael
Lucio Andreatti Filho, Rosangela Zacarias Machado
Bibliografia

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

CDU 619:616.981.49:636.5

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO – Formou-se em Medicina Veterinária em janeiro do ano de 2007, pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP/Jaboticabal. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da FAPESP de julho de 2004 a junho de 2006, período em que desenvolveu o trabalho Via alternativa de recepção de elétrons em *Salmonella enterica* serovar Gallinarum durante a fase sistêmica da infecção de aves. Realizou o curso de Mestrado como bolsista FAPESP, no programa de Medicina Veterinária, na FCAV/UNESP/Jaboticabal entre março de 2007 à Fevereiro de 2009, período em que realizou o estudo intitulado “Utilização de um mutante atenuado de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar GALLINARUM $\Delta cobS\Delta cbiA$ para proteção de aves contra a infecção por *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovares GALLINARUM E ENTERITIDIS”. Em março de 2009, ingressou no curso de Doutorado no programa de Medicina Veterinária na área de Patologia Animal. Entre Julho de 2011 e Janeiro de 2012 foi bolsista de Doutorado Sanduíche (CAPES-PDSE) e realizou parte do curso de Doutorado na Universidade de Nottingham no Reino Unido. Possui interesse em estudos na área de vacinologia.

Email: rafaelpenha12@yahoo.com.br

À minha família, meu pai Rafael Antonio Casarin Penha e minha mãe Luci Aparecida Souza pelo amor, incentivo e esforço para me dar uma boa educação. Por acreditar em mim e por serem bons e amorosos pais sempre.

À minha avó Anália Batista Souza (*in memoriam*) por dedicar-me o amor mais puro e incondicional que existe. A tua simplicidade me ensinou a enxergar os verdadeiros brilhantes da vida.

À Joseane Cristina Ferreira por me apoiar nos momentos difíceis e por compartilhar comigo as alegrias e conquistas durante a caminhada. Agradeço ao seu amor que tanto me ajudou e ajuda a me tornar um homem melhor.

Dedico

*“Passa uma borboleta por diante de mim
E pela primeira vez no Universo eu reparo
Que as borboletas não têm cor nem
movimento,
Assim como as flores não têm perfume nem cor.
A cor é que tem cor nas asas da borboleta,
No movimento da borboleta o movimento é
que se move,
O perfume é que tem perfume no perfume
da flor.
A borboleta é apenas borboleta
E a flor é apenas flor”*

Fernando Pessoa (“Passa uma borboleta”)

AGRADECIMENTOS

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

Ao Professor Hélio José Montassier pela disponibilidade e ajuda para a realização deste projeto;

À Profa. Rosangela Zacarias Machado pelo atenção e ajuda para a elaboração deste trabalho;

Ao Prof. Antonio Carlos Alessi pela ajuda para realização deste trabalho;

Ao Prof. Manoel Victor Lemos pela atenção e ajuda durante a realização deste trabalho;

Aos Professores Luiz Felipe Caron, Raphael Lucio Andreatti Filho e Marcelo Brocchi pelas sugestões e auxílio para a elaboração da Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e pela bolsa (Proc. 2009/02633-5) concedida para a realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro (Bolsa PDSE – 1004-11-5) para realização de estágio sanduíche durante o curso de Doutorado.

Aos colegas de trabalho do departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Aos funcionários: Adriana Maria de Almeida e Orandi Mateus pela ajuda e disponibilidade;

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

RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM AVES (*Gallus gallus*) VACINADAS, ANTES E APÓS O DESAFIO COM *Salmonella* ENTERITIDIS

RESUMO: *Salmonella* Enteritidis (SE) causa doença transmitida por alimentos (DTA) em humanos. Carne de frango e ovos frequentemente estão associados a esses casos. O controle da infecção em aves, baseia-se em medidas de biossegurança, incluindo-se a vacinação. Tem sido comum a utilização de vacinas vivas (VV) e inativadas (Bacterinas - BA), porém pouco se sabe sobre os mecanismos imunes desencadeados pelas vacinas contra SE. Neste estudo, utilizaram-se quatro programas vacinais (VV; VV+VV; BA; VV+BA) em galinhas leves de variedade branca para postura de ovos de mesa, vacinadas com 5 e/ou 25 dias de vida, e desafiadas aos 45 dias de vida com SE. No dia anterior à infecção (1 DAI) e 1, 6 e 9 dias pós-infecção (DPI), cinco aves/grupo foram sacrificadas para amostragem. A população de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ foi avaliada por imunohistoquímica em tonsilas cecais e fígado; citocinas foram quantificadas por RT-qPCR em tempo real em tonsilas cecais e baço; níveis de IgG e IgM foram mensurados por ELISA no soro e IgA em lavado intestinal. Os níveis de imunoglobulina (IgG, IgM e IgA) estavam significativamente mais altos em aves vacinadas com BA, do 1 DAI ao 9 DPI, em comparação aos grupos vacinados somente com VV. Os níveis de IFN- γ , na tonsila cecal, eram similares em todos os grupos após o desafio. Antes do desafio (1 DAI), IL-10 foi altamente expressa em baço de aves que receberam somente BA (25 dias de vida), sugerindo o desenvolvimento de resposta por linfócitos T CD4⁺ auxiliar 2 (Ta2), reforçado pelos altos níveis de IgG encontrados neste grupo ($p < 0.05$). Os níveis de TGF- β 4 e das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNFSF15 eram bastante elevados no grupo que recebeu VV+VV. A vacinação por via oral com VV aumentou significativamente o fluxo de linfócitos T CD8⁺ para as tonsilas cecais após o desafio. Isso poderia estar relacionado com o melhor controle de SE verificado nos grupos que receberam ao menos uma dose de VV, incluindo o programa vacinal VV+BA, demonstrando que a vacina viva tem melhor eficácia, independentemente de altos níveis de imunoglobulinas no soro.

Palavras-Chave: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, Imunidade, Vacinação, Galinhas, Citocinas, Linfócitos

HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN VACCINATED CHICKENS (*Gallus gallus*), BEFORE AND AFTER *Salmonella* ENTERITIDIS CHALLENGE

ABSTRACT: *Salmonella* Enteritidis (SE) causes foodborne infection in humans. Poultry meat and eggs are frequently associated with these cases. The control of this bacterium is based on sanitary measures and mainly, vaccination of chicken flocks. Vaccine programs are used worldwide to control SE in poultry flocks. Live (LV) and killed vaccines (KV) are often combined, although few studies regarding immune mechanisms developed by SE vaccines are available. In this work, four vaccine programs were studied (LV; LV+LV; KV; LV+KV) in white layer-hens vaccinated at 5 and/or 25 days-old and challenged at 45 days-old with SE. At 1 day before (dbi) and 1, 6 and 9 days post-infection (DPI), five birds/group were sacrificed for sampling. The population of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was evaluated by immunohistochemistry in caecal tonsils and liver, cytokines were quantified by real time RT-qPCR in caecal tonsils and spleen; IgG, IgM and IgA levels were measured by ELISA in serum and the latter in intestinal washes. The immunoglobulin levels (IgG, IgM and IgA) were significantly higher in birds vaccinated with KV, from 1 dbi to 9 DPI, than in groups that received only LV. In caecal tonsils, IFN- γ levels were similar in all groups after challenge. Before challenge (1 dbi), IL-10 was highly expressed in spleen of birds that received only KV (25 days-old), suggesting the development of the T CD4⁺ helper 2 (Th2) type of immune response, reinforced by high IgG levels against SE seen in this group ($p < 0.05$). TGF- β 4 and the proinflammatory cytokines IL-6 and TNFSF15 were higher in caecal tonsils in the group that received LV+LV. Vaccination by oral route with LV clearly increased the influx of CD8⁺ T cells in caecal tonsils after challenge. This could be correlated with the better control of SE noticed in groups that received at least one dose of LV, including the vaccination program LV+KV, demonstrating that the live vaccine have better efficacy independently from high levels of immunoglobulins in serum.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, Immunity, Vaccination, Layer-hens, Cytokines, Lymphocytes

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Infecções por <i>Salmonella</i> Enteritidis	3
2.2. Patogênese da infecção por <i>Salmonella</i> spp.....	3
2.3. Metabolismo bacteriano e a síntese de Cobalamina	4
2.4. Vacinas contra <i>Salmonella</i> spp.	7
2.4.1. Vacinas inativadas contendo células inteiras	8
2.4.2. Vacinas inativadas contendo subunidades (Bacterinas)	8
2.4.3. Vacinas vivas atenuadas	9
2.4.4. Vacinação contra SE	10
2.5. Resposta Imune contra <i>Salmonella</i>	12
2.5.1. Resposta Imune Inata.....	12
2.5.2. Resposta Imune Adquirida.....	15
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos Específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Aves e ensaios <i>in vivo</i>	21
4.2. Estirpes bacterianas e vacinas.....	21
4.3. Preparo dos inóculos	22
4.4. Vacinação	22
4.5. Desenho Experimental	22
4.6. Colheita de material	23
4.7. Contagem bacteriana.....	24
4.8. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) Indireto	24
4.8.1. Preparo do antígeno de SE	24
4.8.2. Detecção de anticorpos no soro	25
4.8.3. Detecção de IgA secretória no lúmen intestinal	26
4.9. Imuno-histoquímica.....	26

4.10. Quantificação de genes envolvidos nas respostas imunes contra a infecção por <i>Salmonella</i> Enteritidis	27
4.10.1. Extração de RNA total e Transcrição Reversa para preparo da fita de DNA complementar (cDNA)	27
4.10.2. Eletroforese em gel de agarose para avaliação do mRNA	28
4.10.3. PCR quantitativo em tempo real	28
4.11. Análise estatística	30
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Contagem bacteriana	30
5.2. Mensuração de anticorpos no soro	32
5.3. Níveis de IgA secretada no lúmen intestinal	32
5.4. Quantificação de citocinas produzidas no baço e tonsila cecal	33
5.4.1. Extração de RNA total	33
5.4.2. Quantificação da expressão de mRNA transcriptores de citocinas	34
5.5. Avaliação do fluxo de linfócitos T CD8 ⁺	42
5.6. Avaliação do fluxo de linfócitos T CD4 ⁺	44
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS	58

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Desenho Experimental.....	23
Tabela 2. Referência dos iniciadores utilizados para a quantificação de citocinas por PCR em tempo real.....	29

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fases da resposta imune humoral.....	16
Figura 2. Indução e ação da imunidade mediada por células.....	18
Figura 3. Contagem bacteriana de SE em amostras de baço e de conteúdo cecal após o desafio de aves não vacinadas (grupo A) e vacinadas (grupos B, C, D e E) expressos em log ₁₀ de UFC/g de amostra.....	31
Figura 4. Níveis de IgG e IgM no soro e de IgA no lúmen intestinal em aves não vacinadas (grupo A) e vacinadas (grupos B, C, D e E) antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI e 9 DPI).....	33
Figura 5. A: Gel de agarose demonstrando a boa qualidade da extração do RNA total com presença das bandas 28S e 18S na proporção 2:1.....	34
Figura 6. Quantificação relativa da expressão de IL-12 em amostras de baço e de tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI e 9 DPI).....	35
Figura 7. Quantificação relativa da expressão de IFN- γ em amostras de baço e de tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI e 9 DPI).....	36
Figura 8. Quantificação relativa da expressão de IFN- γ em amostras de baço e de tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI e 9 DPI).....	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 9. Quantificação relativa da expressão de TGF- β em amostras de baço e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI e 9 DPI).....	38
Figura 10. Quantificação relativa da expressão de TNFSF15 em amostras de baço e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI e 9 DPI).....	39
Figura 11. Quantificação relativa da expressão de CCL4 em amostras de baço e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI e 9 DPI). Dados representam a média \pm DP. *, $p < 0.05$; ns, não significativo.....	40
Figura 12. Quantificação relativa da expressão de IL-6 em amostras de baço e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI e 9 DPI). Dados representam a média \pm DP. *, $p < 0.05$; ns, não significativo.....	41
Figura 13. Quantificação de linfócitos T CD8 ⁺ marcados por imuno-histoquímica em cortes de fígado e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1, 6 e 9 DPI).....	43
Figura 14. Detecção do infiltrado de linfócitos T CD8 ⁺ em amostras de fígado e tonsila cecal de aves não vacinadas (Grupo A) e aves vacinadas pelo método de Imuno-histoquímica.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 15. Quantificação de linfócitos T CD4 ⁺ marcados por imuno-histoquímica em cortes de fígado e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1, 6 e 9 DPI).....	45
Figura 16. Detecção do infiltrado de linfócitos T CD4 ⁺ em amostras de fígado e tonsila cecal de aves não vacinadas (Grupo A) e aves vacinadas pelo método de Imuno-histoquímica.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

BA – Bacterina (Vacina Inativada)

CCL4 – Quimiocina C-C Ligante 4

CD4⁺ - Grupamento de Diferenciação 4

CD8⁺ - Grupamento de Diferenciação 8

CTLs – Linfócitos T citotóxicos CD8⁺

IFN- γ – Interferon Gamma

IgA – Imunoglobulina A

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12p40 – Interleucina 12 subunidade p40 ou fator de maturação de linfócitos

SE – *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis

SENa1^rSpec^r – Cepa selvagem de SE resistente ao ácido nalidíxico e à espectomicina

SG – *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum

SG Δ cobS Δ cbiA – *Salmonella* Gallinarum com deleção parcial dos genes *cobS* e *cbiA*

Ta1 – Linfócito T CD4⁺ auxiliar 1

Ta2 – Linfócito T CD4⁺ auxiliar 2

TGF- β 4 – Fator de Crescimento Tumoral beta 4

TNFSF15 – Membro 15 da Superfamília do Fator de Necrose Tumoral

VV – Vacina Viva (estirpe atenuada SG Δ cobS Δ cbiA)

1. INTRODUÇÃO

A atividade avícola organizou-se de forma intensiva a partir da década de 1960. Hoje, a indústria avícola, produz cerca de 60 milhões de toneladas de carne ao ano no mundo todo. No Brasil, desde 2006, a carne de frango é o produto de origem animal com o maior volume de exportações. Este crescimento tem que ser acompanhado pela evolução dos conhecimentos, principalmente ligados ao bem-estar e à sanidade animal. A criação animal moderna explora aspectos como a potencialização da criação no menor espaço possível, favorecendo a introdução e a disseminação de patógenos, que poderão permanecer no ambiente por tempo indeterminado, comprometendo a saúde animal e a qualidade do produto final. Os sorotipos responsáveis por infecções paratíficas de aves são de difícil controle e são responsáveis por zoonoses de origem alimentar. Nas três últimas décadas, surtos humanos causados por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) tem sido associados ao consumo de carne de frango e ovos.

SE é capaz de infectar diferentes hospedeiros, entre aves e mamíferos, incluindo roedores e seres humanos. A infecção de aves e roedores não provoca, necessariamente, o aparecimento de sinais clínicos da doença, tornando necessário o constante monitoramento da infecção por esta bactéria nos lotes avícolas e o controle obrigatório de roedores nas instalações.

SE é transmitido verticalmente, de aves reprodutoras às aves criadas com a finalidade de produção de carne ou ovos. Por se multiplicar muito bem no trato digestório, se espalha por meio das fezes, com muita facilidade nas granjas.

O tratamento com antimicrobianos foi proibido na Europa. Assim sendo, outras medidas de controle passaram a ser mais estudadas. Várias ferramentas são utilizadas de forma combinada, como a desinfecção das instalações, controle de roedores e programas de vacinação.

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

Existem dois tipos de vacinas disponíveis no mercado, as bacterinas, que são constituídas por células inativadas ou subunidades de *Salmonella* spp. e as vacinas vivas, contendo estirpes atenuadas. Com os recentes avanços em pesquisa, novas vacinas foram produzidas e os testes demonstram a melhor eficácia das vacinas vivas em conter infecções em aves. No entanto, as vacinas inativadas são utilizadas com frequência em aves reprodutoras, pois estas estimulam forte resposta por anticorpos, principalmente IgG (também conhecida como IgY em aves) importantes para a imunidade materna transferida para os pintinhos.

Considerando as colocações acima, este projeto investigou a resposta imune mediada por células e a resposta imune humoral induzida por diferentes programas vacinais utilizando uma vacina inativada (bacterina) e uma vacina viva atenuada (*SGΔcobSΔcbiA*), antes e após o desafio com SE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infecções por *Salmonella* Enteritidis

Salmonella enterica subesp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) encontra-se entre os sorotipos que provocam infecção paratífica em aves e mamíferos. Nos Estados Unidos da América (EUA), anualmente são reportados mais de 40.000 casos de infecções por *Salmonella* spp. em humanos. Destes, cerca de 17% são causados por SE (CDC, 2008) a maioria associados à ingestão de alimentos de origem avícola. Contudo estima-se que os números sejam mais expressivos, chegando a 1,4 milhões de casos (MEAD *et al.*, 1999; VOETSCH *et al.*, 2004).

Aves infectadas por SE não apresentam necessariamente os sinais clínicos da doença, por isso, o monitoramento bacteriológico dos lotes é necessário. O ambiente de criação das aves comerciais é propício para a disseminação e persistência de vários sorotipos de *Salmonella* spp., contudo SE se destaca por conseguir contaminar os ovos facilmente (SOERJADI-LIEM & CUMMING, 1984; CALDWELL *et al.*, 1995; BYRD *et al.*, 1999). A estratégia ideal para o controle da SE poderia ser a vacinação para o incremento da imunidade (BAUMLER *et al.*, 2000).

2.2. Patogênese da infecção por *Salmonella* spp.

Para infectar o hospedeiro, SE utiliza os fatores de virulência durante a invasão do hospedeiro, colonização, sobrevivência, replicação e até a destruição de células parasitadas (LIBBY *et al.*, 2000).

SE possui flagelo, que auxilia na fixação da bactéria durante a colonização intestinal, principalmente nos cecos, onde muitas vezes desencadeia uma forte reação inflamatória local, iniciando os sintomas no trato gastroentérico. Estirpes de SE fagotipo 4 (PT4), são altamente invasivas e podem causar infecção sistêmica e elevada mortalidade de aves jovens (ABOUZEED *et al.*, 2000). O sorovar hospedeiro-específico de aves, *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar

Gallinarum biovar Gallinarum (SG) e biovar Pullorum (SP), não possuem flagelo e invadem a mucosa intestinal sem comprometimento deste tecido. Estes dois biovars são invasivos e a disseminação nos órgãos internos, principalmente fígado, baço e coração, causa sinais clínicos aparentes, como anorexia e alta mortalidade.

Após a infecção por via oral, *Salmonella* spp. é fagocitada por células M (membranosas), células epiteliais e células dendríticas presentes no tecido linfóide associado ao intestino (tonsilas cecais) e atinge os órgãos internos por meio da circulação sanguínea (CARTER & COLLINS, 1974; VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 1999; RESCIGNO *et al.*, 2001), gerando a infecção sistêmica. Depois de interagir com fatores do sistema complemento, as bactérias fagocitadas iniciam a fase de infecção intracelular em macrófagos, células polimorfonucleares, células dendríticas e ocasionalmente, linfócitos B (BIOZZI *et al.*, 1960; DUNLAP *et al.*, 1991; WARREN *et al.*, 2002). Os fagócitos inflamatórios infectados migram para outros órgãos, formando novos focos de infecção e resultando na formação de lesões inflamatórias, septicemia e necrose focal nos tecidos (RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1997).

2.3. Metabolismo bacteriano e a síntese de Cobalamina

Para completar seu ciclo, as bactérias precisam se adaptar às condições disponíveis para sobrevivência e multiplicação no ambiente em que se encontram; seja no meio ambiente, seja durante a invasão de seres vivos. O sistema respiratório bacteriano é modulado para alterar rapidamente o seu funcionamento, conforme as condições encontradas e a disponibilidade de substratos para a obtenção de energia. Assim sendo, as bactérias conseguem superar as adversidades ambientais e utilizar os substratos disponíveis. Faz parte da habilidade para superar as adversidades ambientais, a alteração da composição do sistema respiratório. Componentes da membrana celular alteram-se conforme a necessidade e a disponibilidade de substratos no meio em que se encontram. O conhecimento a respeito do processo de respiração em anaerobiose é importante no sentido de que a sobrevivência de *Salmonella* no organismo animal (ou mesmo em seres humanos), intracelular ou no trato entérico, ocorre em ambiente estritamente anaeróbico.

Portanto, além dos mecanismos de patogenicidade (JONES *et al.*, 2001), sua sobrevivência depende da capacidade de utilizar os substratos disponíveis para se manter viva. A elucidação do metabolismo bacteriano pode ser útil para conhecer melhor o mecanismo utilizado pela bactéria para sobreviver no hospedeiro.

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

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

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

A biossíntese de cobalamina só é encontrada entre organismos procarióticos, aeróbicos, anaeróbicos e anaeróbicos facultativos, incluindo-se *Salmonella enterica*. Esta macromolécula constitui-se em nutriente essencial para a vida de animais e seres humanos. Em *Salmonella* Typhimurium, sua síntese ocorre em condições de anaerobiose, podendo ser sintetizada em aerobiose ou anaerobiose quando a bactéria for suprida com as substâncias precursoras como cobinamida (JETER *et al.*,

1984). As vias de produção da vitamina B₁₂ são muito complexas, requerendo a atividade catalítica de aproximadamente 30 enzimas (ANDERSSON, 1995). Destas, 25 são codificadas pelo *operon cob* (ESCALANTE-SEMERENA *et al.*, 1992; ROTH *et al.*, 1993). A expressão do *operon cob* é regulada por pelo menos seis agentes efetores: potencial óxido-redução, AMP cíclico (cAMP), propanediol, etanolamina, tetrionato e cobalamina (ESCALANTE-SEMERENA & ROTH, 1987; RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1994; PRICE-CARTER *et al.*, 2001). Um baixo potencial redox, gerado durante o crescimento anaeróbico da bactéria, é suficiente para aumentar a expressão do *operon cob* entre 4 e 100 vezes (ESCALANTE-SEMERENA & ROTH, 1987; ANDERSSON & ROTH, 1989a,b). A presença de cobalamina, quando ela se encontra sob a forma de coenzima B₁₂ (Ado-CBL) reprime a expressão do *operon cob* (LUNDRIGAN & KADNER, 1989; ESCALANTE-SEMERENA *et al.*, 1990). O *operon* responsável pela biossíntese de Ado-CBL contém 17 genes CbiA-P, que estão envolvidos na produção da porção inicial da molécula (anéis *corrín*) e genes envolvidos na integração do nucleotídeo à *cobinamíde* (*cobACDUST*) (ROTH *et al.*, 1993; WARREN *et al.*, 2002). As salmonelas são bactérias anaeróbicas facultativas capazes da biossíntese de cobalamina (CBL) durante o crescimento em anerobiose. CbiA (ácido cobirínico a,c-*díamido sintetase*) é a primeira *glutamina aminotransferase* na via anaeróbica para a biossíntese de vitamina B₁₂. Esta enzima chama a atenção por catalisar reações químicas em diversos pontos do substrato. O gene *cbiA* também é responsável, indiretamente, pela regulação negativa (repressão) de todo o *operon cob*. A presença de vitamina B₁₂ reprime a expressão de *cbiA* durante o início da fase de tradução nos ribossomos, desta forma, consegue reprimir a expressão de todo o *operon cob*, que cessa a produção de cobalamina (RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1994). A enzima CobS (*Adenosilcobalamina-5'-P sintetase*) fica localizada na membrana celular e catalisa o penúltimo passo da produção de Ado-CBL (MAGGIO-HALL *et al.*, 2004). A produção de cobalamina é completamente dependente desta enzima (MAGGIO-HALL & ESCALANTE-SEMERENA, 1999; ANDERSON *et al.*, 2008).

O *operon pdu*, que codifica enzimas para a utilização de propanediol como fonte de carbono e energia, fica localizado adjacente ao *operon cob*. A indução da expressão de ambos os *operons* aumenta em até 10 vezes quando propanediol é

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

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

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

2.4. Vacinas contra *Salmonella* spp.

Os primeiros testes com vacinas contra SE foram realizados em camundongos que receberam vacinas vivas, inativadas e frações celulares de SE, sendo constatada uma resposta imune protetora contra a estirpe desafio (COLLINS

& MILNE, 1966; KAWAKAMI *et al.*, 1966; OSAWA *et al.*, 1967; COLLINS, 1968). Desde então, várias formulações de vacinas foram desenvolvidas para uso em aves com resultados satisfatórios (TIMMS *et al.*, 1990; GAST *et al.*, 1992; BARBOUR *et al.*, 1993; GAST *et al.*, 1993; TIMMS *et al.*, 1994). Atualmente, são comercializados dois tipos de vacinas contra SE em aves, as vacinas inativadas, também conhecidas como bacterinas e as vacinas vivas. A eficácia das bacterinas tem sido contestada por vários experimentos (GAST *et al.*, 1993; OKAMURA *et al.*, 2004; TRAN *et al.*, 2010). As vacinas vivas são consideradas, atualmente, as alternativas mais apropriadas, uma vez que também podem ser administradas oralmente e estimulam uma resposta imune mais completa.

2.4.1. Vacinas inativadas contendo células inteiras

Estas vacinas são compostas por células bacterianas inativadas com calor ou acetona ou formaldeído e são administradas por via parenteral. Em seres humanos, estas vacinas conferem boas respostas por anticorpos e um grau moderado de proteção (LEVINE *et al.*, 1989). Células inteiras inativadas são imunogênicas, mas induzem a uma pobre resposta imune celular (COLLINS, 1974; HARRISON *et al.*, 1997).

2.4.2. Vacinas inativadas contendo subunidades (Bacterinas)

Atualmente, as vacinas contendo subunidades celulares de *Salmonella*, são licenciadas para uso em animais e amplamente utilizadas na produção avícola. Dentre as subunidades celulares utilizadas estão o polissacarídeo Vi, flagelina, LPS tratado, extratos celulares e porinas. Estas vacinas são seguras e imunogênicas, contudo, muitos estudos afirmam que aves vacinadas por bacterinas desenvolvem uma forte resposta imune humoral e uma fraca resposta imune celular (GAST *et al.*, 1993; BABU *et al.*, 2004; TRAN *et al.*, 2010). Além disso, a utilização dessas vacinas contra sorovares flagelados, principalmente SE, revelam uma baixa eficácia no controle da excreção fecal (BARBOUR *et al.*, 1993; GAST *et al.*, 1993; PENHA FILHO *et al.*, 2009; PENHA FILHO *et al.*, 2010). As bacterinas comerciais são

preparadas com adjuvantes em emulsão oleosa, para que a absorção dos antígenos seja mais lenta e o estímulo seja duradouro. Estas vacinas possuem poucos antígenos na sua formulação e estimulam principalmente a produção de anticorpos, estimulando fracamente a produção de linfócitos T citotóxicos (CARVAJAL *et al.*, 2008).

2.4.3. Vacinas vivas atenuadas

As vacinas vivas são melhores imunógenos, contudo, durante o desenvolvimento são necessários estudos complementares para evitar problemas de saúde pública ou de reversão de virulência dessas estirpes.

Por um longo período, o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas contra infecção por *Salmonella* spp. se baseava em critérios e métodos empíricos. No entanto, com o advento da biologia molecular e a disponibilidade de sequências genômicas completas de diversos sorovares de *Salmonella* (MCCLELLAND *et al.*, 2001; PARKHILL *et al.*, 2001), surgiram novas ferramentas para a geração de mutantes atenuados de *Salmonella*, que são candidatos a vacinas em potencial.

A seleção de estirpes de *Salmonella* para uso como vacinas vivas e o preparo das mutações genéticas dependem do estudo da patogenia e imunobiologia das doenças. De fato, o perfil e a localização anatômica das respostas imunes induzidas pelas vacinas, exercem uma grande influência sobre a consistência e duração da resistência adquirida ao patógeno nos animais vacinados. As vacinas vivas tem demonstrado melhor eficácia no controle de *Salmonella*, quando comparadas às demais vacinas disponíveis, porque são capazes de induzir a imunidade celular, ao contrário das vacinas inativadas. Assim, a demanda atual por inovações e pesquisas para o desenvolvimento de estirpes mutantes atenuadas de *Salmonella* com potencial vacinal para serem usadas em animais tem aumentado.

As estirpes que têm sido empregadas são mutantes de estirpes “selvagens” com deleções estáveis em algum gene, que tem a capacidade de sobreviver por algum tempo no hospedeiro e estimular uma resposta imune (VAN IMMERSSEEL *et al.*, 2005). A estirpe SG 9R é rugosa e foi originada da estirpe lisa 9S (SMITH, 1956). A estirpe 9R não possui os antígenos somáticos característicos da forma lisa de SG

devido a algumas mudanças na conformação do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e por isso tornou-se atenuada. Vacinas vivas e inativadas, preparadas a partir de SG 9R, já foram utilizadas em programas de prevenção em alguns países (LEE *et al.*, 2005; PENHA FILHO *et al.*, 2009). No entanto, não foi observado nenhum sucesso significativo no uso de vacinas inativadas preparadas a partir de SG 9R.

Outras vantagens no uso de estirpes vivas, atenuadas e invasivas para vacinação de aves já foram demonstradas. FEBERWEE *et al.* (2001a) encontraram evidências de que uma vacina viva baseada em SG 9R contribuiu para a redução da infecção por SE em lotes comerciais. Além disso, nenhuma evidência de excreção fecal, contaminação da casca ou conteúdo do ovo pela estirpe vacinal foi encontrada, diminuindo assim a probabilidade de excreção da estirpe vacinal para o ambiente quando usado pela via parenteral (FEBERWEE *et al.*, 2001b).

Em estudos anteriores, a estirpe atenuada $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ também foi utilizada com sucesso para o controle de infecções por *Salmonella* em aves, sendo capaz de reduzir a colonização intestinal por SE e a mortalidade de aves infectadas com SG (PENHA FILHO *et al.*, 2010).

2.4.4. Vacinação contra SE

As vacinas auxiliam na diminuição dos riscos à saúde pública decorrente da presença de *Salmonella* spp. em produtos de origem aviária. A redução da colonização do trato reprodutor e do trato intestinal diminui a excreção fecal e conseqüentemente a contaminação de ovos e carne (MEAD *et al.*, 1999).

Estirpes mais invasivas, como SG e SE PT4, são bastante utilizadas para desenvolver vacinas vivas (SMITH, 1956; NASSAR *et al.*, 1994; HAYES *et al.*, 1999; EJIDOKUN *et al.*, 2000; RANA & KULSHRESHTHA, 2006; ADRIAENSEN *et al.*, 2007; MATSUDA *et al.*, 2011b). Essas estirpes são capazes de estimular a uma forte resposta imune celular devido à apresentação sistêmica de antígenos íntegros e específicos e são eliminadas antes do que ocorreria com uma estirpe menos invasiva (BARROW *et al.*, 1988; MATSUDA *et al.*, 2011a). Aves poedeiras infectadas com estirpes invasivas mostram uma imunidade consideravelmente maior à

reinfecção (BARROW *et al.*, 1990b). ADRIAENSEN *et al.* (2007) produziram uma estirpe de SE PT4 com mutação dupla nos genes *guaB* e *fliC*, e notaram que a mesma tornou-se atenuada, com reduzida capacidade invasiva. A imunidade conferida conseguiu proteger os órgãos, mas não impediu a colonização do trato entérico, inclusive dos cecos, pela estirpe patogênica de SE.

A maioria dos trabalhos sobre a eficácia de uma vacina contra *Salmonella* descrevem apenas uma proteção parcial, tal como a redução da excreção fecal de SE (GAST *et al.*, 1993), ou apenas a diminuição da colonização dos tecidos do hospedeiro (BABU *et al.*, 2003; GANTOIS *et al.*, 2006; ADRIAENSEN *et al.*, 2007). Os resultados dos experimentos apesar de muito variáveis, apresentam um ponto em comum. Nenhum deles relata uma imunidade contra SE na qual a ave vacinada está completamente protegida. A proteção contra a infecção dos órgãos internos é mais fácil de ser alcançada do que a proteção efetiva contra a colonização intestinal (CURTISS & HASSAN, 1996). Algumas bacterinas utilizadas em aves, por exemplo, demonstram algum grau de proteção contra a invasão dos órgãos internos por *Salmonella* spp., mas falham no controle da colonização intestinal (GERMANIER, 1972; BARROW *et al.*, 1990a; GAST *et al.*, 1992). No entanto, a vacinação é utilizada como uma importante ferramenta disponível para a difícil tarefa de controlar uma infecção por *Salmonella* spp. em aves comerciais. No Brasil, a imunização de aves reprodutoras (matrizes) com bacterinas, é permitida e tem sido aplicada junto com medidas de biossegurança.

Alguns estudos relatam que a vacinação aumenta a concentração dos anticorpos específicos IgG na gema de ovos, no soro sanguíneo e no jejuno de pintinhos provenientes de matrizes reprodutoras vacinadas (METHNER & STEINBACH, 1997; INOUE *et al.*, 2008). Os anticorpos são depositados na gema do ovo durante a sua formação e podem auxiliar na redução de ovos contaminados (YAMAMOTO *et al.*, 1975; HOLT *et al.*, 1996). A menor produção de ovos contaminados bem como uma progênie mais resistente ao desafio são fundamentais para o controle da salmonelose, já que o simples contato entre os ovos e os pintinhos recém-eclodidos infectados é capaz de contaminar aves livres dentro do incubatório (CASON *et al.*, 1994; INOUE *et al.*, 2008).

Muitos dos dados que constam da literatura a respeito da avaliação de vacinas vivas, referem-se a estudos em animais de laboratório (IANARO *et al.*, 1995; DUNSTAN *et al.*, 1999; ZHANG-BARBER *et al.*, 1999). Existem alguns estudos em aves comerciais, que relatam resultados positivos (BARROW *et al.*, 1990a; METHNER *et al.*, 1994; METHNER & STEINBACH, 1997) incentivando a maior exploração deste importante tópico para a avicultura.

2.5. Resposta Imune contra *Salmonella*

2.5.1. Resposta Imune Inata

Após o contato primário com o microrganismo patogênico ou atenuado, como uma estirpe vacinal, ocorre rapidamente o estímulo e o desenvolvimento da imunidade inata. A resposta imune inata contra *Salmonella* depende da espécie hospedeira infectada e do sorovar de *Salmonella*. Os sorovares que possuem flagelo, como SE, causam o paratifo em diversas espécies hospedeiras e devido à menor invasividade, induzem à formação de uma gastroenterite limitada durante a infecção. A maioria dos estudos sobre imunidade contra *Salmonella* spp. são realizados em camundongos infectados por *S. Typhimurium*, porém, as informações geradas nem sempre podem ser extrapoladas para o estudo da infecção e imunidade de aves por SE. Por isso, existe a necessidade de estudos sobre a resposta imune contra as salmoneloses, especificamente em aves (CHAPPELL *et al.*, 2009; DOUGAN *et al.*, 2011).

A imunidade mediada por células (IMC) demonstra ser o mecanismo de maior importância para proteção contra *Salmonella* spp. e durante a resposta inata as principais células envolvidas são os macrófagos, heterófilos e as células “*Natural Killer*” (COLLINS, 1974; MASTROENI *et al.*, 1993; BABU *et al.*, 2003; OKAMURA *et al.*, 2004). Contudo, diferentes mecanismos podem ser ativados durante a infecção. Na fase extracelular e em infecções na mucosa intestinal, os principais mecanismos da imunidade inata ativados são a fagocitose e a resposta inflamatória, e em menor escala o sistema complemento (CHAPPELL *et al.*, 2009). Como resultado da

ativação do complemento ocorre aumento da opsonização e fagocitose da bactéria. A lise de bactérias opsonizadas, estimula consequentemente a resposta inflamatória e o recrutamento e ativação de leucócitos (AYRES & VANCE, 2012; KAISER *et al.*, 2012).

Os fagócitos, inicialmente heterófilos e posteriormente os macrófagos e células dendríticas, ingerem e tentam destruir *Salmonella* spp., mas estas bactérias intracelulares facultativas possuem mecanismos de evasão e resistem à degradação dentro dos fagócitos onde conseguem sobreviver e até mesmo se replicar (RUBY *et al.*, 2012). Os fagócitos ativos utilizam vários receptores de membrana e citoplasmáticos, que reconhecem moléculas do patógeno, como a manose ou o LPS e também anticorpos opsonizadores (receptores de Fc). Os receptores da família Toll-like (TLRs) e Nod-like (NLRs) são importantes devido à capacidade de reconhecimento específico das moléculas microbianas (KOGUT *et al.*, 2005; BROZ & MONACK, 2011; FRANCHI, 2011). A exemplo disso, o TLR5 reconhece a flagelina bacteriana e auxilia na ativação de fagócitos, estimulando as suas funções microbicidas (IQBAL *et al.*, 2005; UEMATSU & AKIRA, 2009).

Além disso, as citocinas que ativam os sistema fagocitário (macrófagos, células dendríticas e heterófilos - homólogos aos neutrófilos em mamíferos) como Interferon-gamma (IFN- γ) e as citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (HIROSE *et al.*, 1999; LALMANACH & LANTIER, 1999), são cruciais para a proteção contra a infecção primária por *Salmonella* spp. por induzirem a infiltração de leucócitos nos tecidos infectados estimulando a resposta inflamatória (ECKMANN & KAGNOFF, 2001; RAUPACH & KAUFMANN, 2001). A importância de algumas citocinas foi demonstrada em experimentos, em que animais infectados por uma estirpe atenuada de *Salmonella* Typhimurium tiveram dificuldade no controle da infecção após a inativação de IFN- γ e de Interleucina-12 (IL-12) (HESS *et al.*, 1996; MASTROENI *et al.*, 1998). Em estudo realizado em aves *in vivo* (FARNELL *et al.*, 2001; SETTA, A. M. *et al.*, 2012) e *in vitro* (SETTA, A. *et al.*, 2012) foi relatado uma importante produção e participação da citocina IFN- γ durante a redução da infecção por SE.

As células polimorfonucleares (PMN) desempenham um importante papel durante a resposta inicial contra a infecção por *Salmonella* spp. (FIERER, 2001).

Em aves, granulócitos heterofílicos se acumulam na lamina própria das tonsilas cecais, 18h após infecção por SE (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2002; CARVAJAL *et al.*, 2008). Infecções por sorovares flagelados geram respostas inflamatórias agudas, causando lesões no trato gastroentérico, geralmente caracterizadas pela expressão de quimiocinas e um infiltrado de leucócitos e heterófilos polimorfonucleares (WITHANAGE *et al.*, 2004). Após infecção por *S. Typhimurium* (STM), os heterófilos tem expressão aumentada das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e CXCL8 (conhecida anteriormente como IL-8), assim como a citocina anti-inflamatória Fator de Crescimento Tumoral β 4 (TGF- β 4), enquanto a expressão de IL-18 e IFN- γ foi diminuída (KOGUT *et al.*, 2003). Os factores bacterianos responsáveis por estimular esta resposta não foram completamente elucidados, mas suspeita-se principalmente de proteínas do flagelo (FliC e FliB) (GEWIRTZ *et al.*, 2001) e de proteínas efetoras SopA, B e D e SipA (LEE *et al.*, 2000). Contudo, diferenças podem ocorrer dependendo do sorotipo infectante. Células epiteliais de aves tem menor expressão de IL-1 e IL-6, quando infectadas por SG (KAISER *et al.*, 2000). A influência da migração de células PMN sobre a formação de lesões entéricas foi motivo de discussões, contudo, atualmente se assume que estas células não contribuem diretamente para este processo (FOSTER *et al.*, 2003). A importância das células PMN e dos infiltrados heterofílicos foi demonstrada por KOGUT *et al.* (1994). Aves com granulocitopenia (depleção de heterofilos) apresentaram maior suscetibilidade à infecção sistêmica por SE, fato que causou severa morbidade e mortalidade, mesmo quando apenas uma dose subletal era administrada oralmente.

Dentre os leucócitos recrutados durante a resposta imune inata à infecção intracelular por *Salmonella* spp., se destacam os fagócitos e as células citotóxicas, como as células “*Natural Killer*” e os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos que são capazes de destruir células infectadas e podem ser encontradas em quantidades representativas após infecção primária por *Salmonella* Enteritidis em aves (BERNDT & METHNER, 2001). As bactérias intracelulares induzem a produção de IL-12 e IL-15 por células dendríticas, ambas ativadoras de células “*Natural Killer*” que produzem IFN- γ e por sua vez ativam os macrófagos e promovem a morte de bactérias fagocitadas. Assim, as células “*Natural Killer*” fornecem uma defesa rápida contra estes micro-organismos, antes do desenvolvimento da imunidade adaptativa.

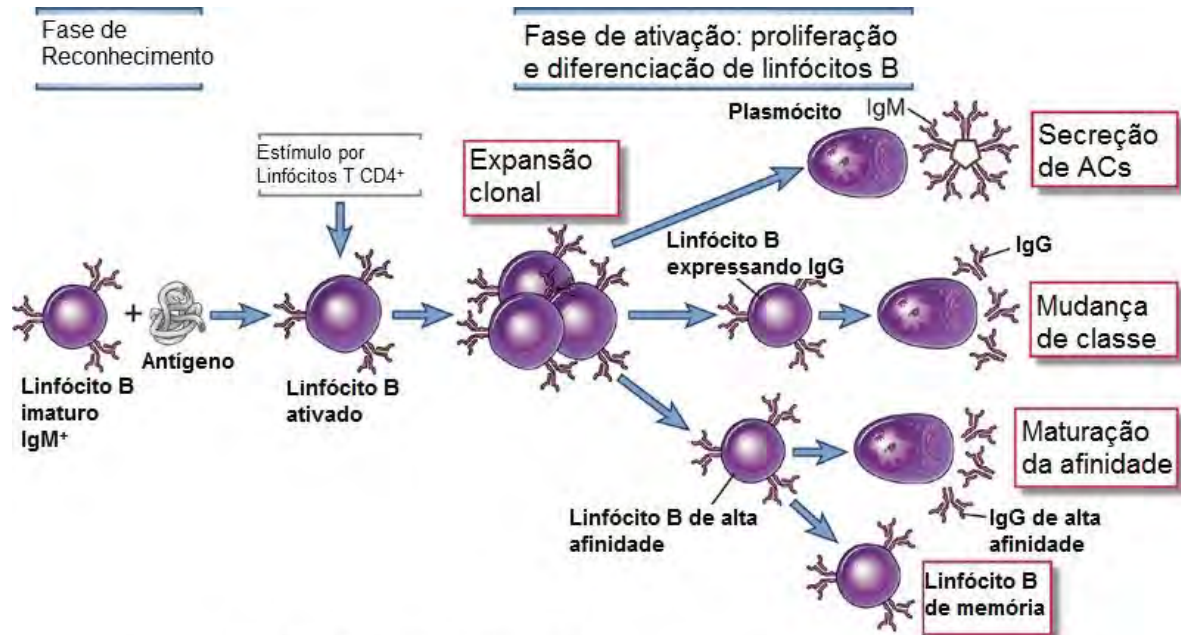
De fato, estudos sobre infecções primárias por *Salmonella* spp., tanto em aves quanto em mamíferos, revelam que a resposta imune inata tem grande importância para a proteção nos momentos iniciais da infecção, e são capazes de controlar infecção transitoriamente (MITTRÜCKER *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2005). Porém, a imunidade inata, somente, não consegue erradicar completamente essas infecções, já que para isso, é necessário o desenvolvimento da resposta imune celular adaptativa ou adquirida.

2.5.2. Resposta Imune Adquirida

A resposta imune humoral (Figura 1) é um dos principais mecanismos imunes no combate a infecções bacterianas extracelulares, entre outras funções a IgA secretória é capaz de bloquear a colonização e infecção, opsonizar e eliminar patógenos e neutralizar suas toxinas (RANA & KULSHRESHTHA, 2006; DOUGAN *et al.*, 2011). Os anticorpos são dirigidos contra epítomos da parede celular bacteriana, polissacarídeos (LPS) ou proteínas como a flagelina. Durante a fase extracelular, o reconhecimento destas bactérias por receptores de células do sistema imune desencadeia mecanismos como a opsonização, a neutralização, a fagocitose e a ativação do complemento pela via clássica (MASTROENI, 2002). A neutralização e a opsonização são mediadas por imunoglobulinas de alta especificidade no soro pelas classes IgM e IgG e no lúmen intestinal pela classe IgA (MITTRÜCKER *et al.*, 2000; MASTROENI *et al.*, 2001).

A apresentação dos antígenos bacterianos aos linfócitos T CD4⁺ auxiliares, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da atividade fagocítica e microbicida dos macrófagos e neutrófilos. A infecção por *Salmonella* spp. induz a formação de respostas Ta1, caracterizada pela produção de IFN- γ e ativação da imunidade celular mas também e pode estimular o perfil de resposta Ta2 e a consequente produção de anticorpos (Resposta Imune Humoral) (MASTROENI, 2003; HE *et al.*, 2011). Contudo, em infecções por cepas invasivas, as células bacterianas penetram facilmente nas células do hospedeiro, principalmente nos fagócitos e durante o parasitismo intracelular ficam protegidas da ação dos

anticorpos circulantes. Para a eliminação da infecção intracelular, os mecanismos da imunidade mediada por células são imprescindíveis, principalmente a imunidade mediada por linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ (LEHMANN *et al.*, 2006).



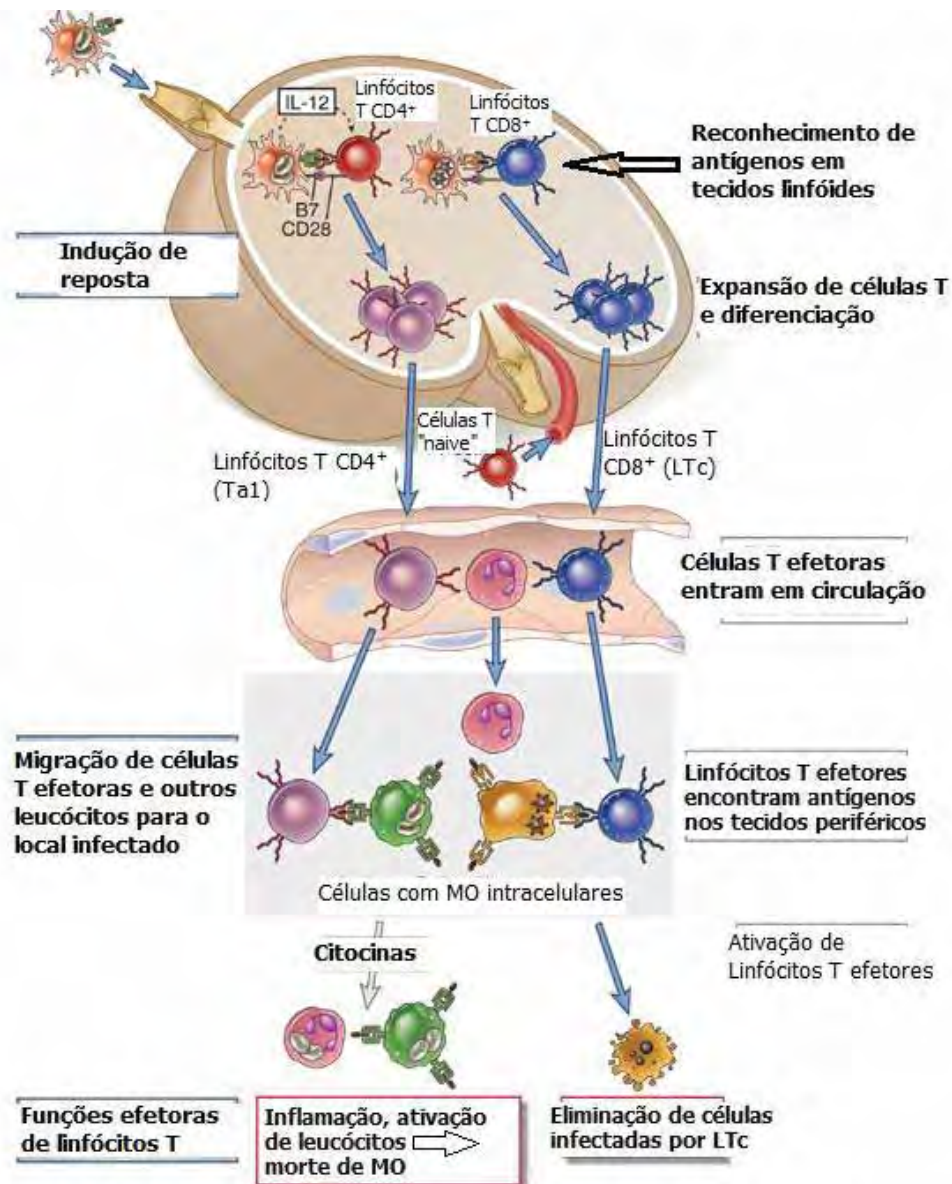
Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.
Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

Figura 1. Fases da resposta imune humoral. A ativação de linfócitos B é iniciada pelo reconhecimento específico de antígenos pelos receptores de Ig destas células. Os linfócitos B ativados são estimulados pelo antígeno específico e por linfócitos T CD4⁺ auxiliares à diferenciação e proliferação de células clones. A progênie de clones que produz IgM e outros isótipos de Ig (ex. IgG e IgA secretória) sofre maturação de afinidade e podem se tornar plasmócitos produtores de Ig ou persistir por longos períodos como linfócitos de memória. Extraído de Abbas *et al.*, 2012.

A imunidade mediada por células é efetivada por dois tipos principais de células: os linfócitos T CD4⁺ que recrutam e ativam fagócitos através do receptor CD40 e da produção de IFN- γ , resultando na morte de microrganismos fagocitados e os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) que matam as células infectadas. Ambos os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ respondem à antígenos proteicos de microrganismos fagocitados, que são apresentados como peptídeos associados às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II ou de classe I (MHCII ou MHCI), respectivamente. Os linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em Ta1 sobre

influência de IL-12, produzida por macrófagos e células dendríticas, como consequência, os linfócitos Ta1 induzem os macrófagos à produção de substâncias microbidas, incluindo oxigênio reativo, óxido nítrico e enzimas lisossomais, que matam a bactéria dentro dos fagossomos (Figura 2).

As bactérias fagocitadas estimulam a resposta por linfócitos T CD8⁺ quando os antígenos bacterianos ou as bactérias deixam os fagossomos e entram no citosol das células infectadas. Livres no citoplasma, as bactérias não são susceptíveis aos mecanismos microbidas (fagolisossomos) dos fagócitos, e para erradicar a infecção, as células infectadas são eliminadas por CTLs. Assim, as células efetoras da imunidade mediada por células, linfócitos T CD4⁺ e CTLs CD8⁺, agem em conjunto na defesa contra a infecção intracelular de *Salmonella* spp. A ação dos macrófagos e CTLs sobre o tecido infectado, junto com a resposta inflamatória, que ocorre nas infecções intracelulares pode causar uma lesão tecidual que muitas vezes resulta em necrose focal nos órgãos infectados por sorovares invasivos.



Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.
Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

Figura 2. Indução e ação da imunidade mediada por células. Linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ reconhecem peptídeos derivados de antígenos proteicos (bacterianos) após a apresentação por células dendríticas nos tecidos linfóides associados. Os linfócitos T são estimulados à proliferação e se diferenciam em linfócitos T efetores (e de memória) e entram em circulação. A migração de linfócitos T efetores e outros leucócitos para o local infectado ocorre inicialmente pelos vasos sanguíneos em tecidos periféricos pela ligação às células endoteliais que foram ativadas por citocinas produzidas em resposta à infecção nestes tecidos. Linfócitos T CD4⁺ efetores reconhecem o antígeno no tecido e respondem com a secreção de citocinas que recrutam mais leucócitos e ativam fagócitos para erradicar a infecção. Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) também migram para os tecidos e matam as células infectadas. Extraído de Abbas *et al.*, 2012.

A eficácia das vacinas é caracterizada pelo grau de proteção à infecção intestinal e sistêmica e as taxas de morbidade e mortalidade perante desafio de aves vacinadas. No entanto, o nível de proteção depende da estirpe desafio, a via de administração, a dose de infecção, a idade e linhagem das aves e por isso é difícil comparar estritamente a eficácia de vacinas disponíveis. Contudo a mensuração da resposta imune adaptativa ou adquirida contra um patógeno, gerada pela vacinação é uma forma de distinguir o funcionamento de cada vacina no organismo animal. A utilização de vacinas vivas tem mostrado melhores resultados, principalmente, no que tange o desenvolvimento da IMC e conseqüentemente o controle da infecção. Assim, as vacinas vivas estimulam a produção das citocinas de linfócitos Ta1, incluindo IFN- γ , IL-12, IL-1, TGF- β 4, TNF- α e IL-18, enquanto que vacinas inativadas estimulam o perfil de citocinas secretadas por Ta2, incluindo IL-4 e IL-13 (ECKMANN & KAGNOFF, 2001), que são grandes ativadores de linfócitos B, dando origem à resposta imune humoral.

Babu *et al.* (2003) demonstraram que o número de linfócitos T em aves que receberam vacina viva foi significativamente maior do que em aves que receberam vacinas inativadas. Entretanto, a resposta imune humoral também se faz necessária para a obtenção da resposta imune completa. Aves bursectomizadas, incapazes de produzir linfócitos B e imunoglobulinas, demonstraram maior excreção fecal de SE, enquanto que nos órgãos internos, os números bacterianos não diferiam entre as aves bursectomizadas e normais, indicando um importante papel da classe IgA, que é secretado diretamente na luz intestinal, impedindo a aderência da SE e conseqüentemente a invasão intestinal (ARNOLD & HOLT, 1995; DESMIDT *et al.*, 1998).

CAMPAGNARI *et al.* (2007) avaliaram a eficácia conferida por uma vacina viva comercial contra SE, na estimulação da IMC, através da quantificação de algumas citocinas. As células do baço das aves vacinadas e não vacinadas foram coletadas e cultivadas para avaliação *in vitro* da resposta imune. Os resultados mostraram um aumento na produção de IFN- γ , IL-8 e Óxido Nítrico (NO), nas células provenientes de aves vacinadas, indicando um aumento na resposta imune do

hospedeiro, uma vez que estes fatores são importantes na estimulação da resposta imune mediada por células. SEVIL DOMENECH *et al.* (2008) demonstrou que a administração de diferentes sorovares na primeira e na segunda imunização, ou seja, a utilização de vacinas heterólogas em um mesmo protocolo de vacinação leva a um aumento na resposta por linfócitos T CD8⁺.

A estirpe vacinal SG Δ cobS Δ cbiA demonstrou boa proteção contra SE e SG em estudo prévio (PENHA FILHO *et al.*, 2010). O presente estudo foi elaborado para avaliar detalhadamente a resposta imune gerada por esta vacina viva e por uma vacina inativada (bacterina comercial) em diferentes combinações, utilizadas em programas vacinais de campo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a resposta imune humoral e celular em aves vacinadas com estirpe viva atenuada de SG (SG Δ cobS Δ cbiA) e com uma vacina inativada (bacterina comercial) e desafiadas com estirpe patogênica de *Salmonella* Enteritidis.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a proteção e a eficácia de diferentes programas vacinais contra a infecção pela estirpe de SE.
- Avaliar a expressão de genes envolvidos em processos imunomodulatórios, responsáveis pela síntese de citocinas e quimiocinas.
- Avaliar a resposta imune mediada por células (linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺)
- Avaliar a resposta imune humoral (produção de IgG, IgM e IgA) antes e após o desafio por SE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aves e ensaios *in vivo*

Foram utilizadas 125 aves de variedade branca de linhagem comercial, para postura de ovos de mesa. Os experimentos foram realizados 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, Câmpus de Jaboticabal e foi autorizado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA - Protocolo n. 6236-09), seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA).

Os ensaios seguiram os modelos adotados por BERCHIERI *et al.* (2001). As aves foram alojadas dentro de salas de ambiente controlado, pressão negativa e com sistema de filtros HEPA para o ar circulante. As aves foram criadas desde o primeiro dia de vida em bateria com água, aquecimento e ração *ad libitum*. No momento da chegada, foram realizados testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Salmonella* e suabes de fundo de caixa, para pesquisa de *Salmonella* spp. nas fezes. As aves utilizadas nos experimentos apresentaram resultados negativos o isolamento de *Salmonella* spp. e anticorpos.

4.2. Estirpes bacterianas e vacinas

Para o desafio das aves, foi utilizada uma estirpe de SE fagotipo 4 (PT4) resistente ao ácido nalidíxico e à espectinomicina (SE Nal^r Spec^r), reconhecidamente patogênica e invasiva (INOUE *et al.*, 2008). A vacina viva foi constituída por estirpe atenuada de SG, resistente ao ácido nalidíxico (Nal^r), contendo parte dos genes *cobS* e *cbiA* deletados de seu genoma (SG Δ *cobS* Δ *cbiA*) e previamente estudada como estirpe vacinal em aves (PENHA FILHO *et al.*, 2010). A estirpe SG Δ *cobS* Δ *cbiA* foi elaborada no Laboratório de Ornitopatologia da FCAV-Unesp de Jaboticabal, SP e foi escolhida como estirpe vacinal devido por possuir comprovada atenuação da

virulência para aves. A vacina inativada (bacterina comercial) utilizada continha antígenos de SE PT4, PT8 e PT13a em emulsão oleosa.

4.3. Preparo dos inóculos

As culturas, para cada inóculo, foram preparadas a partir de suas respectivas estirpes (*SG Δ cobS Δ cbiA* e *SENal^fSpec^f*), semeadas em caldo Luria-Bertani (LB, Invitrogen 12780-052) e incubadas por 24h a 37°C, em agitação (100rpm). As culturas foram diluídas decimalmente em solução salina tamponada pH 7,4 (PBS). De cada diluição retirava-se 0,1mL, que era adicionado em placas contendo ágar verde brilhante (Oxoid CM0263) com novobiocina (1µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VB Nal/Nov), as quais eram incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação realizava-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias por mL de caldo LB (UFC/mL).

Para o preparo dos inóculos, cada cultura era centrifugada a 4000g x por 2 min e o sedimento bacteriano foi suspenso em PBS ajustando a concentração de cada inóculo para 10⁸UFC/mL de PBS.

4.4. Vacinação

A vacina inativada foi administrada pela via subcutânea em dose única de 0,3 mL, injetada no terço inicial do pescoço de cada ave em aves com 25 dias de vida.

A vacina viva consistia de 10⁸ UFC de *SG Δ cobS Δ cbiA* em 1mL de PBS, administrados pela via oral, direto no papo.

4.5. Desenho Experimental

Foram formados seis grupos (A, B, C, D, E e CN) contendo 20 aves cada. A vacinação foi realizada aos 5 e/ou 25 dias de vida, conforme a descrição abaixo e esquema da Tabela 1. No grupo A, as aves não foram vacinadas; no grupo B, as aves receberam uma dose de vacina viva aos 5 dias de vida; no grupo C, as aves vacinadas receberam uma dose de vacina viva aos 5 dias de vida e outra aos 25 dias de vida; no grupo D as aves foram vacinadas com uma dose de bacterina aos

25 dias de vida; no grupo E as aves foram vacinadas com vacina viva aos 5 dias de vida e com a bacterina aos 25 dias de vida. Aos 45 dias de vida, todas as aves foram desafiadas com SENal^rSpec^r, por via oral. As aves do grupo controle negativo (CN) não foram vacinadas ou desafiadas e foram utilizadas como controle negativo nos cálculos para quantificação da expressão de citocinas.

Tabela 1. Desenho experimental e esquema dos programas vacinais utilizados

Grupo	Número de Aves	1ª vacina (5 dias)	2ª vacina (25 dias)	Desafio (45 dias)
A (não vacinado)	20	-	-	SE
B (VV)	20	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> /ORAL	-	SE
C (VV+VV)	20	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> /ORAL	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> /ORAL	SE
D (BA)	20	-	Bacterina/SC	SE
E (VV+BA)	20	SGΔ <i>cobS</i> Δ <i>cbiA</i> /ORAL	Bacterina/SC	SE
CN	20	-	-	-

VV: vacina viva ; BA: vacina inativada (bacterina); SC: vacinação pela via subcutânea

Dose VV: 10⁸ UFC/ml em 1 ml de PBS.

Dose BA: 0,3 ml aplicados via SC, no terço inicial do pescoço.

4.6. Colheita de material

Um dia antes do desafio (DAI) e um, seis e nove dias após a infecção com SE (DPI), cinco aves de cada grupo foram sacrificadas para a colheita do material, pelo método de deslocamento cervical. Antes de cada sacrifício, foi colhido sangue cardíaco, para a obtenção dos soros utilizados para a pesquisa das imunoglobulinas IgM e IgG. Procedendo com uma necrópsia, as amostras de fígado, baço e tonsila cecal foram colhidas assepticamente, submergidas em nitrogênio líquido para congelamento rápido e armazenadas em freezer a -80°C até serem processadas pela técnica de extração de RNA e imuno-histoquímica. Parte do intestino foi colhida desde o divertículo de Meckel até o proctodeu na cloaca para mensuração dos níveis de IgA na mucosa intestinal. Amostras de baço e de conteúdo cecal foram colhidas e utilizadas para estimar o número de células viáveis de SE, utilizada no desafio, conforme procedimento descrito no item 4.7.

4.7. Contagem bacteriana

As amostras de baço e conteúdo cecal foram colhidas e colocadas em PBS na proporção de 1:10, maceradas (o conteúdo cecal foi homogeneizado) e diluídas decimalmente até 10^{-6} em PBS. De cada diluição, 100 μ L foi plaqueado em ágar verde brilhante contendo espectinomicina (100 μ g/mL) e ácido nalidíxico (20 μ g/mL) (VBNal/Spec). As placas foram incubadas a 37°C/24h. O número de colônias por grama de órgão foi transformado em \log_{10} para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10), era adicionado igual volume de caldo selenito contendo novobiocina (0,04%), preparado em dupla concentração (CM0263 e LP0121A, Oxoid, Reino Unido). O frasco era incubado a 37°C/24h e o seu conteúdo era semeado em VBNal/Spec, com nova incubação a 37°C/24h para a detecção de SE em quantidade menor que 10^2 UFC/g, expresso com o valor 2 nos cálculos.

4.8. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) Indireto

O método ELISA Indireto foi aplicado para mensurar a resposta imune humoral das aves vacinadas e não vacinadas, antes e após o desafio com SE, utilizando metodologia descrita por OLIVEIRA (2004). Os níveis das classes de imunoglobulinas (Ig) IgM e IgG foram mensurados no soro das aves e os níveis de IgA secretória foram mensurados no lavado da mucosa intestinal.

4.8.1. Preparo do antígeno de SE

Inicialmente foi preparada uma cultura de *Salmonella* Enteritidis em 10mL de caldo de infusão cérebro e coração (BHI – Difco 0003-17), incubado à temperatura de 37°C por 24 horas sob agitação. Após a incubação, foi retirado 5mL de cultivo e inoculado em 500mL de caldo BHI seguido de nova incubação em estufa a 37°C por

24 horas sob agitação. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 1912 Xg (centrífuga Sorvall Instrument-Dupont) à temperatura de 4°C por 30 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e os sedimentos re-suspendidos em 10mL de salina fosfatada tamponada (PBS) pH 7,4 e centrifugados a 1500 Xg à 4°C durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido quatro vezes para a lavagem do sedimento. Posteriormente, as culturas foram sonicadas (Sonicador Branson Sonifer 250), sendo submetidas a oito ciclos de \pm 85watts de potência, com intervalo de 30 segundos entre os ciclos. Os materiais sonicados foram centrifugados a 5000 Xg (centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R) por 20 minutos numa temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram armazenados à temperatura de -20°C até o momento de uso como antígenos durante o ELISA indireto.

4.8.2. Detecção de anticorpos no soro

O ELISA indireto incluiu cinco estágios, utilizando-se em quatro deles 50 μ L do reagente apropriado. Após cada estágio, os reagentes foram removidos e os poços lavados com PBS + 0,1% de Tween-20 (PBST). Inicialmente, o antígeno de SE foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, 0,3mM NaN₃) pH 9,6 na razão 1:10.000 e 50 μ L adicionado a cada poço da microplaca (Costar® 1536, Corning, EUA) a qual foi incubada à temperatura de 4°C por 18h. Na etapa seguinte, adicionou-se o tampão carbonato–bicarbonato juntamente com leite em pó desnatado (LPD - Mólico, Nestlé, São Paulo, Brasil) a 10% (100 μ L), e a microplaca incubada a 37°C por 45min para o bloqueio de ligações inespecíficas. A seguir, as amostras de soro foram adicionadas em duplicata diluídas (1:1000) em PBS + LPD 10% com incubação a 37°C por 60min. Posteriormente, foi adicionado o conjugado (IgG1 de cabra anti-IgG ou anti-IgM de galinha associado à peroxidase) diluído em PBST + LPD 10% na razão de 1:1.000 (Bethyl Laboratories, EUA), com incubação a 37°C por 60min. Finalmente, foi adicionado o substrato ortofenilamina (OPD – Akros Organics, EUA) diluído em 5,5mL de tampão citrato fosfato (0,1M C₆H₈O₇, 0,2M NaHPO) pH 4,9-5,2 acrescentado de 20 μ L de peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂) com incubação de 15min em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Ao final, as reações foram paralisadas pela adição de ácido clorídrico (HCl) 2N e era

realizada a leitura da densidade ótica (DO) das placas (iMark Microplate Reader, BioRad, EUA), em comprimento de onda de 490nm (peroxidase).

Os valores de DO de cada duplicata obtidos após a leitura das microplacas foram convertidos para valores ajustados A/P (amostra / positivo) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$A/P = \frac{(DO \text{ amostra teste} - DO \text{ controle negativo})}{(DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo})}$$

4.8.3. Detecção de IgA secretória no lúmen intestinal

Solução de conservação de proteínas (PBS contendo 0,02% de azida de sódio, 1% de soroalbumina bovina, 1mM de fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF) e 5mM de ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) (SIGMA Aldrich) foi preparada e 3 mL de solução a 4°C foram infundidos no lúmen do intestino colhido de cada ave. Todo fluído do intestino foi coletado em um tubo cônico de 15mL e centrifugado à 400g x durante 30min. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi utilizado para a detecção de IgA secretada na mucosa intestinal. O ELISA Indireto foi realizado como descrito no item 4.7.1. Contudo, para sensibilizar as placas o antígeno de SE foi diluído a 1:2.500, as amostras de lavado intestinal foram aplicadas no lugar do soro, sendo diluídas na razão 1:25 e o anticorpo secundário IgG1 de cabra anti-IgA de galinha conjugado à peroxidase (Bethyl Laboratories, EUA) foi utilizado na razão de 1:800.

4.9. Imuno-histoquímica

Amostras de fígado e tonsila cecal de três aves de cada grupo foram utilizadas para estimar a população de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺ nos momentos estudados. Amostras congeladas incorporadas em reagente crioprotetor (TissueTek[®], OCT, Sakura, EUA) foram usados para preparar seções de tecido congelado (10µm) em um micrótomo criostato a -20°C (CM1950; Leica Microsystems, Alemanha). Os cortes foram fixados em acetona gelada durante 10

min antes de serem utilizados para a imuno-histoquímica. Inicialmente, as lâminas foram secas ao ar, e os cortes foram incubados com solução de peróxido de hidrogênio 3% durante 10 min em temperatura ambiente. Depois de lavar as lâminas durante 10min com PBS, os cortes foram bloqueados com solução Protein Block[®] (Dako, EUA) durante 20 min à temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram incubadas por 18h a 4°C com os anticorpos monoclonais anti-CD8⁺ ou anti-CD4⁺ de galinha diluídos na razão 1:100 (8255-01 e 8220-01, Southern Biotechnology, EUA). Após incubação, as lâminas foram lavadas com PBS durante 10 min e incubadas durante 1h com reagente Envision-HRP[®] (Dako, EUA). A reação de coloração foi desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Merck; Alemanha). Nos controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por solução de soroalbumina bovina 1%. Para cada corte, cinco regiões de interesse foram aleatoriamente fotografadas em microscópio de luz (Eclipse E200, Moticam 2300; Nikon, Japão). A porcentagem de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ marcados foi calculada com o software de análise de imagem (ImageProPlus; MediaCybernetics, EUA).

4.10. Quantificação de genes envolvidos nas respostas imunes contra a infecção por *Salmonella* Enteritidis

4.10.1. Extração de RNA total e Transcrição Reversa para preparo da fita de DNA complementar (cDNA)

Amostras congeladas de baço e tonsila cecal foram trituradas e 30mg de cada órgão foram utilizados para a extração em coluna do RNA total com o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas em reagente de lise celular em microtubos de 1,5mL, o conteúdo do microtubo foi centrifugado a 4000g x por 1 min na coluna fornecida, lavado e tratado com DNase Set (Qiagen, Alemanha). Após esta etapa, o RNA total foi eluído em água livre de RNase e a concentração foi avaliada pelo Espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific, EUA). As amostras com valores acima de 2,00 na razão 260nm/280nm foram analisadas em gel de agarose

para verificar a integridade das bandas 28S e 18S. Em seguida, 1 µg de RNA total foi usado para sintetizar o cDNA utilizando o kit para Transcrição Reversa (QuantiTect[®], Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Após este passo, o cDNA foi armazenado em -20°C, até a utilização para quantificar as quimiocinas e citocinas.

4.10.2. Eletroforese em gel de agarose para avaliação do mRNA

As amostras de RNA total com leituras da razão 260/280nm maiores que 2, e da razão 260/230nm maior que 1,8 foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose. Cada amostra de RNA foi submetida á eletroforese em gel de agarose com solução desnaturante. O tampão desnaturante foi preparado com 20,6 g do reagente 3-N-morfolino ácido propanosulfônico (MOPS 5X), 800mL de solução de Acetato de Sódio 0,05 M, 10 mL de solução de EDTA 0,5 M pH 8,0 e 10 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2N para ajustar o pH a 7,0 e então o volume era completado até 1 L com água com 0,1% de Dietilpircarbonato (DEPC).

O gel foi preparado para cuba de eletroforese de 30mL contendo 0,5% de agarose, 5,4 mL de Formaldeído 2,2 M, 18,6 mL de Água DEPC, 6 mL de solução MOPS 5X.

A amostras foram eluídas em 10 µL de solução preparada com 1mL de solução desnaturante, 1,77mL de formaldeído 10%, 2,23 mL de água DEPC, 5 mL de formamida destilada 50% e brometo de etídeo (0,5mg/mL).

A qualidade das amostras foi avaliada de acordo com integridade e tamanho das bandas de RNA ribossômico (rRNA). Apenas amostras com presença das bandas 28S e 18S na razão de 2:1 foram utilizadas para preparo do cDNA.

4.10.3. PCR quantitativo em tempo real

O PCR em tempo real foi realizado em reações com volume final de 25µL contendo: (1) 50ng de cDNA ajustados em 2µL; (2) 0,5µM de iniciadores 5'; (3) 0,5µM de iniciadores 3'; (4) 12,5 µL de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (Fermentas, ThermoScientific, EUA) contendo 2,5mM de MgCl₂; (5) 0,2 µL (5 unidades/µL) de Platinum Hot Start Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Sciences,

USA) completando com água até 25 µL. A sequência dos pares de iniciadores e a temperatura de anelamento (TA) estão disponíveis na Tabela 2. Os pares de iniciadores utilizados foram baseadas em descrições da literatura ou desenhadas a partir de sequências gênicas do Genbank.

O padrão térmico utilizado no termociclador para a PCR em tempo real foi constituído por uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por cinco min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15s, TA por 30s (Tabela 2) e 72°C por 30s, seguidos de leitura da fluorescência da placa entre cada ciclo. Após a amplificação, a curva de dissociação dos produtos da PCR foram analisadas entre 65°C a 95°C, com incrementos de 0,2°C entre as leituras. Os valores da linha de corte (*Crossing points* - Cp) na curva de amplificação da fluorescência foram usados para quantificar a expressão relativa de cada gene em relação ao gene normativo 18S de cada amostra. O valor de alteração da expressão gênica de cada ave foi calculado em comparação com aves do grupo CN (não vacinado e não desafiado) pelo método $2^{-\Delta\Delta C_p}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2. Referência dos iniciadores utilizados para a quantificação de citocinas por PCR em tempo real

Gene alvo	Iniciadores	Referência dos iniciadores
18S	F 5'-CATGGCCGTTCTTAGTTGGT-3' R 5'-GGCGTAGGGTAGACACAAGC-3'	desenhado
TNFSF15	F 5'-GCTCGTACGCCAATTGCC-3' R 5'-CAGTAAAAGGCACCGAAGAA-3'	PARK et al. (2007)
IFN-γ	F 5'-AGCTGACGGTGGACCTATTATT-3' R 5'-GGCTTTGCGCTGGATTTC-3'	HONG et al. (2006)
IL-6	F 5'-CAAGGTGACGGAGGAGGAC-3' R 5'-TGGCGAGGAGGGATTCT-3'	HONG et al. (2006)
IL-10	F 5'-CGGGAGCTGAGGGTGAA-3' R 5'-GTGAAGAAGCGGTGACAGC-3'	HONG et al. (2006)
TGF-β4	F 5'-CGGGACGGATGAGAAGAAC-3' R 5'-CGGCCACGTAGTAAATGAT-3'	HONG et al. (2006)
CCL4	F 5'-GTGCCCTCATGCTGGTGT-3' R 5'-GGTTGGATGCGGATTATTTC-3'	HONG et al. (2006)
IL-12 p40	F 5'-TGGTCCACGCTTTGCAGAT-3' R 5'-AAGGTTAAGGCGTGGCTTCTTA-3'	CARVAJAL et al. (2008)

F: Forward, R: Reverse

4.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism versão 5. Para avaliar a diferença nos valores obtidos foi utilizado o método de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, para avaliar a diferença entre cada grupo, ao nível de 5% de significância. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Contagem bacteriana

A contagem bacteriana no conteúdo cecal e em amostras de baço foi realizada para avaliar a eficácia de cada programa vacinal no que tange a diminuição da carga bacteriana nos órgãos avaliados em comparação com as aves não vacinadas do grupo A. Os resultados da contagem bacteriana estão dispostos na Figura 3. No 1º DPI, SE foi detectada nas amostras de baço dos grupos A, B e E, somente após o enriquecimento, porém os números não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$). Aos 6 DPI, A estirpe desafio foi recuperada em amostras de baço em todos os grupos. A carga bacteriana no grupo E foi significativamente reduzida em comparação com o grupo A. Aos 9 DPI, o número de SE no baço das aves de todos os grupos diminuiu e os valores não diferiam estatisticamente ($p > 0,05$). No 1º DPI, aves dos grupos vacinados tinham quantidades significativamente menores da estirpe desafio no conteúdo cecal em comparação às aves do grupo A ($p < 0,05$). Aos 6 e 9 DPI os grupos vacinados B, C e E, tinham quantidades significativamente menores de SE, enquanto no grupo D, onde as aves receberam uma única dose de vacina inativada, não teve diferença com o grupo não vacinado. No entanto, aos 9 DPI não houve diferença significativa entre os grupos vacinados ($p > 0,05$).

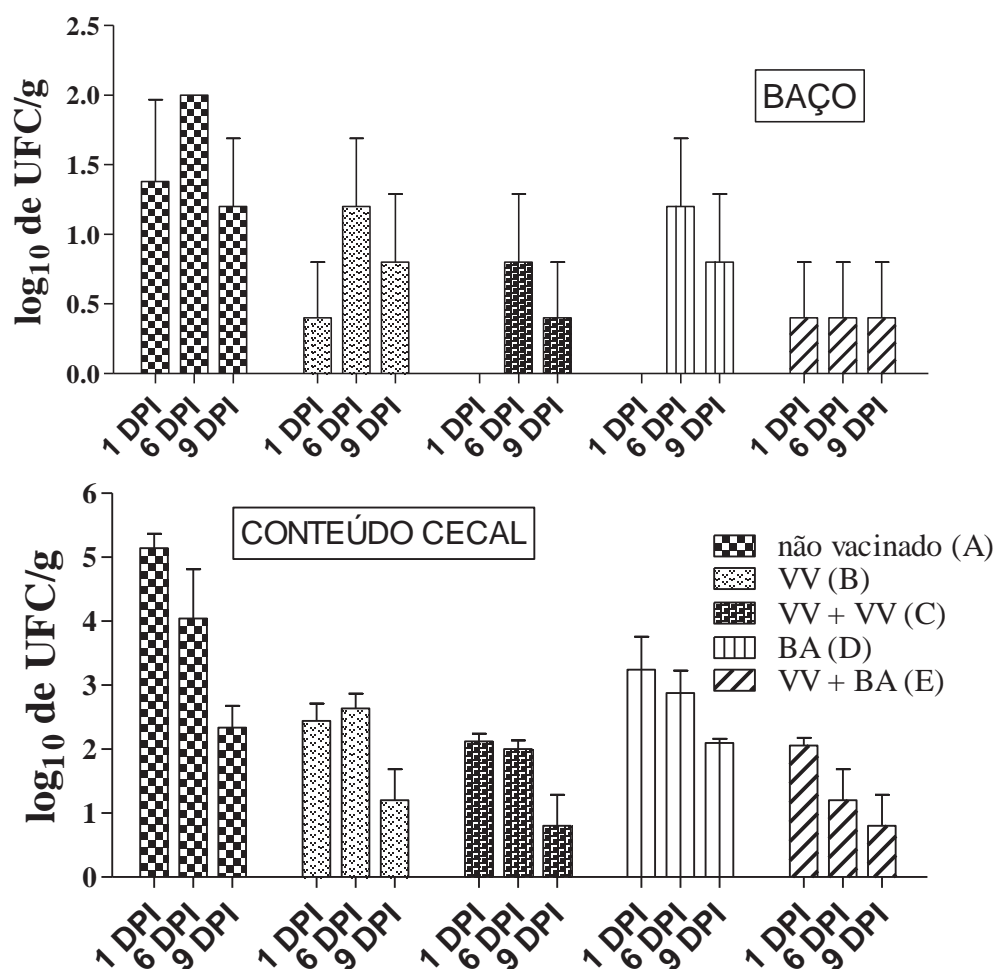


Figura 3. Contagem bacteriana de SE em amostras de baço e de conteúdo cecal após o desafio de aves não vacinadas (grupo A) e vacinadas (grupos B, C, D e E) expressos em log₁₀ de UFC/g de amostra. Às amostras positivas somente após o enriquecimento, o valor 2 foi atribuído para os cálculos. Dados representam a média ± Desvio Padrão (DP) de 5 aves por grupo. Análise estatística entre colunas do mesmo DPI. *, p<0.05; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

5.2. Mensuração de anticorpos no soro

Os anticorpos anti-SE, IgM e IgG estavam em níveis mais elevados nos grupos D e E, no mínimo em três momentos da análise. Nestes grupos, os níveis de IgM aumentaram após o desafio, até 6 DPI. Aos 9 DPI, os níveis desta imunoglobulina diminuíram, mas no grupo E ainda eram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Nos grupos A, B e C, os níveis de IgM foram baixos em todas as amostragens, demonstrando tendência para aumentar aos 9 DPI, em aves vacinadas nos grupos C e em aves não vacinadas no grupo A (Figura 4). Os níveis de IgG (Figura 4) estavam significativamente mais altos em aves que receberam uma dose da vacina inativada (grupos D e E), mesmo antes do desafio, se mantendo elevados em todos os momentos. Aves que receberam apenas a vacina viva, nos grupos B e C e aves não vacinadas do grupo A demonstraram níveis mais baixos de IgG, com tendência de aumento aos 6 DPI, permanecendo significativamente mais baixos que nos grupos D e E ($p < 0,05$).

5.3. Níveis de IgA secretada no lúmen intestinal

Os níveis de IgA, demonstrados na Figura 4, foram semelhantes em todos os grupos ao 1º DAI. Após o desafio, os grupos D e E, mostraram um aumento significativo nos níveis de IgA até 6 DPI ($p < 0,05$). Aos 9 DPI, os níveis de IgA estavam diminuídos, porém no grupo E ainda era significativamente maior que os outros grupos ($p < 0,05$). As aves que receberam apenas vacina viva, nos grupos B e C, demonstraram níveis crescentes de IgA após o desafio até 9DPI. Nas aves não vacinadas (grupo A) foi notado apenas um nível basal de IgA, com um pequeno aumento aos 6 DPI.

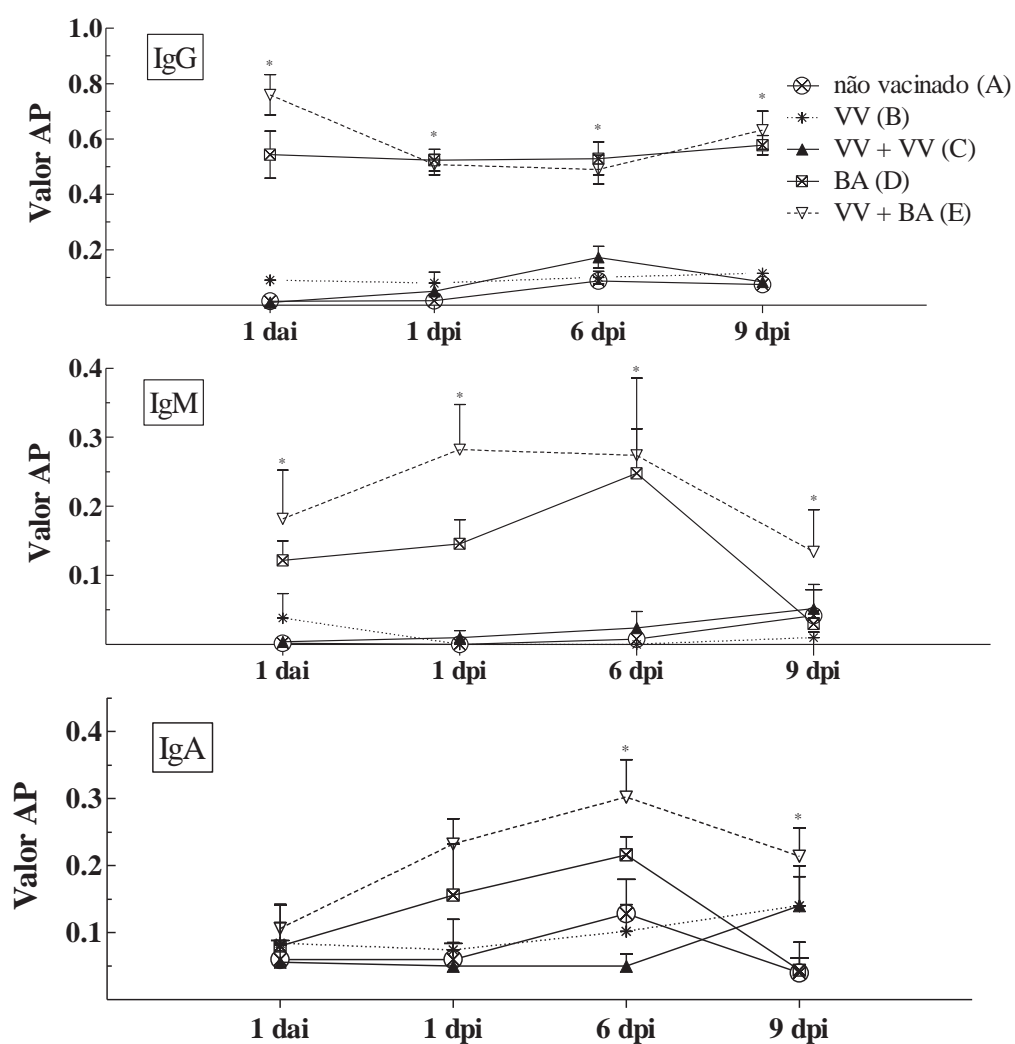


Figura 4. Níveis de IgG e IgM no soro e de IgA no lúmen intestinal em aves não vacinadas (grupo A) e vacinadas (grupos B, C, D e E) antes (1DAI) e após o desafio (1DPI, 6DPI e 9 DPI). Os dados representam a média dos valores AP \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

5.4. Quantificação de citocinas produzidas no baço e tonsila cecal

5.4.1. Extração de RNA total

As amostras de RNA total com leituras da razão 260/280nm maiores que 2, e da razão 260/230nm maior que 1,8 foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose. Cada amostra de RNA foi submetida á eletroforese em gel de agarose com

tampão MOPS 10X. As amostras de boa qualidade devem apresentar duas bandas de RNA ribossômico (rRNA) visíveis. A banda mais pesada 28S tem o dobro de espessura da banda 18S. A razão de 2:1 (28S:18S) sobre a espessura das bandas visíveis no gel, foi utilizada para avaliar da integridade do RNA extraído.

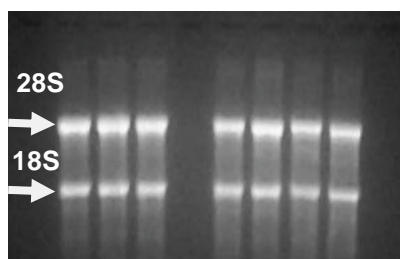


Figura 5. Gel de agarose demonstrando a qualidade da extração do RNA total com presença das bandas 28S e 18S na proporção 2:1. VV: vacina viva; BA: bacterina.

5.4.2. Quantificação da expressão de mRNA transcriptores de citocinas

Os níveis de transcrição das citocinas foram avaliados antes e após o desafio das aves. A quantificação de IL-12 no baço e nas amostras de tonsilas cecais (Figura 6) mostraram que todos os grupos vacinados tinham níveis significativamente maiores desta citocina antes do desafio, quando comparados ao grupo não vacinado ($p < 0,05$). Após o desafio, a produção desta citocina foi significativamente diminuída em amostras de tonsilas cecais e os níveis não foram diferentes entre os grupos vacinados e o grupo não vacinado ($p > 0,05$). Os níveis de IFN- γ se mostraram significativamente aumentados nos grupos vacinados em comparação com o grupo não vacinado, no baço e tonsila cecal (Figura 7), antes do desafio. Em amostras de tonsila cecal, a produção de IFN- γ se mostrou significativamente aumentada nos grupos C e E, do 1º DAI até o 6º DPI no grupo E, em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$). A citocina IL-10 teve a expressão aumentada em amostras de baço em todos os grupos vacinados em comparação com o grupo que foi apenas desafiado (grupo A) em 1 DAI ($p < 0,05$). Após o desafio, no 1 DPI, a expressão desta citocina no baço diminuiu significativamente em todos os grupos, exceto no grupo D. Nas tonsilas cecais, os níveis de IL-10 foram maiores nos grupos C e E antes do desafio, com um pico aos 6 DPI no grupo E (Figura 8).

Na Figura 9, pode-se notar que a citocina antiproliferativa e anti-inflamatória TGF- β foi menos expressa após o desafio, ocorrendo um leve aumento na expressão dessa citocina aos 9 DPI em amostras de baço no grupo B. Em amostras de tonsila cecal do grupo C, que recebeu duas doses de vacina viva inativada (VV+VV), a expressão dessa citocina estava aumentada em todos os momentos avaliados.

Os resultados da expressão de TNFSF15 em baço e tonsila cecal das aves, encontram-se na Figura 10. Novamente pode ser notado uma diminuição na expressão dessa citocina em ambos órgãos avaliados, após o desafio. No entanto, no grupo C e no grupo E, ocorreu um aumento na produção dessa citocina no baço das aves, antes do desafio.

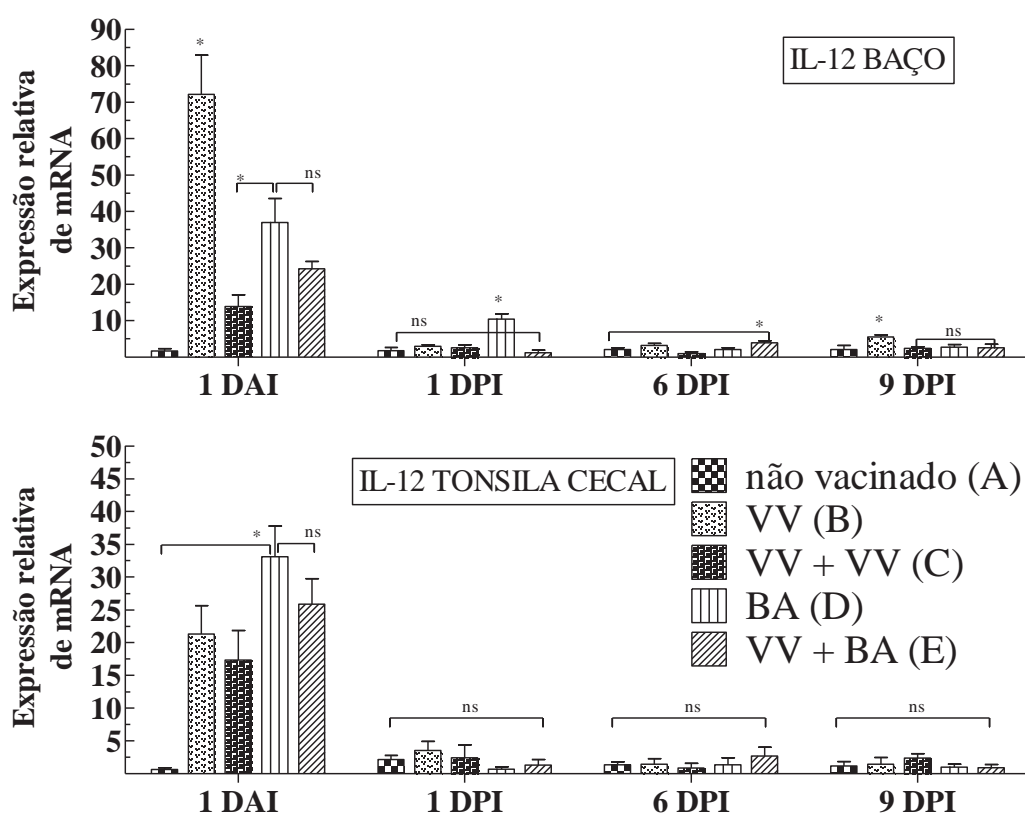


Figura 6. Quantificação relativa da expressão de IL-12 em amostras de baço e de tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI e 9 DPI). Dados representam a média \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

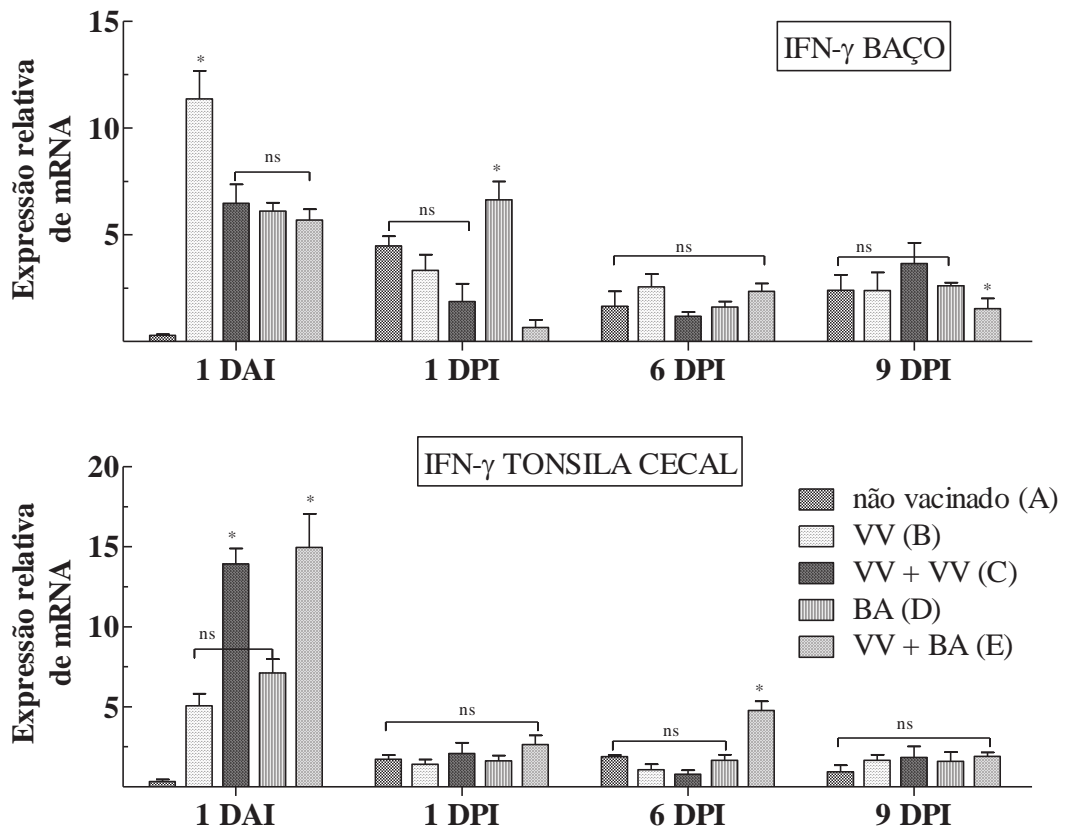


Figura 7. Quantificação relativa da expressão de IFN- γ em amostras de baço e de tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI, 9 DPI). Dados representam a média \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

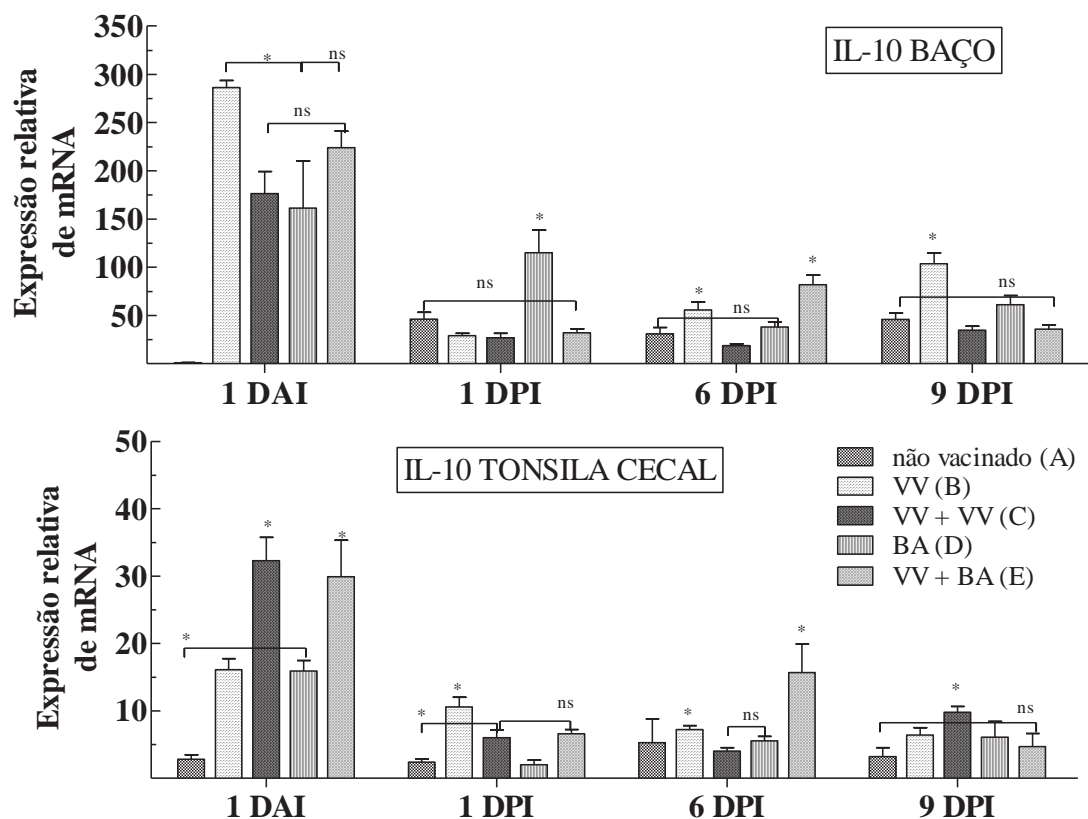


Figura 8. Quantificação relativa da expressão de IFN- γ em amostras de baço e de tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI, 9 DPI). Dados representam a média \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

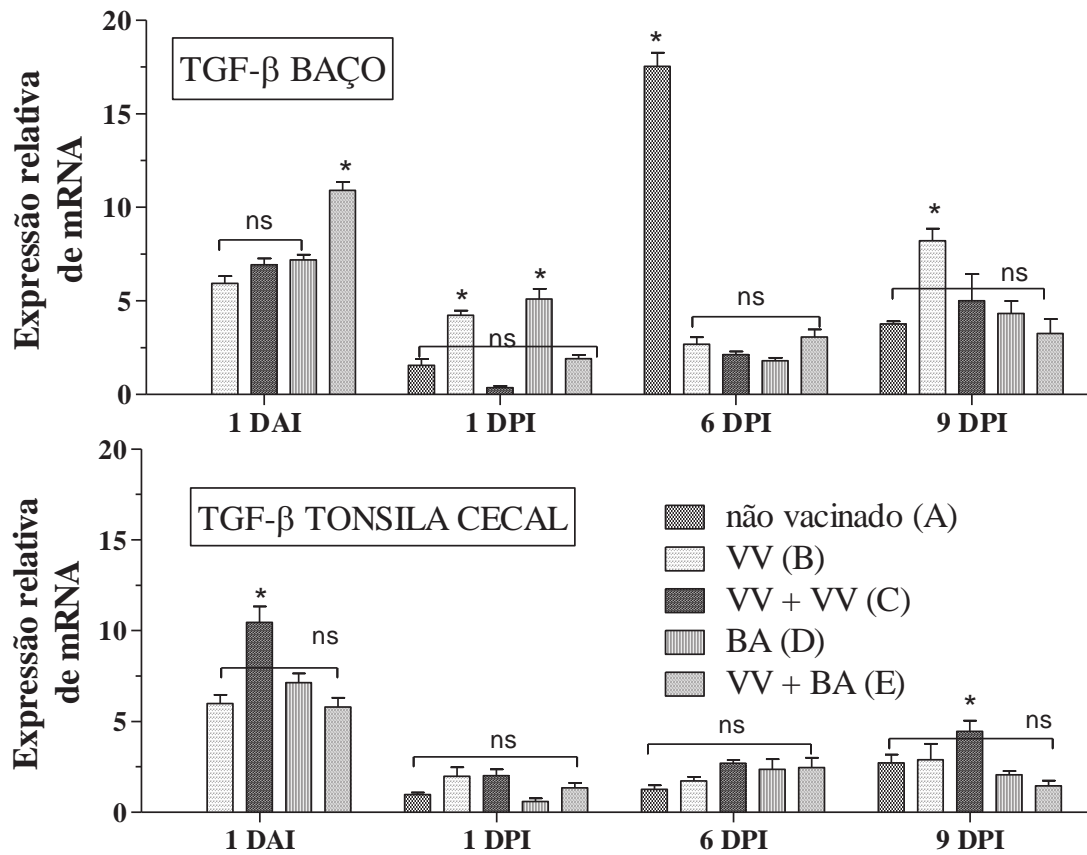


Figura 9. Quantificação relativa da expressão de TGF- β em amostras de baço e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI, 9 DPI). Dados representam a média \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

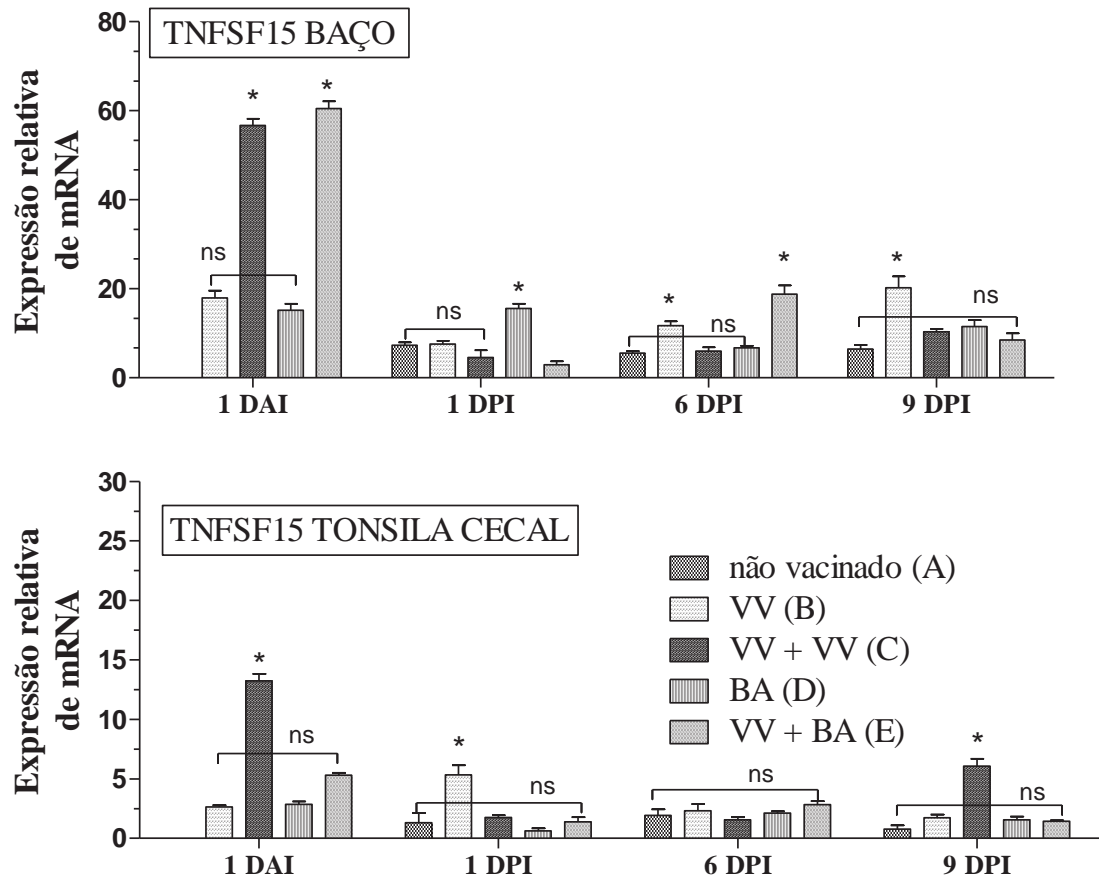


Figura 10. Quantificação relativa da expressão de TNFSF15 em amostras de baço e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI, 9 DPI). Dados representam a média \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

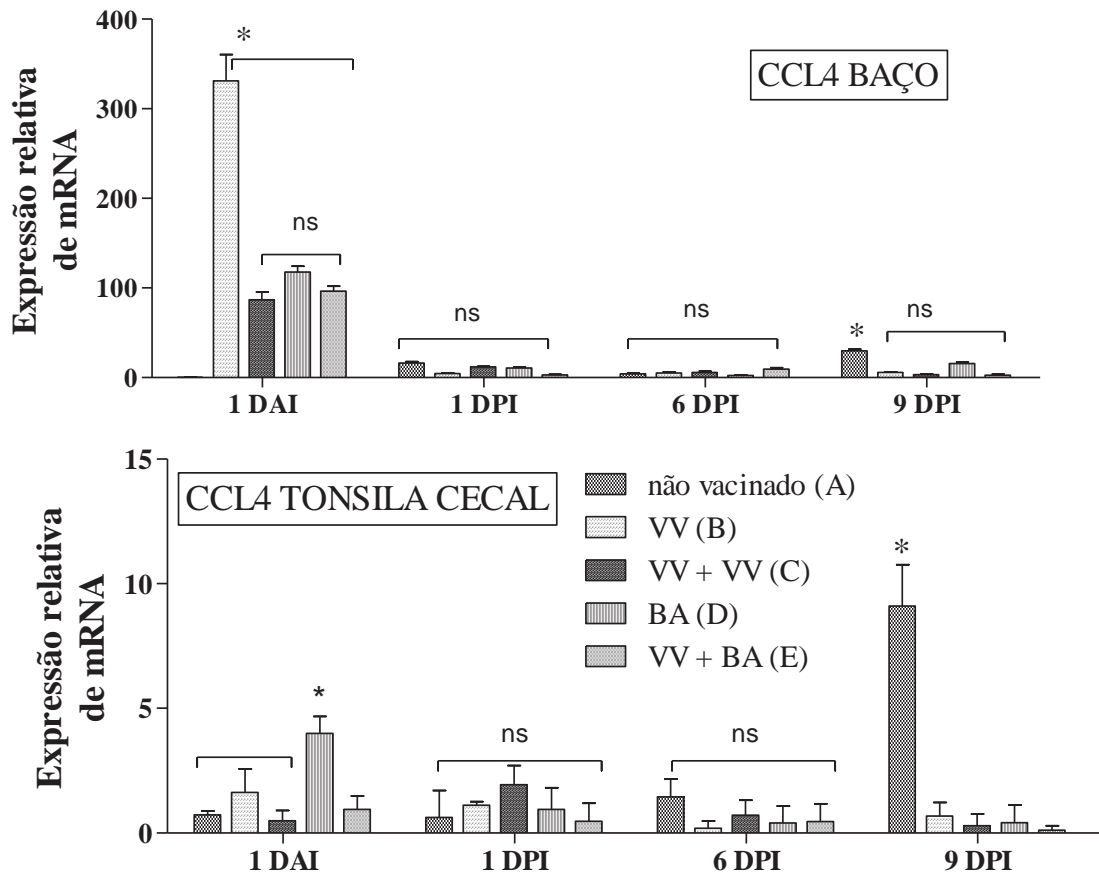


Figura 11. Quantificação relativa da expressão de CCL4 em amostras de baço e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI, 9 DPI). Dados representam a média \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

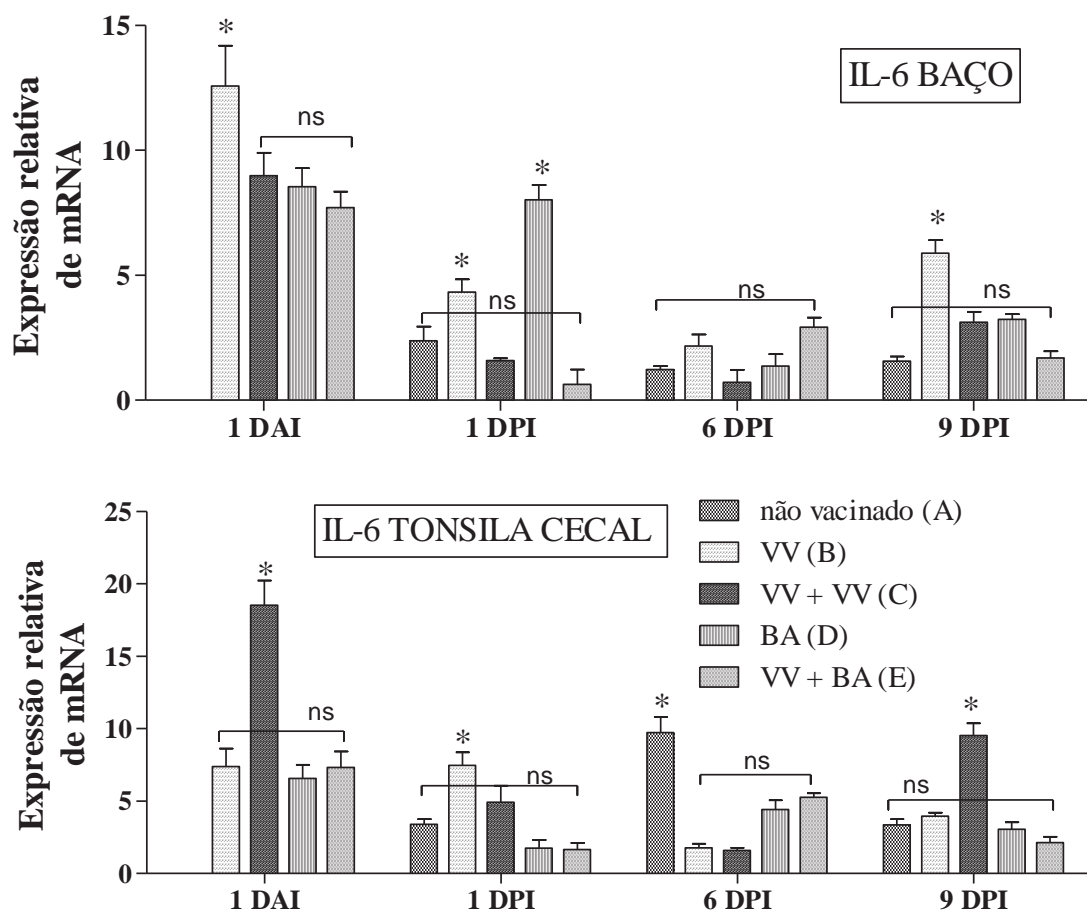


Figura 12. Quantificação relativa da expressão de IL-6 em amostras de baço e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1 DPI, 6 DPI, 9 DPI). Dados representam a média \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

5.5. Avaliação do fluxo de linfócitos T CD8⁺

O recrutamento de linfócitos T CD8⁺ foi analisado pelo método de imunohistoquímica em amostras de fígado e de tonsila cecal. As porcentagens de áreas marcadas estão na Figura 13. Antes do desafio, todos os grupos tinham baixa quantidade de linfócitos T CD8⁺ nas amostras de tonsilas cecais. Ao 1 DPI, o fluxo de linfócitos T CD8⁺ aumentou em todos os grupos, incluindo o grupo A (não vacinado). Aos 6 DPI, a população de células CD8⁺ estava significativamente maior no grupo A e no grupo C ($p < 0,05$). Aos 9 DPI, os grupos B e C demonstraram a maior quantidade de linfócitos T CD8⁺ ($p < 0,05$), detectados nas amostras de tonsilas cecais. Enquanto nos grupos vacinados D e E os níveis de linfócitos T CD8⁺ eram significativamente mais baixos, semelhantes ao grupo A. Linfócitos T CD8⁺ estavam presentes ao 1 DAI, em amostras de fígado, embora, apenas nos grupos B, C e E, os níveis foram significativamente diferentes do grupo controle (A). Após o desafio, o fluxo de linfócitos T CD8⁺ no fígado aumentou em todos os grupos. De 1 DPI a 9 DPI, o grupo A demonstrou constantemente a maior quantidade de áreas marcadas no fígado, enquanto os valores do grupo D foram constantes e não tiveram aumento significativo durante este período. Aos 6 DPI, a quantidade de células T CD8⁺ não foi diferente entre os grupos vacinados ($p > 0,05$). Entretanto, aos 9 DPI, os grupos B e C tinham números significativamente maiores de linfócitos T CD8⁺ no fígado do que os grupos D e E.

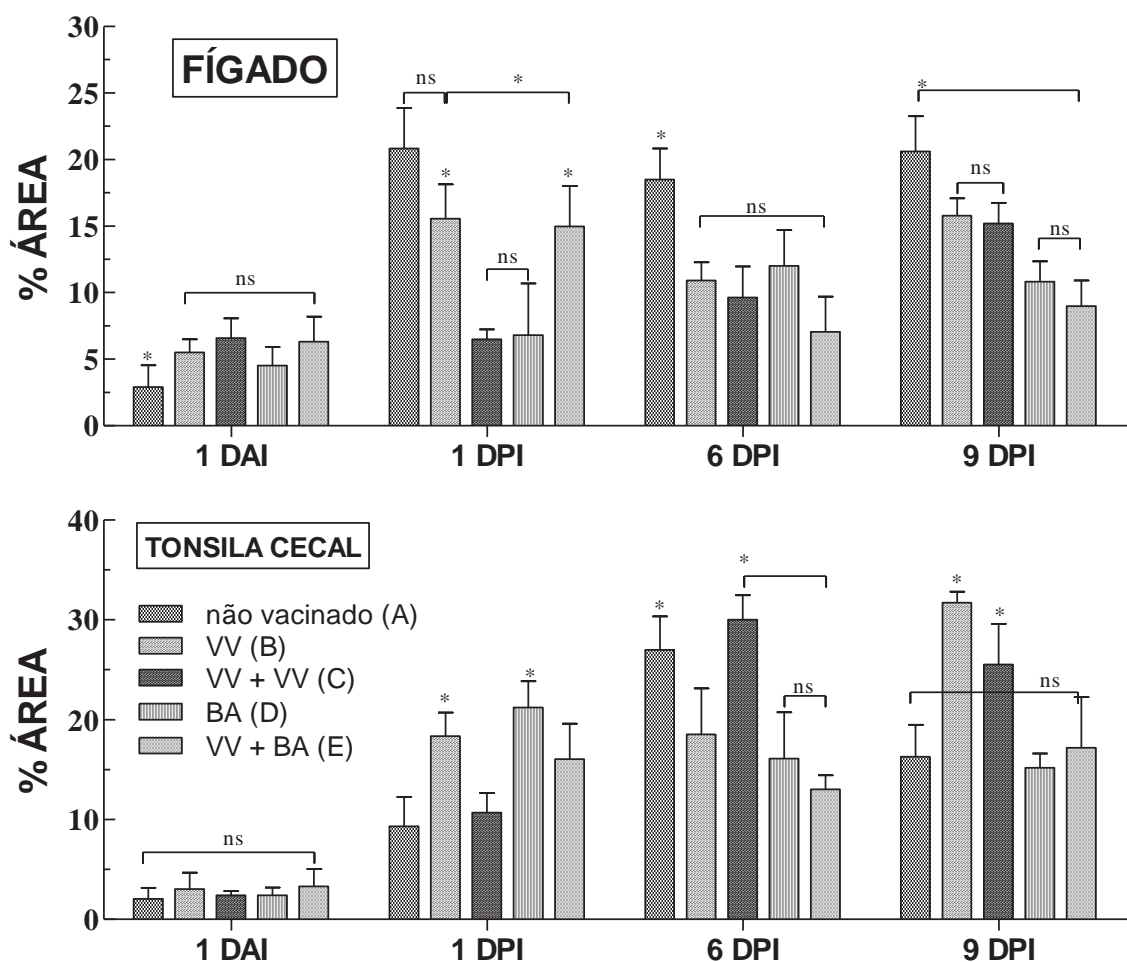


Figura 13. Quantificação de linfócitos T CD8⁺ marcados por imuno-histoquímica em cortes de fígado e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1, 6 e 9 DPI). Colunas representam a média da porcentagem de áreas marcadas \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bactéria.

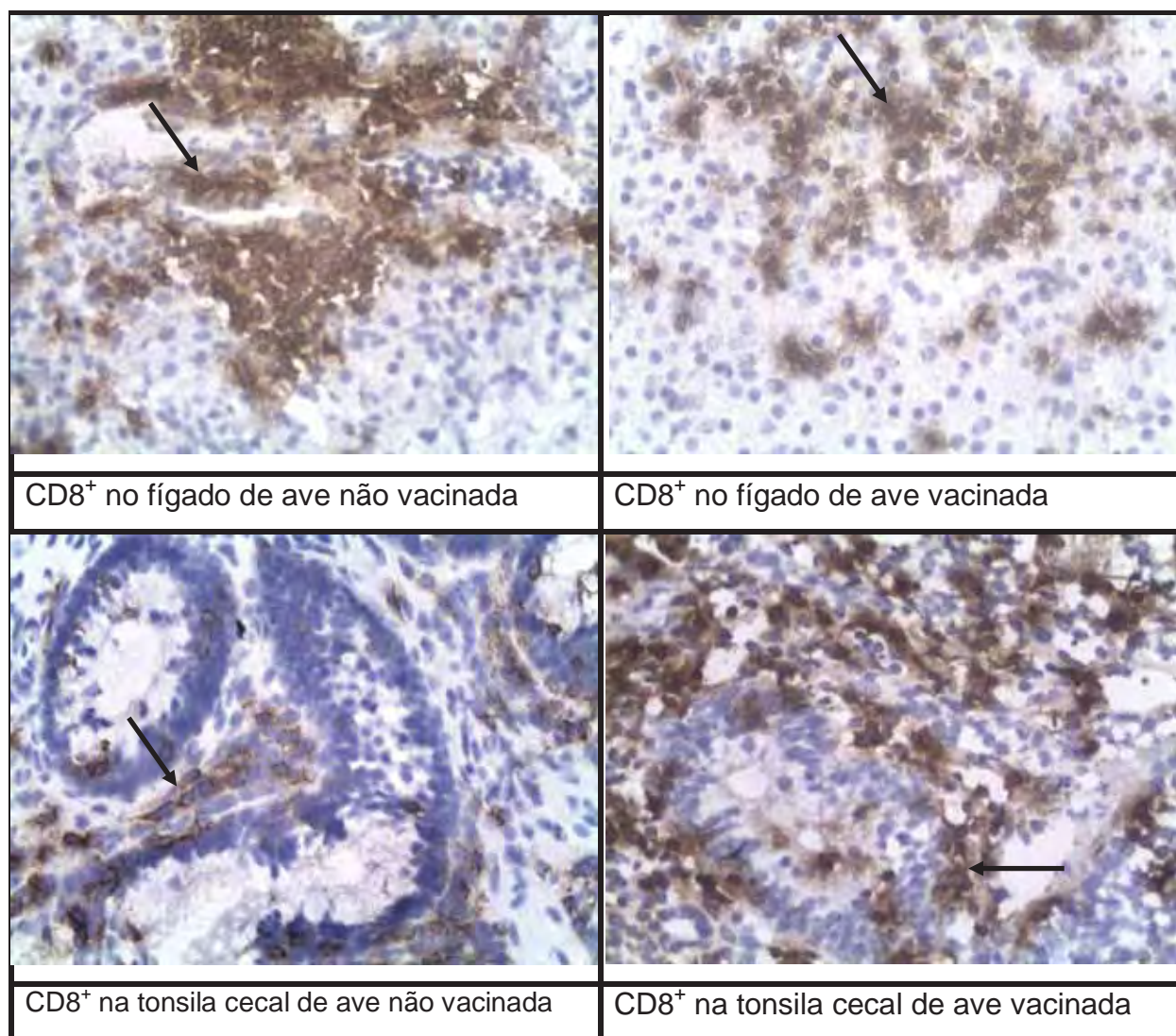


Figura 14. Detecção do infiltrado de linfócitos T CD8⁺ em amostras de fígado e tonsila cecal de aves não vacinadas (Grupo A) e aves vacinadas pelo método de Imuno-histoquímica. Fotos em aumento 40X.

5.6. Avaliação do fluxo de linfócitos T CD4⁺

O infiltrado por linfócitos T CD4⁺ avaliados por imuno-histoquímica em amostras de fígado e de tonsila cecal estão nas figuras 15 e 16. A quantificação do infiltrado e as porcentagens de áreas marcadas estão na Figura 15. Após o desafio por via oral, ocorreu um aumento no fluxo de linfócitos T CD4⁺ para a mucosa

intestinal do ceco em todos os grupos, demonstrado nas amostras colhidas no 1 DPI, 6 DPI e 9 DPI. Em amostras de fígado, se nota a maior quantidade de linfócitos T CD4⁺ no 6 DPI nas aves do grupo E, que receberam vacinação heterogênea. Neste mesmo período, a maior quantidade de linfócitos T CD4⁺ em amostras de tonsila cecal foram notadas nas aves do grupo C, que receberam duas doses da vacina viva. No 9 DPI, a quantidade de linfócitos T CD4⁺ em amostras de tonsila cecal, foi maior nos grupos não vacinado (A) e no grupo que recebeu apenas a vacina viva (grupo B).

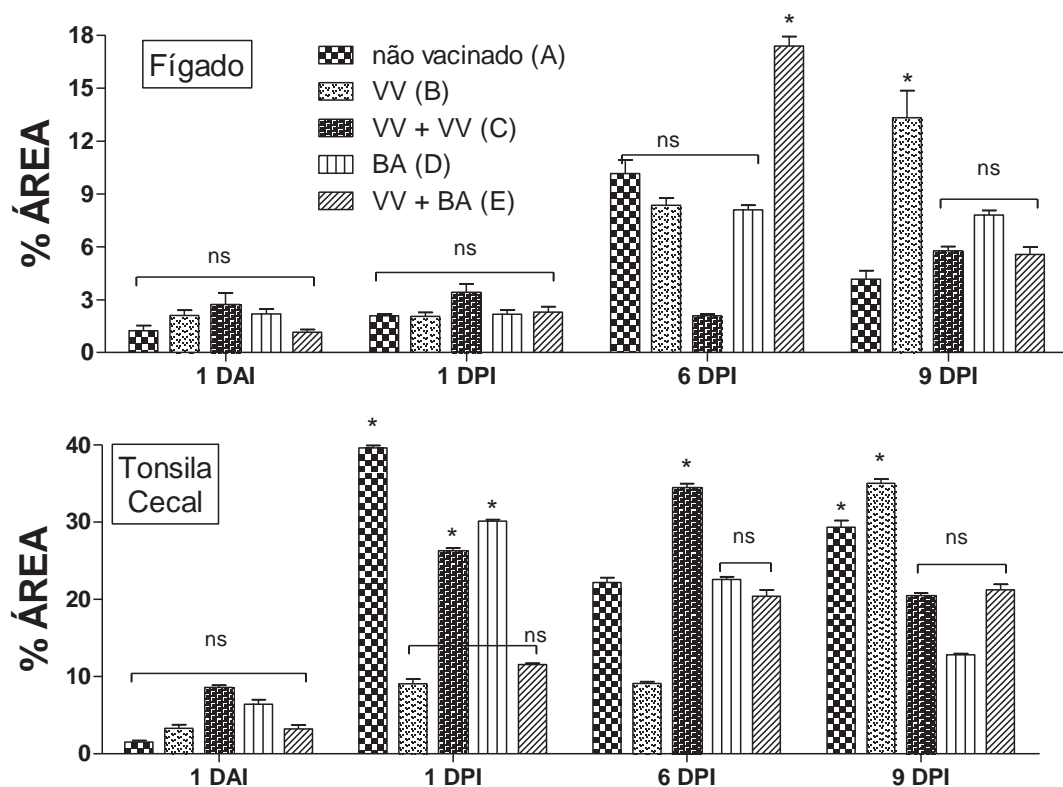


Figura 15. Quantificação de linfócitos T CD4⁺ marcados por imuno-histoquímica em cortes de fígado e tonsila cecal de aves não vacinadas (grupo A) e aves vacinadas (grupos B, C, D e E), antes (1 DAI) e após o desafio (1, 6 e 9 DPI). Colunas representam a média da porcentagem de áreas marcadas \pm DP de 5 aves por grupo. *, $p < 0.05$; ns, não significativo. VV: vacina viva; BA: bacterina.

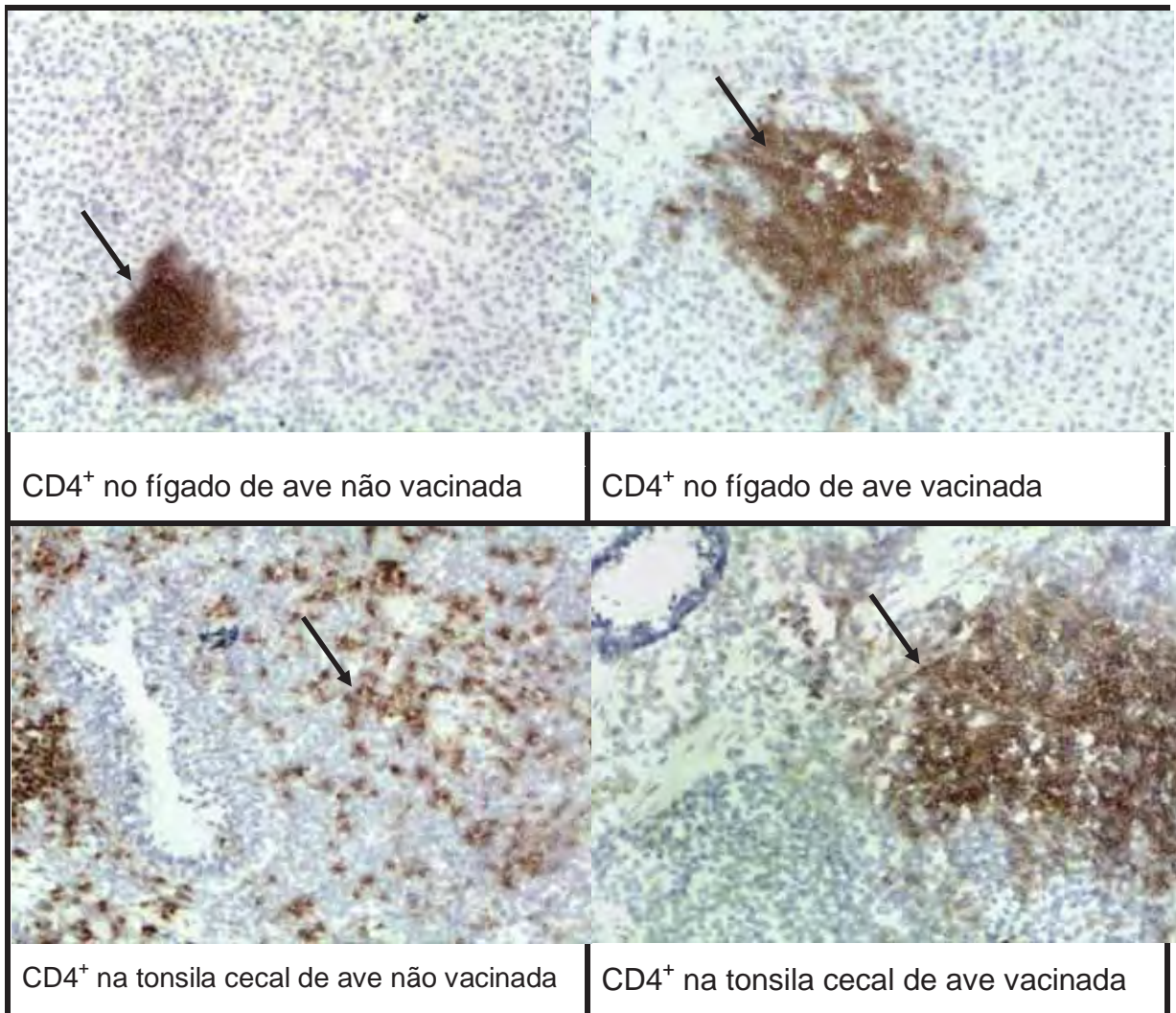


Figura 16. Detecção do infiltrado de linfócitos T CD4⁺ em amostras de fígado e tonsila cecal de aves não vacinadas (Grupo A) e aves vacinadas pelo método de Imuno-histoquímica. Fotos em aumento 20X.

6. DISCUSSÃO

As vacinas contra *Salmonella* spp. tem sido amplamente utilizadas em vários países com produção avícola industrial. Estudos sobre a influência de vacinas vivas e inativadas na resposta imune de galinhas comerciais são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos mais importantes. O atual estudo comparou a resposta imune em galinhas submetidas a diferentes programas vacinais, aplicáveis a campo e as alterações desta resposta após o desafio das aves por SE.

Considerando estirpes vacinais de *Salmonella* spp. capazes de invadir e infectar o hospedeiro sem causar doença, os mecanismos imunes que desencadeiam após a inoculação oral, seriam similares à resposta contra a infecção pela estirpe patogênica. A estirpe atenuada de SG ($SG\Delta cobS\Delta cbiA$) utilizada neste estudo é capaz de invadir o organismo hospedeiro pelo intestino e de colonizar os órgãos internos de forma semelhante à estirpe selvagem (PENHA FILHO *et al.*, 2010). Dessa forma, a vacinação com $SG\Delta cobS\Delta cbiA$ estimulou uma resposta imune eficaz e foi capaz de reduzir a presença da estirpe desafio nas aves vacinadas (Figura 3). No entanto, as discussões sobre o uso de vacinas para o controle de *Salmonella* spp. sempre foram controversas. Enquanto vacinas vivas são questionadas sobre reversão da virulência, as vacinas inativadas são frequentemente descritas como fracas estimuladoras da imunidade mediada por células. No entanto, em experimentos realizados a campo, o controle da infecção por *Salmonella* spp. em lotes de aves comerciais pode ser atribuído à utilização de vacinas inativadas junto com outras medidas de segurança (DAVISON *et al.*, 1999; BERGHAUS *et al.*, 2011). Como pode ser visto neste estudo e em experimentos anteriores, as bacterinas são fortes estimuladoras da imunidade humoral, no entanto as evidências mostram que os anticorpos são ineficazes para controlar a infecção por *Salmonella* spp. sem o auxílio da resposta imune celular (BABU *et al.*, 2004; BEAL *et al.*, 2006; CHAPPELL *et al.*, 2009).

Nos grupos em que as aves receberam apenas a vacina viva (grupos B e C), o fluxo de linfócitos T CD8⁺ para as tonsilas cecais foi significativamente estimulado após o desafio com a estirpe patogênica de SE. A combinação da vacina viva com a bacterina comercial (grupo E) apresentou comportamento diferente. Os níveis de

linfócitos T CD8⁺ que migraram para a tonsila cecal foram mais baixos, com um perfil similar ao visto no grupo D, em que as aves foram vacinadas apenas com a vacina inativada.

A avaliação da expressão de citocinas após a vacinação das aves com diferentes combinações de vacinas antes do desafio, revelou que a utilização da vacina inativada (Grupo D), também estimulou a produção de IFN- γ no baço, nos mesmos níveis que os grupos C (VV+VV) e E (VV+BA), que receberam duas doses de vacinas. De fato, a produção de IFN- γ , reconhecido por ser eficaz contra a infecção e a invasão bacteriana, também pode ser estimulada por células mortas de bactérias, flagelina purificada, lipopolissacarídeo (LPS), ou mesmo RNA bacteriano (OKAMURA *et al.*, 2004; AYRES & VANCE, 2012). No entanto, o local onde ocorre a produção das citocinas é um elemento essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz. As infecções paratíficas por SE, na maioria dos casos, são restritas ao trato intestinal e o controle da invasão bacteriana deve ocorrer principalmente no intestino e no tecido linfóide associado ao intestino (TLAI), como as tonsilas cecais. Considerando este fato, a maior produção de IFN- γ na tonsila cecal foi observada nos grupos C e E (Figura 7). Embora após o desafio a expressão de IFN- γ tenha diminuído em todos os grupos, pode-se notar um novo pico desta citocina no grupo E com 6 DPI. Isto poderia estar associado com a eficácia deste grupo para controlar a primeira fase da infecção por SE, a colonização e a invasão. Como mostrado na Figura 3, o controle da estirpe desafio no conteúdo cecal foi claramente mais rápido nos grupos C e E do que no grupo A (não vacinado) e no grupo D (bacterina).

A associação do controle da infecção intestinal de SE com a produção de IFN- γ foi sugerida por BAO *et al.* (2000). Outros estudos descrevem um aumento na produção de IFN- γ após a infecção primária, com a função de estimular a imunidade inata (BEAL *et al.*, 2004; WITHANAGE *et al.*, 2005). Contudo, após a reinfecção ou no caso do presente estudo, no desafio após a vacinação, os mecanismos da imunidade adquirida são ativados, observando-se claramente em aves vacinadas uma diminuição da expressão de IFN- γ na tonsila cecal, enquanto que o grupo não vacinado (Grupo A) verificou-se um aumento nos níveis desta citocina após o desafio, que atingiu níveis semelhantes às aves vacinadas e desafiadas ao 1 DPI.

Antes do desafio, todas as aves vacinadas e não vacinadas tinham níveis baixos de linfócitos T CD8⁺ em amostras de fígado e de tonsila cecal. A primeira análise (1 DAI) foi realizada 19 dias após a última vacinação. Dessa forma, pode-se sugerir que este período foi suficiente para que os níveis de linfócitos T CD8⁺ nas aves vacinadas retornassem a níveis basais como demonstrado antes por CARVAJAL *et al.* (2008). Após o desafio, os resultados a respeito da detecção de linfócitos T CD8⁺ nas aves do grupo C demonstraram um padrão diferente dos outros grupos. A quantidade de linfócitos T CD8⁺ aumentou constantemente (Figura 13), o que sugere a ocorrência da expansão clonal de linfócitos T CD8⁺ de memória em aves vacinadas duas vezes com a vacina viva. As aves não vacinadas do grupo A, por sua vez, demonstraram um rápido fluxo de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) no fígado após o desafio, possivelmente devido à maior quantidade de SE invasiva neste órgão, como pode ser detectado no baço (Figura 3). Além disso, a população de linfócitos T CD8⁺ nas aves vacinadas apenas com a vacina viva (grupos B e C), persistiu em números elevados por períodos mais longos do que a observada nas aves dos outros grupos. Na Figura 13, pode ser observado que em amostras de tonsila cecal, o número de linfócitos T CD8⁺ era maior na tonsila cecal de aves dos grupos B e C enquanto que nos outros grupos havia diminuído no último momento da avaliação (9 DPI).

IL-12 é importante para estimular a produção de IFN- γ e recrutar linfócitos T CD8⁺ virgens. Esta citocina imunorregulatória estimula uma resposta imune efetiva, por induzir o aumento da população de CTLs e conseqüentemente, o desenvolvimento de linfócitos T de memória. O atual estudo detectou uma elevada expressão de IL-12 em todos os grupos vacinados. A produção de IL-12 na tonsila cecal aumentou consideravelmente nos grupos vacinados, em comparação com aves não tratadas ao 1 DAI (Figura 6). Considerando a forte resposta imune por linfócitos T CD8⁺ no grupo A, no início da infecção (1 DPI), a baixa produção da IL-12 nas aves deste grupo pode causar tolerância do sistema imune à infecção, devido sua importância para desenvolver células de memória e para a ativação de macrófagos (MESCHER *et al.*, 2006). A função de IL-12 ainda é pouco conhecida em aves e por isso estes resultados contribuem para a melhor compreensão do

papel desta citocina na resposta imune inata (aves não vacinadas) e resposta imune adquirida (aves vacinadas).

Aos 9 DPI, os grupos que receberam uma dose de vacina inativada, D e E, demonstraram as menores quantidades de linfócitos T CD8⁺. Simultaneamente os níveis de IL-10 eram constantemente maiores nestes dois grupos, sugerindo o desenvolvimento de um perfil de resposta por linfócitos Ta2. A vacina viva, por sua vez parece estimular o desenvolvimento da IMC de uma maneira controlada. Nos grupos B e C, o fluxo de linfócitos T CD8⁺ aumentou de forma contrária ao número de SE nas galinhas infectadas. Assim, aos 6 e 9 DPI a carga bacteriana foi reduzida em todos os grupos que receberam pelo menos uma dose da vacina viva (Grupos B, C e E), enquanto que os níveis elevados de imunoglobulinas observados nas aves vacinadas apenas com a vacina inativada (grupo D) não foram associados à diminuição significativa da carga SE no intestino.

A combinação de vacinas vivas e inativadas pode gerar uma resposta imune mais completa, já que as vacinas baseadas em estirpes vivas atenuadas de SG são invasivas e capazes de estimular a IMC, ao passo que as vacinas mortas contêm proteínas altamente imunogênicas, como a flagelina, que estimulam a produção de altos títulos de anticorpos circulantes no soro e até mesmo na mucosa (Figura 4). Considerando a eficácia no controle de SE utilizada no desafio das aves, a carga bacteriana foi significativamente reduzida nos grupos C e E. Embora o uso da vacina viva tenha demonstrado melhor eficácia para estimular o fluxo de linfócitos T CD8⁺, no grupo E se observou uma menor quantidade de CTLs. Essa característica pode ser atribuída ao uso de uma dose da vacina inativada em combinação com a vacina viva, causando uma diminuição da resposta imune celular e aumento da resposta humoral neste grupo. O programa vacinal misto, utilizado nas aves do grupo E demonstrou boa eficácia para controlar SE, o que pode estar associado à secreção de IgA no lúmen intestinal destas aves (Figura 4). Os linfócitos B e as diferentes classes de imunoglobulinas podem ser importantes para o controle de *Salmonella* (MITTRÜCKER *et al.*, 2000), embora não seja bem compreendido, os linfócitos B podem apresentar antígenos e estimular a resposta imune por CTLs (DE WIT *et al.*, 2010).

Uma forte resposta imune humoral foi notada nas aves que receberam a vacina inativada (Figura 4). Porém, foi observado o melhor controle da infecção por SE em aves que receberam a vacina viva (grupos B, C e E). Estes resultados sugerem que altos níveis de IgG e IgM circulantes no soro não são capazes de controlar a infecção intestinal e dos órgãos internos por SE. Esta bactéria é intracelular facultativa e quando consegue invadir as células do hospedeiro fica inacessível para as imunoglobulinas. Em casos de infecções sistêmicas por estirpes invasivas, estas bactérias migram para os órgãos dentro de fagócitos e neste ambiente são capazes de se multiplicar sem estimular o reconhecimento bacteriano e a ativação destas células.

A eficácia de programas vacinais contra *Salmonella* spp utilizados a campo são avaliados principalmente com base nos níveis de IgG no soro. De acordo com os dados da resposta imune humoral das aves vacinadas com a bacterina comercial (Figura 4) esta classe de imunoglobulina é pouco efetiva contra SE e pode não ser suficiente para determinar a eficácia protetora da vacinação. Este estudo sugere portanto que a avaliação de parâmetros como níveis de IgA secretória no lúmen intestinal ou produção de linfócitos T CD8⁺ são capazes de fornecer informações mais relevantes para avaliar a eficácia de um programa vacinal utilizado a campo.

Os níveis elevados de IL-10 em amostras de baço são indicativos de uma importante função em aves vacinadas, já que as células do baço continuaram expressando esta citocina por um longo período após a vacinação. Após o desafio os níveis desta citocina diminuíram subitamente nas aves que receberam a vacina viva, enquanto no grupo D, que recebeu apenas a vacina inativada, a expressão de IL-10 foi aumentada. Este dado sugere que esta citocina tenha participação na formação da resposta imune do perfil Ta2, estimulando a grande produção de anticorpos observados neste grupo. No entanto, as aves vacinadas com a vacina viva e as aves não vacinadas apresentaram níveis baixos desta citocina no baço após o desafio.

O acúmulo de leucócitos nos locais de inflamação é induzido pela secreção local de citocinas quimiotáticas, também conhecidas como quimiocinas, produzidas por uma variedade de células estimuladas. A quimiocina chamada CCL4 (Quimiocina C-C Ligante 4), é uma molécula ortóloga à proteína inflamatória dos

macrófagos (MIP-1 β) em mamíferos, no entanto, esta última não está presente em aves. A função natural de CCL4 em aves se baseia principalmente na atração de leucócitos efetores, como linfócitos T CD4⁺ e também CTLs, células natural killer e monócitos fagocíticos (ex. macrófagos) ao local infectado (TAUB *et al.*, 1993). Esta quimiocina de importante função biológica teve altos níveis de expressão no baço de aves vacinadas, antes da infecção. Após a infecção, estes níveis estavam significativamente reduzidos neste órgão ($p < 0,05$). Estes dados podem refletir a necessidade de migração de leucócitos do baço para outros locais, após a infecção. Devido ao foco da infecção por SE ser o tecido gastrointestinal, linfócitos e monócitos, antes reservados no baço (esplenócitos), migram para o local de infecção, diminuindo assim a produção local de CCL4 neste órgão. No grupo A, em que as aves não foram vacinadas, a expressão de CCL4 estava significativamente aumentada ($p < 0,05$) no 9 DPI tanto em amostras de baço quanto na tonsila cecal em relação aos grupos em que as aves foram vacinadas. Este dado pode revelar um importante papel desta quimiocina na resposta imune inata contra SE, contudo, em aves previamente imunizadas, após o desafio esta quimiocina teve alteração na sua expressão. Considerando a função de atrair leucócitos para os locais infectados, os resultados apresentados na Figura 11 sugerem que CCL4 tem uma participação secundária em aves vacinadas, onde os mecanismos da resposta imune adquirida tem maior relevância e a atração de leucócitos ocorre de forma mais específica, como pela apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos profissionais, conhecidas como células dendríticas.

De fato, a atração dos linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺ (Figura 13 e Figura 15) ocorreu de forma mais lenta, principalmente na tonsila cecal, se comparado às aves dos grupos vacinados. Este dado reforça a teoria de que o fluxo de linfócitos durante a resposta imune adquirida ocorre de forma controlada e independente de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. No entanto, estas células são capazes de reconhecer os antígenos específicos apresentados e se multiplicar para combater a infecção, permanecendo por um período maior até a completa eliminação do agente patogênico do local infectado.

Além de CCL4 outras citocinas pró-inflamatórias tiveram a expressão reduzida no baço após o desafio. Como pode ser notado nas figuras 9, 10 e 12, a

expressão de TGF- β , TNFSF15 e IL-6, respectivamente, sofreram uma redução em todos os grupos vacinados na maior parte dos momentos, após o desafio. Contudo a expressão de citocinas pró-inflamatórias se demonstrou ligeiramente aumentada nas aves que receberam duas doses de vacina viva, em amostras de tonsila cecal. A resposta imune gerada após a infecção primária por SE, depende em grande parte da atração de heterófilos e macrófagos para o local da infecção, este fluxo de células do sistema imune inato, é resultado principalmente da reação inflamatória aguda, estimulada em consequência da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Contudo, neste trabalho foi avaliada a transição entre a resposta inata até momentos mais avançados da infecção, onde a resposta adquirida se sobrepôs nas aves vacinadas. A baixa produção de citocinas pró-inflamatórias nas aves vacinadas pode sugerir a maior relevância da resposta imune adquirida para combater a infecção após o desafio de aves vacinadas. No entanto, no grupo A, as aves não vacinadas demonstraram quantidades aumentadas de IL-6 aos 6 DPI (Figura 12) em tonsila cecal e grande expressão de TGF- β aos 9 DPI (Figura 9) em amostras de baço, sugerindo uma maior participação destas citocinas durante a infecção em aves não imunes.

Na Figura 15 pode ser notada uma maior quantidade de linfócitos T CD4⁺ para o fígado de aves vacinadas após o desafio, no entanto em aves não vacinadas, foi detectado um grande fluxo de linfócitos T CD4⁺ ao 1 DPI em amostras de tonsila cecal, enquanto que nas aves que receberam apenas a vacina viva este pico apareceu aos 6 DPI e 9 DPI, nos grupos C e B respectivamente. O rápido fluxo de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, logo após o desafio das aves não-vacinadas sugere que os mecanismos de imunidade inata, como as citocinas TGF- β e CCL4, também são capazes de ativar e recrutar linfócitos para os locais infectados em grande quantidade. No entanto, a vacina tem um importante papel de alterar a capacidade de reconhecimento de antígenos e dessa forma gerar linfócitos de memória que podem se multiplicar após o reconhecimento de um único antígeno. A maior quantidade de linfócitos T CD4⁺ em amostras de fígado no grupo E e em amostras de tonsila cecal no grupo C (Figura 15), no 6 DPI sugerem uma importante participação destas células no controle de *Salmonella* Enteritidis, considerando que

estes grupos demonstraram a melhor eficácia contra o desafio neste momento avaliado (Figura 3).

A importância dos macrófagos para o controle de SE é bastante conhecida. OKAMURA *et al.* (2005) relatou que a ativação destas células por IFN- γ é responsável pelo controle da infecção. No entanto os resultados obtidos através da análise imuno-histoquímica de linfócitos T CD4⁺ sugerem grande participação dessas células no controle da infecção em aves imunes. CARVAJAL *et al.* (2008) também demonstrou um fluxo maior de linfócitos T CD4⁺ para a tonsila cecal de aves vacinadas, após o desafio por SE. Este fato pode ser favorável ao controle da infecção, pois os linfócitos T CD4⁺ efetores, além de secretar citocinas importantes para o desenvolvimento da resposta imune adquirida local, são capazes também de reconhecer antígenos apresentados por células apresentadoras de antígenos (ex. macrófagos e células dendríticas) em moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II), e dessa forma ativam os fagócitos, principalmente os macrófagos, aumentando a capacidade fagocítica destas células, as quais são então capazes de eliminar as bactérias fagocitadas. Assim pode-se admitir uma relação positiva entre o aumento do fluxo de linfócitos T CD4⁺ para o local infectado e o controle da infecção, principalmente se estes linfócitos forem capazes de reconhecer rapidamente os antígenos de *Salmonella* spp. apresentados, em aves previamente vacinadas.

Em infecções intracelulares macrófagos podem ser ativados por citocinas secretadas por linfócitos T auxiliares CD4⁺, como IFN- γ , a principal citocina do tipo Ta1 ativadora de macrófagos (MA *et al.*, 2003). No entanto, em casos de infecção extracelular, como pode ocorrer durante a infecção intestinal por SE, os macrófagos sofrem ativação alternativa por citocinas do tipo Ta2 e exibem propriedades anti-inflamatórias e de reparação de tecido (BELARDELLI, 1995; GORDON, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2009). IL-10 tem sido descrita como uma citocina tipo Ta2 que atua na inativação de macrófagos. Dessa forma IL-10 suprime a secreção de citocinas pró-inflamatórias e inibe a expressão de moléculas MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias (O'GARRA & VIEIRA, 2007). Contudo, evidências sugerem que IL-10 possui função imunorregulatória, realizando regulação negativa de ambas as respostas Ta1 e Ta2 (COUPER *et al.*, 2008). O controle da atividade

dos macrófagos por citocinas Ta1 e Ta2 é de extrema importância para manter o equilíbrio da imunidade e para adequar a imunidade mediada por Ta1, evitando a inflamação excessiva prejudicial.

De forma geral, este estudo demonstrou a importância da vacinação para o controle eficaz de infecções de SE em aves comerciais. A avaliação da resposta imune e da proteção geradas por diferentes programas vacinais, utilizando vacinas vivas e vacinas inativadas, permitiu clarificar o funcionamento dessas vacinas e as mudanças que ocorrem após o desafio por SE. Além do controle da infecção em galinhas a eficácia de cada programa vacinal foi correlacionada com os elementos da resposta imune humoral (IgM, IgG e IgA), resposta imune celular (linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺) e algumas citocinas importantes para o desenvolvimento de imunidade. Foi demonstrado que a utilização de vacinas inativadas, por si só não é indicada para controlar números elevados de SE, apesar da forte resposta imune humoral produzida. Vacinas inativadas mostraram uma menor capacidade de estimular a resposta por linfócitos T CD8⁺ em comparação com a vacina viva. No entanto, a combinação da vacina viva e da bactéria no mesmo programa vacinal e o programa vacinal com duas doses da vacina viva, estimularam uma forte imunidade protetora contra SE, marcado pela rápida diminuição da carga bacteriana após o desafio.

7. CONCLUSÕES

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

- A estirpe *SGΔcobSΔcbiA*, atenuada para aves, foi capaz de diminuir a infecção intestinal e sistêmica por *Salmonella* Enteritidis (SE), sendo caracterizada como uma estirpe vacinal capaz de gerar proteção cruzada parcial contra o sorovar SE.

- A vacina viva estimulou a resposta imune celular por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de forma controlada e persistente após o desafio.

- A vacina inativada estimulou uma forte resposta imune humoral, mantendo os altos níveis de anticorpos durante todo o período avaliado.

- A melhor eficácia para proteger contra a infecção por SE foi vista nas aves que receberam ao menos uma dose da vacina viva.

- A imunomodulação mediada pelas citocinas IL-12, IL-10 e IFN- γ interferem no perfil da resposta imune após a vacinação, no entanto após o desafio, estas citocinas tem a expressão inibida e os mecanismos efetores das respostas imunes, como as imunoglobulinas e os linfócitos T são estimulados pelos antígenos bacterianos.

- As citocinas pró-inflamatórias TNFSF15 e IL-6 auxiliaram na controle da infecção em aves que receberam a VV

- A redução de SE no conteúdo intestinal ocorre de forma mais rápida em aves previamente imunizadas e está associada à resposta imune adquirida.

- Linfócitos T CD8⁺ citotóxicos estimulados após infecção primária por SE (aves não vacinadas) não persistem e são incapazes de reduzir a infecção significativamente se comparados aos grupos previamente imunizados com a vacina viva.

- A forte resposta imune por IgA secretória no lúmen intestinal associada à uma resposta por Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ pode estar associada a boa eficácia do programa vacinal misto (VV+BA) no controle da estirpe desafio.

- Este estudo sugere que a avaliação de parâmetros como níveis de IgA secretória no lúmen intestinal ou produção de linfócitos T CD8⁺ são capazes de fornecer informações mais relevantes para avaliar a eficácia de um programa vacinal utilizado a campo, sendo estes elementos mais indicados que o monitoramento de IgG anti-*Samonella* no sangue.

- A eficácia da resposta imune celular depende de **LOCALIZAÇÃO** e da **ESPECIFICIDADE** antigênica dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

- Mensurar o aumento nos níveis das citocinas IL-12 e IFN- γ na tonsila cecal são bons indicadores de qualidade da vacinação.

- Vacinas inativadas podem ser utilizadas como “booster” (segunda dose) para reforçar resposta induzida inicialmente por vacina viva (primeira dose).

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. **Imunologia celular e molecular (7ª Ed.)**. Amsterdão: Elsevier, 2012. p. 226 ou p. 244.

ABOUZEED, Y. M.; HARIHARAN, H.; POPPE, C.; KIBENGE, F. S. Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 4, p. 253-66, 2000.

ADRIAENSEN, C.; DE GREVE, H.; TIAN, J. Q.; DE CRAEYE, S.; GUBBELS, E.; EECKHAUT, V.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R.; KUMAR, M.; HERNALSTEENS, J. P. A live *Salmonella* enterica serovar Enteritidis vaccine allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. **Infect Immun**, v. 75, n. 5, p. 2461-8, 2007.

ARNOLD, J. W.; HOLT, P. S. Response to *Salmonella* enteritidis infection by the immunocompromised avian host. **Poult Sci**, v. 74, n. 4, p. 656-65, 1995.

AYRES, J. S.; VANCE, R. E. Cellular teamwork in antibacterial innate immunity. **Nature immunology**, v. 13, n. 2, p. 115-7, 2012.

BABU, U.; DALLOUL, R. A.; OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H. S.; XIE, H.; RAYBOURNE, R. B.; GAINES, D.; HECKERT, R. A. *Salmonella* enteritidis clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 101, n. 3-4, p. 251-7, 2004.

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

BAO, S.; BEAGLEY, K. W.; FRANCE, M. P.; SHEN, J.; HUSBAND, A. J. Interferon-gamma plays a critical role in intestinal immunity against *Salmonella* typhimurium infection. **Immunology**, v. 99, n. 3, p. 464-72, 2000.

BARBOUR, E. K.; FRERICHS, W. M.; NABBUT, N. H.; POSS, P. E.; BRINTON, M. K. Evaluation of bacterins containing three predominant phage types of *Salmonella* enteritidis for prevention of infection in egg-laying chickens. **Am J Vet Res**, v. 54, n. 8, p. 1306-9, 1993.

BARROW, P. A.; HASSAN, J. O.; BERCHIERI, A., JR. Reduction in faecal excretion of *Salmonella* typhimurium strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S. typhimurium* organisms. **Epidemiol Infect**, v. 104, n. 3, p. 413-26, 1990a.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A.; BERCHIERI, A. Immunisation of laying hens against *Salmonella* enteritidis with live attenuated vaccines. **Vet Rec**, v. 126, n. 10, p. 241-2, 1990b.

BARROW, P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A. Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning *Salmonella* serotypes; microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathol**, v. 17, n. 3, p. 571-88, 1988.

BAUMLER, A. J.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v. 287, n. 5450, p. 50-2, 2000.

BEAL, R. K.; POWERS, C.; DAVISON, T. F.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Clearance of enteric *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in chickens is independent of B-cell function. **Infect Immun**, v. 74, n. 2, p. 1442-4, 2006.

BEAL, R. K.; POWERS, C.; WIGLEY, P.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. **Avian Pathol**, v. 33, n. 1, p. 25-33, 2004.

BELARDELLI, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. **APMIS**, v. 103, n. 3, p. 161-79, 1995.

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

BERGHAUS, R. D.; THAYER, S. G.; MAURER, J. J.; HOFACRE, C. L. 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**, v. 74, n. 5, p. 727-34, 2011.

BERNDT, A.; METHNER, U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* typhimurium strains. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 78, n. 2, p. 143-61, 2001.

BIOZZI, G.; HOWARD, J. G.; HALPERN, B. N.; STIFFEL, C.; MOUTON, D. The kinetics of blood clearance of isotopically labelled *Salmonella* enteritidis by the reticulo-endothelial system in mice. **Immunology**, v. 3, p. 74-89, 1960.

BROZ, P.; MONACK, D. M. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. **Immunol Rev**, v. 243, n. 1, p. 174-90, 2011.

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

CALDWELL, D. J.; HARGIS, B. M.; CORRIER, D. E.; VIDAL, L.; DELOACH, J. R. Evaluation of persistence and distribution of *Salmonella* serotype isolation from poultry farms using drag-swab sampling. **Avian Dis**, v. 39, n. 3, p. 617-21, 1995.

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

CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. The route of enteric infection in normal mice. **J Exp Med**, v. 139, n. 5, p. 1189-203, 1974.

CARVAJAL, B. G.; METHNER, U.; PIEPER, J.; BERNDT, A. Effects of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis on cellular recruitment and cytokine gene expression in caecum of vaccinated chickens. **Vaccine**, v. 26, n. 42, p. 5423-33, 2008.

CASON, J. A.; COX, N. A.; BAILEY, J. S. Transmission of *Salmonella* typhimurium during hatching of broiler chicks. **Avian Dis**, v. 38, n. 3, p. 583-8, 1994.

CDC. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC. 2008. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/Salmonellaannualsummary2006.pdf> >. Acesso em: Julho de 2012.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 53-9, 2009.

COLLINS, F. M. Recall of immunity in mice vaccinated with *Salmonella* enteritidis or *Salmonella* typhimurium. **J Bacteriol**, v. 95, n. 6, p. 2014-21, 1968.

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

COLLINS, F. M.; MILNE, M. Heat-labile antigens of *Salmonella* enteritidis. II. Mouse-protection studies. **J Bacteriol**, v. 92, n. 3, p. 549-57, 1966.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J Immunol**, v. 180, n. 9, p. 5771-7, 2008.

CURTISS, R., 3RD; HASSAN, J. O. Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 54, n. 1-4, p. 365-72, 1996.

DAVISON, S.; BENSON, C. E.; HENZLER, D. J.; ECKROADE, R. J. Field observations with *Salmonella* enteritidis bacterins. **Avian Dis**, v. 43, n. 4, p. 664-9, 1999.

DE WIT, J.; SOUWER, Y.; JORRITSMA, T.; KLAASSE BOS, H.; TEN BRINKE, A.; NEEFJES, J.; VAN HAM, S. M. Antigen-specific B cells reactivate an effective cytotoxic T cell response against phagocytosed *Salmonella* through cross-presentation. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e13016, 2010.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; MAST, J.; GODDEERIS, B. M.; KASPERS, B.; HAESEBROUCK, F. Role of the humoral immune system in *Salmonella* enteritidis phage type four infection in chickens. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 63, n. 4, p. 355-67, 1998.

DOUGAN, G.; JOHN, V.; PALMER, S.; MASTROENI, P. Immunity to salmonellosis. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 196-210, 2011.

DUNLAP, N. E.; BENJAMIN, W. H., JR.; MCCALL, R. D., JR.; TILDEN, A. B.; BRILES, D. E. A 'safe-site' for *Salmonella* typhimurium is within splenic cells during the early phase of infection in mice. **Microb Pathog**, v. 10, n. 4, p. 297-310, 1991.

DUNSTAN, S. J.; SIMMONS, C. P.; STRUGNELL, R. A. Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella* enterica var. Typhimurium. **Infect Immun**, v. 67, n. 10, p. 5133-41, 1999.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 3, n. 14-15, p. 1191-200, 2001.

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

FARNELL, M. B.; EL HALAWANI, M.; YOU, S.; MCELROY, A. P.; HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J. In vivo biologic effects of recombinant-turkey interferon-gamma in neonatal leghorn chicks: protection against *Salmonella* enteritidis organ invasion. **Avian Dis**, v. 45, n. 2, p. 473-8, 2001.

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

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

FIERER, J. Polymorphonuclear leukocytes and innate immunity to *Salmonella* infections in mice. **Microbes Infect**, v. 3, n. 14-15, p. 1233-7, 2001.

FOSTER, N.; LOVELL, M. A.; MARSTON, K. L.; HULME, S. D.; FROST, A. J.; BLAND, P.; BARROW, P. A. Rapid protection of gnotobiotic pigs against experimental salmonellosis following induction of polymorphonuclear leukocytes by avirulent *Salmonella enterica*. **Infect Immun**, v. 71, n. 4, p. 2182-91, 2003.

FRANCHI, L. Role of inflammasomes in *Salmonella* infection. **Front Microbiol**, v. 2, p. 8, 2011.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; TIMBERMONT, L.; BOYEN, F.; BOHEZ, L.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; VAN IMMERSSEEL, F. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella vac E* and TAD *Salmonella vac T* reduces internal egg contamination with *Salmonella Enteritidis*. **Vaccine**, v. 24, n. 37-39, p. 6250-5, 2006.

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

GAST, R. K.; STONE, H. D.; HOLT, P. S.; BEARD, C. W. Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella enteritidis*. **Avian Dis**, v. 36, n. 4, p. 992-9, 1992.

GERMANIER, R. Immunity in experimental salmonellosis. 3. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of *Salmonella typhimurium*. **Infect Immun**, v. 5, n. 5, p. 792-7, 1972.

GEWIRTZ, A. T.; NAVAS, T. A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P. J.; MADARA, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **J Immunol**, v. 167, n. 4, p. 1882-5, 2001.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

HARRISON, J. A.; VILLARREAL-RAMOS, B.; MASTROENI, P.; DEMARCO DE HORMAECHE, R.; HORMAECHE, C. E. Correlates of protection induced by live Aro-*Salmonella typhimurium* vaccines in the murine typhoid model. **Immunology**, v. 90, n. 4, p. 618-25, 1997.

HAYES, S.; NYLEN, G.; SMITH, R.; SALMON, R. L.; PALMER, S. R. Undercooked hens eggs remain a risk factor for sporadic *Salmonella enteritidis* infection. **Commun Dis Public Health**, v. 2, n. 1, p. 66-7, 1999.

HE, H.; GENOVESE, K. J.; KOGUT, M. H. Modulation of chicken macrophage effector function by T(H)1/T(H)2 cytokines. **Cytokine**, v. 53, n. 3, p. 363-9, 2011.

HESS, J.; LADEL, C.; MIKO, D.; KAUFMANN, S. H. *Salmonella typhimurium* aroA-infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. **J Immunol**, v. 156, n. 9, p. 3321-6, 1996.

HIROSE, K.; NISHIMURA, H.; MATSUGUCHI, T.; YOSHIKAI, Y. Endogenous IL-15 might be responsible for early protection by natural killer cells against infection with an avirulent strain of *Salmonella choleraesuis* in mice. **J Leukoc Biol**, v. 66, n. 3, p. 382-90, 1999.

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

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

INOUE, A. Y.; BERCHIERI, A.; BERNARDINO, A.; PAIVA, J. B.; STERZO, E. V. Passive immunity of progeny from broiler breeders vaccinated with oil-emulsion bacterin against *Salmonella enteritidis*. **Avian diseases**, v. 52, n. 4, p. 567-71, 2008.

IQBAL, M.; PHILBIN, V. J.; WITHANAGE, G. S.; WIGLEY, P.; BEAL, R. K.; GOODCHILD, M. J.; BARROW, P.; MCCONNELL, I.; MASKELL, D. J.; YOUNG, J.; BUMSTEAD, N.; BOYD, Y.; SMITH, A. L. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2344-50, 2005.

KAISER, P.; DIARD, M.; STECHER, B.; HARDT, W. D. The streptomycin mouse model for *Salmonella* diarrhea: functional analysis of the microbiota, the pathogen's virulence factors, and the host's mucosal immune response. **Immunol Rev**, v. 245, n. 1, p. 56-83, 2012.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. **Microbiology**, v. 146 Pt 12, p. 3217-26, 2000.

KAWAKAMI, M.; OSAWA, N.; MITSUHASHI, S. Experimental salmonellosis. VII. Comparison of the immunizing effect of live vaccine and materials extracted from *Salmonella enteritidis*. **J Bacteriol**, v. 92, n. 6, p. 1585-9, 1966.

KOGUT, M. H.; IQBAL, M.; HE, H.; PHILBIN, V.; KAISER, P.; SMITH, A. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. **Dev Comp Immunol**, v. 29, n. 9, p. 791-807, 2005.

KOGUT, M. H.; ROTHWELL, L.; KAISER, P. Differential regulation of cytokine gene expression by avian heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized *Salmonella* enteritidis. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 23, n. 6, p. 319-27, 2003.

KOGUT, M. H.; TELLEZ, G. I.; MCGRUDER, E. D.; HARGIS, B. M.; WILLIAMS, J. D.; CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella* enteritidis infections. **Microb Pathog**, v. 16, n. 2, p. 141-51, 1994.

LALMANACH, A. C.; LANTIER, F. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. **Microbes Infect**, v. 1, n. 9, p. 719-26, 1999.

LEE, C. A.; SILVA, M.; SIBER, A. M.; KELLY, A. J.; GALYOV, E.; MCCORMICK, B. A. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 22, p. 12283-8, 2000.

LEE, Y. J.; MO, I. P.; KANG, M. S. Safety and efficacy of *Salmonella* gallinarum 9R vaccine in young laying chickens. **Avian Pathol**, v. 34, n. 4, p. 362-6, 2005.

LEHMANN, J.; SPRINGER, S.; WERNER, C. E.; LINDNER, T.; BELLMANN, S.; STRAUBINGER, R. K.; SELBITZ, H.-J.; ALBER, G. Immunity induced with a *Salmonella* enterica serovar Enteritidis live vaccine is regulated by Th1-cell-dependent cellular and humoral effector mechanisms in susceptible BALB/c mice. **Vaccine**, v. 24, n. 22, p. 4779-93, 2006.

LEVINE, M. M.; FERRECCIO, C.; BLACK, R. E.; TACKET, C. O.; GERMANIER, R. Progress in vaccines against typhoid fever. **Rev Infect Dis**, v. 11 Suppl 3, p. S552-67, 1989.

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

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N. E.; HUKKANEN, M.; MA, G. F.; KONTTINEN, Y. T. Regulation of macrophage activation. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 11, p. 2334-46, 2003.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 451-83, 2009.

MASTROENI, P. Immunity to systemic *Salmonella* infections. **Current molecular medicine**, v. 2, n. 4, p. 393-406, 2002.

MASTROENI, P. Development of acquired immunity to *Salmonella*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 453-459, 2003.

MASTROENI, P.; HARRISON, J. A.; ROBINSON, J. H.; CLARE, S.; KHAN, S.; MASKELL, D. J.; DOUGAN, G.; HORMAECHE, C. E. Interleukin-12 is required for control of the growth of attenuated aromatic-compound-dependent *Salmonellae* in BALB/c mice: role of gamma interferon and macrophage activation. **Infect Immun**, v. 66, n. 10, p. 4767-76, 1998.

MASTROENI, P.; VILLARREAL-RAMOS, B.; DEMARCO DE HORMAECHE, R.; HORMAECHE, C. E. Delayed (footpad) hypersensitivity and Arthus reactivity using protein-rich antigens and LPS in mice immunized with live attenuated aroA *Salmonella* vaccines. **Microb Pathog**, v. 14, n. 5, p. 369-79, 1993.

MATSUDA, K.; CHAUDHARI, A. A.; LEE, J. H. Comparison of the Safety and Efficacy of a New Live *Salmonella* Gallinarum Vaccine Candidate, JOL916, with the SG9R Vaccine in Chickens. **Avian diseases**, v. 55, n. 3, p. 407-412, 2011a.

MATSUDA, K.; CHAUDHARI, A. A.; LEE, J. H. Evaluation of safety and protection efficacy on cpxR and lon deleted mutant of *Salmonella* Gallinarum as a live vaccine candidate for fowl typhoid. **Vaccine**, v. 29, n. 4, p. 668-674, 2011b.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S. W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SUN, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R. K. Complete genome sequence of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium LT2. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 852-6, 2001.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg Infect Dis**, v. 5, n. 5, p. 607-25, 1999.

MESCHER, M. F.; CURTSINGER, J. M.; AGARWAL, P.; CASEY, K. A.; GERNER, M.; HAMMERBECK, C. D.; POPESCU, F.; XIAO, Z. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. **Immunological reviews**, v. 211, p. 81-92, 2006.

METHNER, U.; STEINBACH, G. [Efficacy of maternal *Salmonella* antibodies and experimental oral infection of chicks with *Salmonella* enteritidis]. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 110, n. 10, p. 373-7, 1997.

METHNER, U.; STEINBACH, G.; MEYER, H. [The effectiveness of *Salmonella* immunization of broiler breeders on the *Salmonella* colonization of the animals and their progeny after experimental oral infection]. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 107, n. 6, p. 192-8, 1994.

MITTRÜCKER, H. W.; RAUPACH, B.; KÖHLER, A.; KAUFMANN, S. H. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella* typhimurium infection. **J Immunol**, v. 164, n. 4, p. 1648-52, 2000.

NASSAR, T. J.; AL-NAKHLI, H. M.; AL-OGAILY, Z. H. Use of live and inactivated *Salmonella* enteritidis phage type 4 vaccines to immunise laying hens against experimental infection. **Rev Sci Tech**, v. 13, n. 3, p. 855-67, 1994.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 425-8, 2007.

OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H. S.; RAYBOURNE, R. B.; BABU, U. S.; HECKERT, R. A. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella* enteritidis vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN-gamma production. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 4, p. 255-72, 2004.

OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H. S.; RAYBOURNE, R. B.; BABU, U. S.; HECKERT, R. A.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E.; LILLEHOJ, E. P. Differential responses of macrophages to *Salmonella* enterica serovars Enteritidis and Typhimurium. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 107, n. 3-4, p. 327-35, 2005.

OLIVEIRA, G. H. **TESE. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção da resposta sorológica contra *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum*, *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* em aves.** FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS: FCAV/UNESP, 2004.

OSAWA, N.; KAWAKAMI, M.; KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Experimental salmonellosis. 8. Postinfective immunity and its significance for conferring cellular immunity. **J Bacteriol**, v. 93, n. 5, p. 1534-40, 1967.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K. L.; BENTLEY, S. D.; HOLDEN, M. T.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R. M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T. T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T. S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; O'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella* enterica serovar Typhi CT18. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 848-52, 2001.

PENHA FILHO, R. A.; DE PAIVA, J. B.; ARGUELLO, Y. M.; DA SILVA, M. D.; GARDIN, Y.; RESENDE, F.; BERCHIERI JUNIOR, A. B.; SESTI, L. Efficacy of several vaccination programmes in commercial layer and broiler breeder hens against experimental challenge with *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. **Avian Pathol**, v. 38, n. 5, p. 367-75, 2009.

PENHA FILHO, R. A.; DE PAIVA, J. B.; DA SILVA, M. D.; DE ALMEIDA, A. M.; BERCHIERI, A., JR. Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. **Vaccine**, v. 28, n. 16, p. 2853-9, 2010.

RANA, N.; KULSHRESHTHA, R. C. Cell-mediated and humoral immune responses to a virulent plasmid-cured mutant strain of *Salmonella* enterica serotype gallinarum in broiler chickens. **Veterinary microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 156-62, 2006.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? **Microbes Infect**, v. 3, n. 14-15, p. 1261-9, 2001.

RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G.; BONASIO, R.; GRANUCCI, F.; KRAEHENBUHL, J. P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 361-7, 2001.

RICHTER-DAHLFORS, A.; BUCHAN, A. M.; FINLAY, B. B. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella* typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. **J Exp Med**, v. 186, n. 4, p. 569-80, 1997.

RUBY, T.; MCLAUGHLIN, L.; GOPINATH, S.; MONACK, D. *Salmonella*'s long-term relationship with its host. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 600-15, 2012.

SETTA, A.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* enterica serovars; bacterial invasion and persistence, nitric oxide and oxygen production, differential host gene expression, NF-kappaB signalling and cell cytotoxicity. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 146, n. 3-4, p. 212-24, 2012.

SETTA, A. M.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella* enterica serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: Cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 2012.

SEVIL DOMENECH, V. E.; PANTHEL, K.; WINTER, S. E.; RUSSMANN, H. Heterologous prime-boost immunizations with different *Salmonella* serovars for enhanced antigen-specific CD8 T-cell induction. **Vaccine**, v. 26, n. 15, p. 1879-86, 2008.

SMITH, H. W. The use of live vaccines in experimental *Salmonella* gallinarum infection in chickens with observations on their interference effect. **J Hyg (Lond)**, v. 54, n. 3, p. 419-32, 1956.

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

TAUB, D. D.; CONLON, K.; LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J.; KELVIN, D. J. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5106, p. 355-8, 1993.

TIMMS, L. M.; MARSHALL, R. N.; BRESLIN, M. F. Laboratory assessment of protection given by an experimental *Salmonella* enteritidis PT4 inactivated, adjuvant vaccine. **Vet Rec**, v. 127, n. 25-26, p. 611-4, 1990.

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

TRAN, T. Q. L.; QUESSY, S.; LETELLIER, A.; DESROSIERS, A.; BOULIANNE, M. Immune response following vaccination against *Salmonella* Enteritidis using 2 commercial bacterins in laying hens. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire**, v. 74, n. 3, p. 185-92, 2010.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Immune responses of TLR5(+) lamina propria dendritic cells in enterobacterial infection. **J Gastroenterol**, v. 44, n. 8, p. 803-11, 2009.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. The effect of vaccination with a *Salmonella* enteritidis aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. **Vaccine**, v. 20, n. 23-24, p. 3034-41, 2002.

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, I.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P. A. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiol Infect**, v. 133, n. 6, p. 959-78, 2005.

VAZQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; BAUMLER, A. J.; FALKOW, S.; VALDIVIA, R.; BROWN, W.; LE, M.; BERGGREN, R.; PARKS, W. T.; FANG, F. C. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 804-8, 1999.

VOETSCH, A. C.; VAN GILDER, T. J.; ANGULO, F. J.; FARLEY, M. M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P. R.; DENEEN, V. C.; TAUXE, R. V. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 38 Suppl 3, p. S127-34, 2004.

WARREN, J.; MASTROENI, P.; DOUGAN, G.; NOURSADEGHI, M.; COHEN, J.; WALPORT, M. J.; BOTTO, M. Increased susceptibility of C1q-deficient mice to *Salmonella* enterica serovar Typhimurium infection. **Infect Immun**, v. 70, n. 2, p. 551-7, 2002.

WITHANAGE, G. S.; KAISER, P.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; MASTROENI, P.; BROOKS, H.; BARROW, P.; SMITH, A.; MASKELL, D.; MCCONNELL, I. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella* enterica serovar typhimurium. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2152-9, 2004.

WITHANAGE, G. S. K.; WIGLEY, P.; KAISER, P.; MASTROENI, P.; BROOKS, H.; POWERS, C.; BEAL, R.; BARROW, P.; MASKELL, D.; MCCONNELL, I. Cytokine and Chemokine Responses Associated with Clearance of a Primary *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Infection in the Chicken and in Protective Immunity to Rechallenge. **Society**, v. 73, n. 8, p. 5173-5182, 2005.

YAMAMOTO, H.; WATANABE, H.; SATO, G.; MIKAMI, T. [Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity]. **Jpn J Vet Res**, v. 23, n. 4, p. 131-40, 1975.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; BARROW, P. A. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine**, v. 17, n. 20-21, p. 2538-45, 1999.