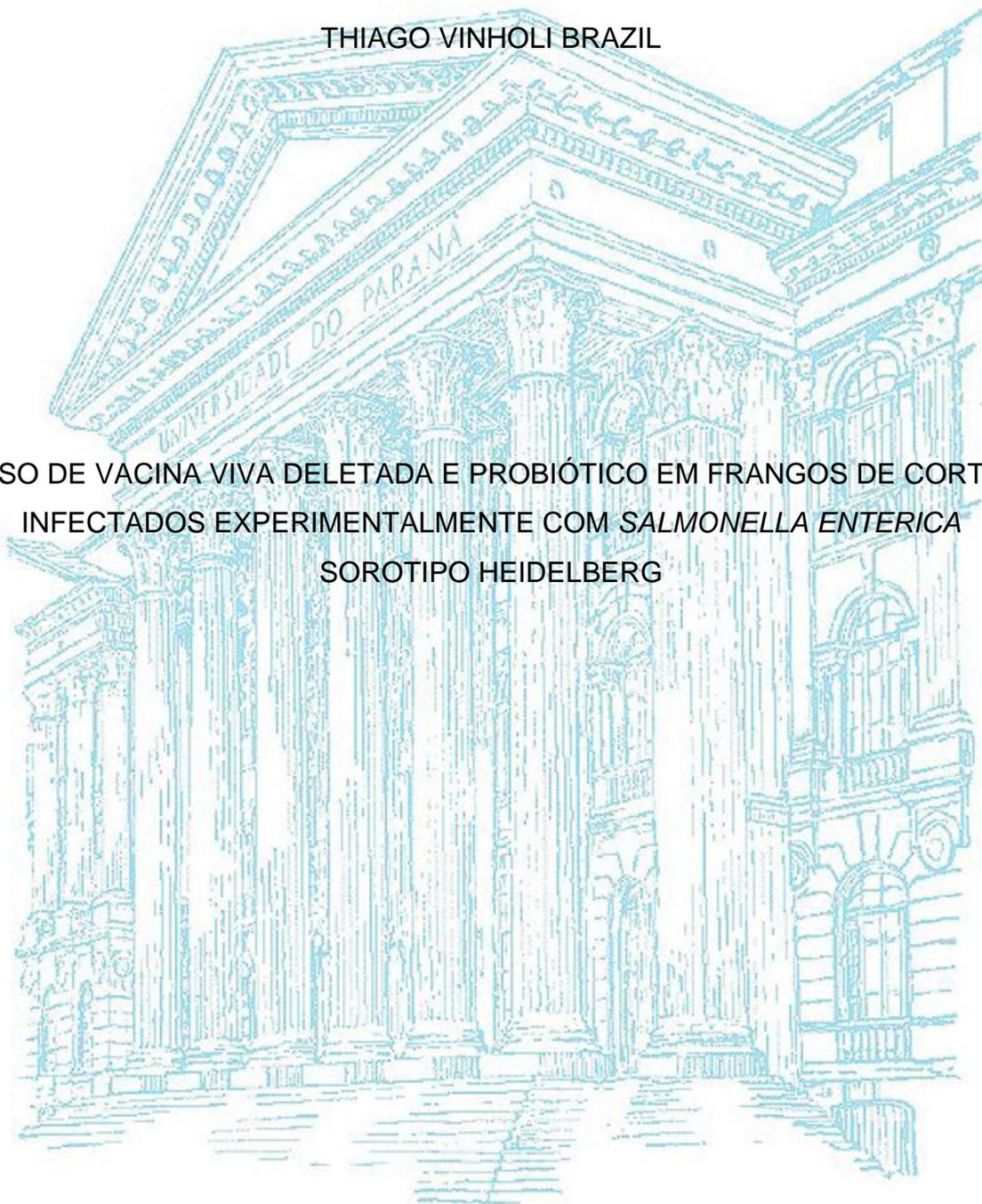


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO VINHOLI BRAZIL

**USO DE VACINA VIVA DELETADA E PROBIÓTICO EM FRANGOS DE CORTE
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *SALMONELLA ENTERICA*
SOROTIPO HEIDELBERG**



PALOTINA-PR

2014

THIAGO VINHOLI BRAZIL

USO DE VACINA VIVA DELETADA E PROBIÓTICO EM FRANGOS DE CORTE
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *SALMONELLA* ENTERICA
SOROTIPO HEIDELBERG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Patologia Animal.

Orientação: Prof. Dra. Aline De Marco Viott

PALOTINA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B823 Brasil, Thiago Vinholi
 Uso da vacina viva deletada e probiótico em frangos de corte infectados
 experimentalmente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg.
 / Thiago Vinholli Brasil; Orientadora, Aline De Marco Viott.- Palotina,
 PR, 2014.
 63p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor
Palotina – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal , 2014.

Inclui referências

1. Imunoistoquímica. 2. Morfometria. 3. *Salmonella*. I. Aline De Marco Viott.
II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. III. Título.

CDU 591.2

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO DE APROVAÇÃO

THIAGO VINHOLI BRAZIL

**USO DE VACINA VIVA DELETADA E PROBIÓTICO EM FRANGOS DE CORTE INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *Salmonella enterica* SOROTIPO HEIDELBERG.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof.ª Dr.ª Aline de Marco Viott

Presidente/Orientador(a): Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Eduardo Correa Muniz

Membro: Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda

Prof.ª Dra. Jovanir Inês Müller Fernandes

Membro: Universidade Federal do Paraná

Palotina, 06 de agosto de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Thiago Vinholi Brazil, nascido em Jandaia do Sul, Estado do Paraná, em 3 de Outubro de 1986, filho de Orestes Brazil Filho e Linda Aparecida Vinholi Brazil. Médico Veterinário, graduado em 26 de março de 2010 pela Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina. Trabalha como sanitarista de frango de corte na empresa BRF, unidade de Toledo – PR. Em 2012 iniciou o programa de Pós Graduação em Ciência Animal na Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina sob a orientação da Prof. Dra Aline De Marco Viott.

Dedico à minha família, Orestes Brazil Filho, Linda
Aparecida Vinholi Brazil, Fernanda Vinholi Brazil e Carolina
Vinholi Brazil que sempre iluminaram o meu caminho.

...Ofereço
A minha mãe, Linda, pelo seu apoio incondicional em todos os
momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus...** por ter iluminado o meu caminho e me dado força para enfrentar os momentos de dificuldades.

JPela oportunidade para a presente formação.

Aos professores **Dra Aline De Marco Viott e Dra Edna Tereza De Lima**, pela total confiança em meu trabalho, pela orientação, co-orientação e apoio.

A empresa **Zoetis** pelo apoio, incentivo e confiança. Em especial a **Dario Kuchpel Filho e Eduardo Muniz** que me proporcionaram esta oportunidade.

A empresa **BRF** pela colaboração e oportunidade. Em especial ao meu supervisor **Melquiades Junior** que não mediu esforços para viabilizar este projeto.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Veterinária da UFPR Campus Palotina, em Especial a **Angélica e Camila** que não mediram esforços na execução do experimento e processamento laboratorial.

A todos os meus amigos e familiares pelo apoio, incentivo e torcida...

BRAZIL, Thiago Vinholi. Uso de vacina viva deletada e probiótico em frango de corte infectados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. 2014 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Paraná. Palotina, 2014.

RESUMO

A salmonelose tem sido o principal problema enfrentado na atividade avícola. Recentemente, tem sido observado a campo um aumento do isolamento da *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. Esse trabalho testou o uso de uma vacina viva deletada para *Salmonella* Heidelberg e um probiótico contendo *Bacillus subtilis*, objetivando a diminuição da contaminação em aves, instalações e carcaças de frango de corte. As aves foram desafiadas experimentalmente com um inoculo contendo 6×10^7 UFC/ml de uma cepa selvagem de *Salmonella* Heidelberg e divididas em quatro tratamentos: controle (S); tratado com *Bacillus subtilis* (SP), tratado com vacina viva deletada (SV) e tratado com vacina e probiótico (SVP). A quantificação foi realizada através de suabe de arrasto da cama e *pool* de suabe de cloaca, ambos realizados aos 7,14,21,28,35,42 dias. Após o abate fragmentos de pele e peito foram coletados para avaliação qualitativa e quantitativa de *Salmonella*. O baço, fígado e coração foram coletados e submetidos a contagem e identificação de *Salmonella*. Fragmentos de jejuno foram processados para imunistoquímica (IHQ) para contagem de linfócitos T na mucosa. Análise histológica foi realizada em amostras de fígado, baço, coração e intestino e as lesões quando presentes foram classificadas como ausentes, leve, moderada e acentuada. Cortes de jejuno foram submetidos a coloração de PAS para evidencição e contagem das células caliciformes, e mensuração de criptas e vilosidades intestinais. A análise estatística foi feita através do teste de regressão das médias, que demonstrou variações significativas ($P < 0,05$) no isolamento de *Salmonella* da cloaca, revelando uma redução linear da concentração bacteriana ao longo do experimento nos grupos SP, e SVP. Os grupos S e SV apresentaram um comportamento quadrático com início da redução da contagem na cloaca a partir dos dias 32,3 e 17,75 respectivamente. A contagem de colônias de *Salmonella* na maravalha nos grupos SV e SVP apresentou decréscimo significativo ($P < 0,05$) ao longo do experimento. Os grupos S e SP apresentaram um comportamento quadrático com início da redução nos dias 20,9 e 18,4 respectivamente. Todos os tratamentos apresentaram redução significativa na contagem bacteriana na carcaça quando comparados ao grupo controle, mas não diferiram entre si estatisticamente. Nas amostras de vísceras não houve crescimento bacteriano. As vilosidades que tiveram as maiores mensurações foram as do grupo S e SP e o grupo SVP apresentou o pior resultado para altura de vilosidade. O grupo S apresentou a maior profundidade de cripta e o tratamento SV estatisticamente a pior, porém a relação vilo cripta foi maior nesse grupo. Na IHQ todos os tratamentos tiveram resultados superiores em relação ao grupo S na contagem de linfócitos T. Não foram observadas lesões microscópicas nas amostras de jejuno, ceco e vísceras analisadas. Os tratamentos utilizados promoveram uma redução na contagem de *Salmonella* nas amostras, e aumento na contagem de linfócitos T, indicando que essas ferramentas podem ser um importante aliado no controle da enfermidade. Em relação à integridade intestinal a vacina obteve o melhor resultado em relação vilo/cripta.

Palavras chave: Controle, Heidelberg, imunistoquímica, isolamento, morfometria, quantificação bacteriana, *Salmonella*

BRAZIL, Thiago Vinholi. Use of deleted live vaccine and probiotic in poultry experimentally infected with *Salmonella* enterica serotype Heidelberg. 2014. folhas. Dissertation (Master of Animal Science) – Universidade Federal do Paraná. Palotina, 2014.

ABSTRACT

Salmonellosis is the main problem in the poultry activity. Recently an increase of *Salmonella* enterica serovar Heidelberg isolation in the field has been observed. This study tested the use of deleted live vaccine for *Salmonella* Heidelberg and a probiotic containing *Bacillus subtilis* in order to decrease the contamination in chickens, avian installations and carcasses of broiler chickens. The birds were experimentally challenged with an inoculum containing 6×10^7 CFU / mL of a wild strain of *Salmonella* Heidelberg and divided into four treatments: control (S); treated with *Bacillus subtilis* (SP), treated with deleted live vaccine (SV) and treated with vaccine and probiotic (SVP). Quantification was performed by drag swabs and cloacal swab pool, both performed at 7,14,21,28,35,42 days. After slaughter fragments of breast skin were collected for qualitative and quantitative analysis of *Salmonella*. Parts of spleen, liver and heart were collected and subjected to *Salmonella* isolation and counting. Fragments of jejunum were processed for immunohistochemistry (IHC) for counting T lymphocytes in the mucosa. Histological analyzes were performed on samples of liver, spleen, heart and intestine and lesions when present were classified as absent, mild, moderate and severe. Sections of jejunum were stain with PAS for goblet cell count, and measurement of intestinal villi and crypts. Statistical analysis was performed using the regression toward the means, which showed significant variations ($P < 0.05$) in the isolation of *Salmonella* from the cloaca. There were a linear reduction in bacterial concentration throughout the experiment in groups SP and SVP test. The S and SV groups showed a quadratic behavior with reduction in the cloaca counting at experimental days 32.3 and 17.75, respectively. The colony count of *Salmonella* on poultry manure in SV and SVP groups showed significant decrease ($P < 0.05$) throughout the experiment. The S and SP groups showed a quadratic behavior with early reduction in days 20.9 and 18.4 respectively. Statistical analyzes were performed using regression of which showed significant variations ($P < 0.05$) in the isolation of *Salmonella* from cloaca, revealing a decrease in bacterial concentration throughout the experiment in groups SP, SV and SVP. The colony count of *Salmonella* in shavings in all groups showed significant decrease ($P < 0.05$) throughout the experiment. All treatments showed significant reduction in bacterial counts in the carcass compared to the control group but didn't differ statistically. There wasn't bacterial growth in viscera samples. The villi that had the highest measurements were those of S and SP group and SVP group showed the worst result for villus height. The S group showed larger crypt depth and treatment SV statistically the worst; however, villous crypt ratio was higher in this group. At IHC all treatments had superior results compared to the S group in the count of T lymphocytes. No microscopic lesions were observed in samples of jejunum, cecum and viscera analyzed. The treatments promoted a reduction in the count of *Salmonella* in samples, and increased number of T lymphocytes. These results indicate that these tools can be important controlling the disease. In the evaluations of intestinal integrity, vaccine achieved the best results in villus / crypt ratio.

Key Word: Control, Heidelberg, immunohistochemistry, isolation, morphometry, bacterial quantification, *Salmonella*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média da contagem de salmonela em log nos dias 7, 14, 21, 35 e 42, isolada da cloaca de frangos inoculados oralmente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg submetidas a diferentes tratamentos utilizando vacina e probiótico39
- Tabela 2 - Média da contagem de salmonela em log nos dias 7, 14, 21, 35 e 42, isolada de suabe de arrasto de frangos inoculados oralmente com *Salmonella enterica sorotipo* Heidelberg submetidas a diferentes tratamentos utilizando vacina e probiótico.....40
- Tabela 3 – Estimativa da contagem de salmonela na carcaça das aves abatidas aos 42 dias de experimento sob os tratamentos avaliados.....42
- Tabela 4 – Resultados das médias do número de células calciformes e médias da mensuração da altura das vilosidades e altura de criptas do jejuno de aves com 42 dias de idade, inoculadas com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg sob os tratamentos avaliados43
- Tabela 5 – Média da contagem de linfócitos T na mucosa do jejuno de aves com 42 dias de idade, inoculadas com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg sob os tratamentos avaliados44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Microscopia de varredura de *Salmonella*. sp. Notar as projeções citoplasmáticas características dos antígenos de superfície.....17
- Figura 2.– Cobertura da cama do aviário objetivando o controle de agentes com potencial capacidade de transmissão de *Salmonella* sp.20
- Figura 3 - Matriz de corte recebendo vacina inativada contra *Salmonella Enteritidis* pela via intramuscular.27
- Figura 4 - Gráficos de dispersão das médias de isolamento de salmonela da cloaca de aves experimentalmente inoculadas. A) Grupo S inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. A partir do dia 32,3 observou-se queda na contagem de *Salmonella* na cloaca das aves. B) Grupo SP, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*. C) GrupoSV, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado. A partir do dia 17,75 observou-se queda na contagem de *Salmonella* na cloaca das aves. D) Grupo SVP, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*.....39
- Figura 5 - Gráficos de dispersão das médias de isolamento de salmonela da maravalha de aves experimentalmente inoculadas com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. A) Grupo S inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, a partir do dia 20,9 observou-se queda na contagem de *Salmonella*. B) Grupo SP, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*.A partir do dia 18,4 observou-se queda na contagem de *Salmonella* na maravalha C) Grupo SV, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado. D) Grupo SVP, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*.41
- Figura 6 – Células Caliciformes na mucosa intestinal de frangos de 42 dias inoculados oralmente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. As células caliciformes (seta) apresentam coloração vermelha em PAS (Obj.20x).42
- Figura 7 – Linfócitos CD3⁺ na mucosa intestinal de frangos de 42 dias inoculados oralmente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. A) Foram observadas células imunomarcadas na mucosa e na lamina própria do intestino, IHQ (Obj. 20). B) As células positivas apresentavam o citoplasma intensamente imunomarcado de marrom pelo cromógeno DAB, IHQ (Obj.100).....43

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	14
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1 <i>Salmonella</i> spp.....	16
2 <i>Salmonella</i> spp. na avicultura.....	18
2.1 <i>Salmonella</i> Heidelberg	18
3 Controle de <i>Salmonella</i> na avicultura.....	19
3.1 Probiótico	21
4 Vacinas.....	23
III OBJETIVO	29
1 Objetivo geral	29
IV MATERIAL E MÉTODOS.....	29
1 Local.....	29
2 Aves	30
3 Amostra bacteriana	30
4 Preparo do inoculo de <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Heidelberg.....	31
5 Quantificação do inoculo	31
6 Preparo e administração do probiótico.....	31
7 Vacinação.....	32
8 Administração do inoculo	32
9 Coleta de mecônio para isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	32
10 Suabe de cloaca.....	32
11 Suabe de arrasto.....	33

12 Coleta de pele	33
13 Coleta de coração, fígado e baço.....	33
14 Metodologias empregada no isolamento de <i>Salmonella</i> spp.	33
14.1 Pré-enriquecimento das Amostras	33
14.2 Enriquecimento Seletivo.....	34
14.3 Isolamento e Quantificação	34
15 Identificação dos isolados	34
16 Histopatologia.....	35
17 Coloração de ácido periódico de schiff (PAS)	35
18 Contagem de células calciformes.....	35
19 Morfometria intestinal	36
20 Imunohistoquímica e quantificação das imagens	36
21 Análise estatística	36
22 Delineamento experimental.....	37
V RESULTADOS	38
VI DISCUSSÃO.....	45
VII CONCLUSÕES GERAIS.....	53
VIII REFERÊNCIAS	54

I INTRODUÇÃO

O Brasil hoje é o maior exportador de carne de frango no mundo e o terceiro maior produtor, exportando carne para mais de 150 países, inclusive para mercados de alta exigência como União Europeia e Japão. Nas últimas três décadas a produção avícola tem alcançado seu desenvolvimento tecnológico, transformando-se em uma atividade altamente especializada e industrializada tornando-se uma das mais importantes fontes de proteína de origem animal no mundo (UBABEF, 2014).

A Salmonelose é uma das principais enfermidades que acometem a avicultura. A importância das salmonelas situa-se no fato de que além de perdas econômicas relacionadas à criação das aves, alguns sorotipos são agentes causadores de enfermidades sistêmicas e gastroentéricas em seres humanos (WEISS et al., 2002).

As salmonelas causadoras do Paratifo Aviário quando colonizam o trato digestivo dos frangos (alguns sorotipos de forma simbiótica) podem permanecer até o momento de abate das aves, contaminando o produto final o que pode ocasionar grave toxinfecção alimentar às pessoas que consumirem esses produtos. De forma semelhante, a infecção em galinhas poedeiras de ovos comerciais pode levar à produção de ovos contaminados, conseqüentemente levando o risco ao consumidor. Neste caso, o risco de uma toxinfecção alimentar é maior em função do hábito de se consumir ovos crus, o que não ocorre com a carne de frango (AVILA, 2005).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), com o objetivo de obter a garantia de qualidade sanitária dos produtos avícolas. Este programa prevê normas de controle e/ou erradicação das principais doenças aviárias de transmissão vertical (salmoneloses e micoplasmoses aviárias) e horizontal, como a doença de Newcastle. As normas definem medidas de monitoramento das salmoneloses em estabelecimentos avícolas de controle permanente e eventual destinados à reprodução e produção de aves e ovos férteis. Os estabelecimentos certificados deverão ser livres de *Salmonella enterica* sorotipo Gallinarum (S. Gallinarum) e de *Salmonella enterica* sorotipo Pullorum (S. Pullorum), bem como livres ou controlados para *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis (S. Enteritidis) e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (S. Typhimurium) (BRASIL, 1994).

Recentemente tem-se observado a campo um aumento da frequência de isolamento da *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg (S. Heidelberg). Esse sorotipo possui características especiais quando comparados aos demais sorotipos normalmente isolados a campo, como a formação de biofilme e alta hidrofobicidade (Rodrigues et al., 2008). Essas características vêm dificultando o seu controle através das práticas comuns de biossegurança. Com o aumento presença de *Salmonella* Heidelberg no campo temos o aumento da positividade na indústria e conseqüentemente no produto final o que pode gerar problemas as exportações de carne de frango.

Por se tratar de um microrganismo ubíquo, o controle de *Salmonella* spp. em ambiente de produção é extremamente fastidioso. O controle da *Salmonella* spp. é realizado através de medidas rigorosas de biossegurança que começam no topo da pirâmide produção e se estendem por todo o processo de produção.

O gênero *Salmonella* é uma das bactérias mais estudadas atualmente no mundo, resultando em um grande volume de publicações referente aos estudos de características da bactéria, resposta imune gerada pela bactéria e ferramentas de controle de *Salmonella* na avicultura. Por outro lado, ainda existem várias questões a serem respondidas e o controle efetivo da bactéria na cadeia produtiva de aves está longe de ser atingido com o conhecimento adquirido até o momento (Barrow et al., 2012).

A utilização de exclusão competitiva, através de probióticos e a vacinação podem fazer parte de um programa integral de controle, especialmente em situações onde a eliminação das bactérias no meio é inviável. Com a pressão internacional pela redução do uso de antimicrobianos na produção animal as pesquisas para desenvolver essas ferramentas auxiliares de controle se tornam cada vez mais importantes para a produção de aves comerciais.

Maldonado Galdeano et al., (2007) verificaram que quando incluímos microrganismos probióticos na alimentação de aves podemos alterar a composição e a atividade da microbiota intestinal do animal, modular a resposta inflamatória, melhorar a barreira intestinal inespecífica e reforçar a resposta imune da mucosa ou sistêmica.

O uso de vacinas vivas ou bacterinas tem sido utilizado como uma importante ferramenta de controle de *Salmonella* na cadeia produtiva de aves, com o objetivo de reduzir a contaminação da ave pela bactéria e conseqüentemente a possibilidade de

contaminação humana ao consumir produtos de origem avícola. Tanto as vacinas vivas quanto as bacterinas proporcionam uma boa proteção contra a infecção por *Salmonella*, porém nenhuma vacina até o momento demonstrou prevenir completamente a infecção, o que reforça a ideia que a vacina é apenas uma ferramenta auxiliar de controle, necessitando de um programa completo de biossegurança para obter um resultado satisfatório no controle da bactéria (ANDREATTI FILHO, 2012).

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é pertencente à família *Enterobacteriaceae*. São bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, bastonetes gram-negativos e oxidase negativa. O gênero *Salmonella* se divide em duas espécies, *Salmonella enterica* e *S. bongori*, que possui mais de 2500 sorotipos conhecidos. A *Salmonella enterica* se divide em seis subespécies: *S. enterica* subesp. *Enterica*, *S. enterica* subesp. *salamae*, *S. enterica* subesp. *Arizonae*, *S. enterica* subesp. *Diarizonae*, *S. enterica* subesp. *Houtenae*, *S. enterica* subesp. *Indica* (FORSHELL e WIERUP, 2006).

Salmonella spp. causa doença tanto em humanos quanto em animais. Os sorotipos *S. enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum e *S. enterica* subesp. *enterica* sorovar Pullorum são hospedeiro-específicos de aves e causam graves infecções sistêmicas, o Tifo Aviário e a Pulorose, respectivamente. Outros sorovares hospedeiro-específicos são: *Salmonella* Typhi para o homem, *Salmonella Choleraesuis* em suínos e *Salmonella* Dublin em bovinos (BARROW et al., 1996)

Salmonella enterica é a única espécie bacteriana que possui exemplos de patotipos hospedeiro-específicos e patotipos com ampla gama de hospedeiros (THOMSON et al., 2006).

Para a distinção dos sorovares, são utilizados antissoros que reagem com antígenos presentes na célula bacteriana. Existem três diferentes tipos de antígenos que podem identificar os sorovares de *Salmonella* sp.: antígeno somático (O),

antígeno flagelar (H) e o antígeno capsular de virulência (Vi) (Figura 1) (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

O antígeno somático O apresenta-se na porção mais externa da parede bacteriana e corresponde à parte antigênica da camada de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana celular de todas as bactérias Gram negativas como *Salmonella* spp. (REEVES et al., 1996; SELANDER et al., 2002). Já os antígenos H da fase um são homólogos a outras bactérias entéricas, enquanto antígenos H de fase dois são específicos do gênero *Salmonella* (BARROW, 2010).

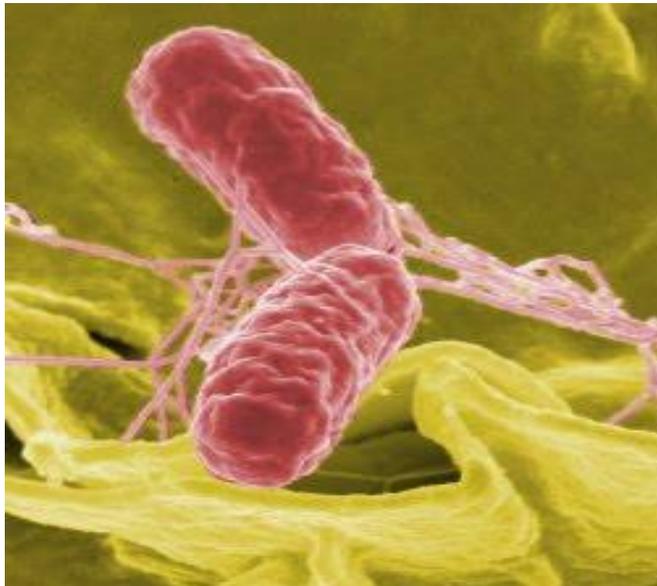


Figura 1 – Microscopia de varredura de *Salmonella*. sp. Notar as projeções citoplasmáticas características dos antígenos de superfície.

Fonte: http://www.niaid.nih.gov/SiteCollectionImages/topics/biodefenserelated/SALMON_1.JPG

O gênero *Salmonella* é resistente à dessecação e ao congelamento, podendo sobreviver no meio ambiente por anos. Os antígenos na camada de lipopolissacarídeos (LPS) facilitam o contato direto da bactéria com o ambiente, contribuindo na interação do agente com o hospedeiro, isso faz com que *Salmonella* spp. possa resistir a diferentes locais e condições, como fezes, poeira, ambientes secos, acidez do estômago, lúmen do intestino, espaço extracelular dos tecidos do hospedeiro e dentro de macrófagos (SUO et al., 2010).

Possui temperatura ótima de crescimento de 35°C a 37°C, porém ainda é possível verificar o seu crescimento em temperaturas entre 7°C e 45°C. No entanto são sensíveis a exposição dos raios solares e a maioria dos desinfetantes como

fenóis, clorados e iodados (BOROWSKY et al., 2006). A bactéria apresenta um crescimento ótimo em pH entre 6,5 e 7,5 podendo tolerar condições entre pH 4,5 e 9,0 (TORTORA et al., 2003).

2 *Salmonella* spp. na avicultura

As salmoneloses permanecem como um sério problema de saúde pública e uma das principais causas de perdas para o setor avícola. Este fato ocorre devido à patogenicidade da bactéria e também pela habilidade de se adaptar a diversos hospedeiros e permanecer no meio ambiente, dificultando assim o seu controle (MACIOROWSKI et al., 2004).

Nos últimos anos os produtos avícolas vêm se destacando na ocorrência de surtos humanos de Salmonelose. Assim, tanto a presença quanto a disseminação de *Salmonella* spp. nos alimentos representam uma relevante preocupação na indústria avícola, podendo determinar o decréscimo no consumo de carne de aves, representando uma ameaça à avicultura (IKUNO et al., 2004).

Avaliando a presença de *Salmonella* em três frigoríficos do Sul do Brasil, Dickel (2004) detectou 26,7% de positividade média, com 31,7% de positividade antes do *chiller* e 20% de carcaças positivas depois da passagem pelo *chiller*. Os sorovares identificados com a avaliação foram: S. Heidelberg (63,9%), S. Enteritidis (31,9%), *Salmonella enterica* sorotipo Worthington (2,1%) e *Salmonella enterica* sorotipo Tennessee (2,1%).

2.1 *Salmonella* Heidelberg

A *Salmonella enterica* subesp. *Enterica* sorovar Heidelberg é pertencente ao grupo de salmonelas paratíficas, este sorotipo não é específico de aves e causa doença em humanos através do consumo de carne de frango ou ovos contaminados, gerando prejuízos para a indústria, governo e riscos a saúde pública. Um dos fatores que contribui para alta incidência de salmonelas paratíficas é o alto grau de diversidade antigênica que esse gênero possui, facilitando sua adaptação a diversos hospedeiros (BERNDT et al., 2007).

No Canadá a *Salmonella* Heidelberg é um importante agente sob vista da saúde pública, alternando com a S. Enteritidis a posição de segundo e terceiro lugar

entre os sorovares mais isolados em humanos (DEMEZUK et al., 2003). Nos Estados Unidos a *Salmonella* Heidelberg é o quarto sorovar mais isolado em casos de salmonelose em humanos (CHITTICK et al., 2006).

Nascimento et al., (1996) estudaram a prevalência da *S. Heidelberg* em indústrias avícolas brasileiras e verificaram que este sorotipo está presente em 15,1% de carcaças de frangos e 26,1% de cortes de frango. Borsoi et al. (2006) em um estudo conduzido em abatedouros do sul do Brasil pesquisou a prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango de corte e verificou a presença de 32% de *S. Enteritidis* e 9% de *S. Heidelberg*.

Rodrigues et al., (2009) avaliaram 15 cepas de *S. Heidelberg*, isoladas de abatedouros, quanto a características de permanência da bactéria em plantas de processamento de aves e verificaram que todas as amostras formavam biofilme em placas de poliestireno, favorecendo a permanência da bactéria no ambiente de abate de aves.

3 Controle de *Salmonella* na avicultura

Medidas gerais como boas práticas de produção devem ser tomadas de forma a atingir todos os sorovares de *Salmonella*. A biossegurança é a principal ferramenta de controle de *Salmonella* na cadeia produtiva de aves e deve ser aplicada em todos os elos que a compõem. Se necessárias, em casos de surtos, ações mais específicas como o uso de aditivos alimentares, vacinas e antibióticos, devem ser implantadas contra sorovares de maior significância econômica ou em saúde pública (BARROW, 2007).

O objetivo final é evitar a transmissão vertical e horizontal garantindo a ausência do patógeno em aves reprodutoras e em aves de produção, diminuindo ao máximo o número de bactérias no ambiente e conseqüentemente no produto final (BERCHIERI JÚNIOR e FREITAS NETO, 2009).

Para Gast et al. (1997), várias medidas devem ser coordenadas e aplicadas simultaneamente. Devido às várias fontes de contaminação e disseminação, o controle de *Salmonella* spp. deve se basear na adoção efetiva de medidas de higiene e desinfecção, programas de monitoria em granjas reprodutoras, incubatórios e granjas comerciais.

Medidas complementares devem incluir o controle de roedores, restringir o trânsito de pessoas e veículos, evitar a criação de aves de diferentes idades e proibir outras espécies de aves, animais silvestres e domésticos. Deve-se ainda buscar um controle de moscas e outros insetos, e a adoção de programas de higiene e desinfecção efetivos. É importante lembrar que a ação de desinfetantes pode ser prejudicada pela presença de matéria orgânica e que não se deve reutilizar cama sem tratamento (BERCHIERI JÚNIOR e FREITAS NETO, 2009).

A reutilização de cama por vários lotes subsequentes é imprescindível para manter a viabilidade econômica da criação de frangos de corte. Contudo a prática deve ser realizada juntamente com adequado tratamento, a fim de minimizar a carga bacteriana da cama (DAI PRÁ et al., 2012). Thaxton et al. (2003) concluiu que a população bacteriana da cama não aumenta com a reutilização da mesma, sendo assim não existe razão microbiológica para a troca de cama de aviário após o uso.

A cobertura da cama em toda extensão do aviário apresenta bons resultados na redução de Enterobactérias e no controle de vetores como o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Figura 2) (Silva et al., 2007).



Figura 2.– Cobertura da cama do aviário objetivando o controle de agentes com potencial capacidade de transmissão de *Salmonella* sp.

3.1 Probiótico

Uma das medidas importantes a serem tomadas, no que se refere ao controle de salmonelas, é manter a integridade do trato gastrointestinal das aves. Um método que vem mostrando-se eficaz durante anos é o método da Exclusão Competitiva (EC) ou Conceito de "Nurmi". Ele consiste na administração de bactérias provenientes da microbiota intestinal de aves adultas em aves recém-eclodidas, no intuito de excluir a presença de microrganismos indesejáveis devido à aceleração da colonização intestinal por microrganismos benéficos (NURMI e RANTALA, 1973).

O conceito de probiótico compreende microrganismos vivos que, suplementados constantemente na dieta, afetam benéficamente o organismo hospedeiro, atuando no equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989). Para um probiótico ser considerado eficaz deve exercer efeito benéfico; não ser patogênico e/ou tóxico; conter um grande número de células viáveis; ser capaz de sobreviver ao processo digestivo intestinal; manter-se viável durante a estocagem até seu uso em dietas; ter boa palatabilidade ou não interferir nas propriedades sensoriais; e ser isolado ou detectado em seu hospedeiro (COLLINS e GIBSON, 1999).

O modo de ação dos probióticos ainda não foi completamente esclarecido, vários autores sugerem que os processos que ocorrem independentemente ou associados. Um destes é a exclusão competitiva, em que o probiótico competiria com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua adesão na célula alvo (CROSS, 2002).

Bactérias da microbiota intestinal e/ou componentes dos probióticos podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, que teriam ação antibacteriana especialmente em relação às bactérias patogênicas (SILVA, 2000). As bacteriocinas, foram definidas por Tagg et al. (1976), como substâncias produzidas por bactérias que apresentam ação bactericida ou antagônica a outros tipos de bactérias, e são frequentemente relacionadas com a ação dos probióticos.

As bactérias intestinais utilizam ingredientes alimentares parcialmente absorvidos pelo hospedeiro para produzir alguns ácidos orgânicos, como o propiônico, acético, butírico, láctico, bem como peróxido de hidrogênio, cujo espectro

de ação inclui também a inibição do crescimento de bactérias patogênicas Gram negativas (PRICE e LEE, 1970; CHERRINGTON et al., 1990).

As bactérias probióticas também protegem os vilos e as superfícies absorptivas contra toxinas irritantes produzidas pelos microrganismos patogênicos, permitindo, assim, a regeneração da mucosa intestinal lesada (DOBROGOSZ et al., 1991).

Profusa bibliografia, a maioria relatando estudos com bactérias ácido-lácticas, demonstra que os probióticos têm efeito imunestimulante em animais e no homem, apesar de ainda não estarem esclarecidos os mecanismos pelos quais isto ocorre (CROSS, 2002). Esse efeito sugere que os organismos probióticos interagem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino (PERDIGÓN e HOLGADO, 2000).

Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS, 2002).

Lima et al., (2007) reportou que o *Bacillus subtilis* secreta enzimas proteolíticas e lipolíticas, auxiliando o hospedeiro a digerir alguns substratos. Porém esses microrganismos apenas transitam pelo intestino juntamente com o conteúdo e não se aderem ao epitélio, atingindo o lúmen do intestino com maior número de microrganismos viáveis quando comparado ao *Lactobacillus acidophilus*. Tal comportamento deve-se, ao fato desses microrganismos estarem na forma esporulada e, conseqüentemente, não serem destruídos durante o processamento da ração. Sabe-se que o gênero *Bacillus* é resistente ao calor, umidade, calor seco, a radiação ultravioleta, a radiação gama, agentes oxidantes e pressão (KURTI, 2004), sendo de fácil obtenção e reduzido custo de produção.

Lourenço (2012) demonstrou que a utilização de *Bacillus subtilis* na dieta de aves desafiadas com *Salmonella enterica* sorotipo Minnesota (S. Minnesota) provocou aumento na expressão de células caliciformes e CD4+, representando ativação da imunidade inata constitucional e específica da mucosa intestinal das aves. No mesmo estudo verificou-se também a redução na contagem de *Salmonella* na cama 48h pós-desafio e também a redução de contagem no ceco das aves aos 35 dias de idade. Resultado semelhante foi demonstrado por Knap et al. (2011) onde aves desafiadas com *S. Heidelberg* tiveram uma redução de 58% na contagem da

bactéria no ceco, quando alimentadas com dieta suplementada com *Bacillus subtilis*.

4 Vacinas

A resposta imune para *Salmonella* depende da espécie hospedeira e do sorotipo infectante. Muito do que se conhece sobre a imunidade contra *Salmonella* é resultado de estudos sobre a infecção experimental de camundongos por *S.Typhimurium* e as informações obtidas são aplicadas em infecções causadas por outros sorotipos de *Salmonella* em aves (VAN IMMERSEEL et al., 2005).

A imunidade de mucosa do intestino é a primeira linha de defesa da ave contra a *Salmonella*. É basicamente composta por imunoglobulinas (IgA) e o Tecido Linfóide Associado à Mucosa (MALT). Depois de ultrapassada a primeira linha de defesa, a *Salmonella* desencadeia uma resposta imune sistêmica, onde, tanto os mecanismos de imunidade humoral quanto os mediados por células são ativados e desempenham papéis importantes contra infecções por esse agente (BERNDT et al., 2007).

A microbiota normal tem papel importante na estimulação do sistema imune e no amadurecimento dos componentes de defesa das aves. Estas bactérias modulam a resposta imune pelo aumento ou diminuição de mediadores secretados pelas células associadas ao intestino e pela estimulação de linfócitos T auxiliares e supressores (BERG, 1985). Quando a ave é exposta à *Salmonella* e a bactéria inicia o processo de infecção, uma rápida resposta imune humoral é desencadeada. A intensidade desta resposta pode ser afetada por vários fatores, incluindo a intensidade do desafio (HASSAN et al., 1993), a virulência do organismo (HASSAN e CURTISS, 1994b) e a via de administração e a idade do animal (Hassan e Curtiss, 1994a). Aproximadamente sete dias após o contato com a *Salmonella* já é possível detectar anticorpos no soro das aves (GAST e BEARD, 1990; HASSAN et al., 1991) e esta resposta pode persistir por dez semanas ou mais. Utilizando o teste de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), Hassan et al., (1991) descreveram que a primeira imunoglobulina a ser produzida é a IgM, seguida de IgG e IgA. Os níveis de IgM e IgA diminuem gradualmente, enquanto que os níveis de IgG podem persistir por períodos prolongados.

Existe uma forte correlação entre a produção de anticorpos e a redução da colonização por *Salmonella*, confirmando a importância do monitoramento desses anticorpos após o uso de vacinas inativadas (KAISER e LAMONT, 2001; KAISER et al., 2002). No entanto, Beal et al. (2006), demonstraram que se removermos cirurgicamente a Bursa de embriões de aves com 17 dias de incubação e posteriormente desafiar essas aves na sexta semana de idade com *S. Typhimurium*, o tempo de remoção do agente no intestino é o mesmo do grupo não bursectomizado, demonstrando que a imunidade humoral não é essencial para a eliminação desse microrganismo em desafios contra esse sorovar.

A especificidade da resposta humoral também difere em infecções por diferentes sorovares de *Salmonella*. Respostas humorais em indivíduos infectados com diferentes sorovares geraram marcadores sorológicos que demonstraram proteção cruzada para os antígenos LPS (NICHOLAS e CULLEN, 1991; BARROW et al., 1992), em muitos casos devido à presença do antígeno somático 12, presente em vários sorovares.

As salmonelas podem realizar uma fase do ciclo de vida dentro das células de seus hospedeiros, principalmente células do baço e fígado (SHEELA et al., 2003; DE BUCK et al., 2004), fato que sugere que a resposta humoral sozinha não seja capaz de debelar a infecção (DESMIDT et al., 1998). O processo de “clearance” do organismo infectado, realizado através de mecanismos imune dependentes de anticorpos como a opsonização e fagocitose, ocorre na fase extracelular da bactéria (Roitt et al., 2003).

A Imunidade celular parece ser mais importante que a imunidade humoral para a eliminação de salmonelas dos tecidos de aves, enquanto a resposta humoral, principalmente por IgA e os leucocitos polimorfonucleares parecem ser importantes na eliminação intestinal da bactéria (BARROW e WALLIS, 2000).

Van Immerseelet et al. (2002) descreveram a dinâmica da invasão da parede do ceco de pintos de um dia desafiados oralmente com *Salmonella* Enteritidis e observaram, através de imunoistoquímica, que 24 horas após o desafio havia presença de macrófagos e células T na mucosa do ceco, enquanto que os linfócitos B apareceram somente algum tempo depois.

A imunidade gerada através do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é um fator importante no sistema imunológico de aves, pois pode refletir na imunidade em outros tecidos, ou sistemas fisiológicos do organismo, contra agentes infecciosos. O GALT é um tecido exposto a antígenos do alimento, microbiota normal do intestino e patógenos. Nas aves, este tecido está presente em toda a extensão do trato gastrointestinal, porém a maior área é composta pelas placas de Peyer e tonsilas cecais. O volume de linfócitos presentes compreendem de 45% a 55% de células B e 35% de células T envolvidas na produção de anticorpos e funções de imunidade celular (BEFUS et. al., 1980). As placas de Peyer são responsáveis por regular a produção de IgA secretora, que é responsável pelo mecanismo de defesa associado a mucosa intestinal (YUN et. al., 2000).

Sheela et al. (2003) verificaram que a Imunoglobulina A (IgA), leucócitos e linfócitos associados à mucosa, constituem a primeira linha de combate a infecção causada por *S. Enteritidis* em aves. No mesmo estudo verificou também que a secreção de IgA limita a colonização da mucosa intestinal por *S. Enteritidis*, prevenindo a aderência e subsequente invasão e multiplicação da bactéria no intestino. Resultado semelhante foi descrito por Desmidt et al. (1998) trabalhando com o mesmo sorotipo e Brownell et al. (1970) trabalhando com *S. Typhimurium*.

Nas mucosas, o sistema imune pode agir por três mecanismos: a) “exclusão imune”, um termo utilizado para definir uma proteção de superfície não inflamatória em colaboração com os fatores de defesa inatos; b) regulação imune, com participação de células apresentadoras de antígenos (APC), ativação de linfócitos T e B, liberação de citocinas e c) eliminação imune, que envolve a estimulação de mediadores de células de defesa inata, assim como a produção de imunoglobulinas (BRANDTZAEG et al., 1999).

Aves jovens têm poucas células produtoras de imunoglobulinas no intestino, aumentando sua concentração como resposta à colonização do trato gastrointestinal (PARRY et al., 1977).

O objetivo da vacinação contra as salmonelas é impedir a aderência no intestino, à multiplicação e excreção da bactéria pelo organismo de aves infectadas, e também a redução da colonização de órgãos, incluindo fígado, baço e ovário.

Assim, aves vacinadas podem suportar uma infecção e eliminar pelas fezes a bactéria, mais rapidamente e efetivamente do que aves não imunizadas, favorecendo assim a diminuição da pressão de contaminação no ambiente (SCHARR, 2003).

Apesar de várias vacinas serem desenvolvidas de forma experimental, somente algumas são autorizadas para uso comercial, pois as cepas usadas para preparação dessas vacinas precisam atender algumas características para que possam ser diferenciadas das cepas de campo (conceito DIVA – “Differentiating Infected from Vaccinated Animals”), ser suficientemente imunogênicas e ainda serem eliminadas do organismo da ave antes do abate (BARROW, 2007).

A eficácia de uma vacina é avaliada pelo nível de colonização intestinal e sistêmica do agente patogênico, bem como por taxas de morbidade e mortalidade do hospedeiro infectado, pós-vacinação e infecção experimental, assim como o nível de proteção das vacinas depende da cepa desafio, da via de administração, da dose infectante, idade, espécies ou linhagens de aves utilizadas (VAN IMMERSSEEL et al., 2004).

As vacinas mortas, também conhecidas como bacterinas, podem ser preparadas contendo célula inteira ou subunidades da bactéria. Estas vacinas foram utilizadas com resultados variados para a prevenção da infecção por *Salmonella* em humanos e animais (PENHA FILHO, 2009).

Várias pesquisas avaliaram a eficácia de vacinas inativadas. Gast et al. (1992) evidenciaram que, após desafio de *S. Enteritidis*, poedeiras vacinadas com bacterina oleosa, inativada em acetona e contendo *S. Enteritidis* fagotipo 13, apresentaram menor isolamento da bactéria de baço, ovário e oviduto. Todavia a proporção da eliminação de *S. Enteritidis* nas fezes não diferiu estatisticamente do grupo de aves vacinadas (59,8%) e não vacinadas (58,8%). Resultados similares foram encontrados por Barrow et al. (1990), os quais também notaram que aves vacinadas com bacterina continuaram a excretar *S. Typhimurium* pelas fezes. Na figura 3 podemos observar a vacinação de matrizes pesadas com vacina inativada de *S. Enteritidis*.



Figura 3 - Matriz de corte recebendo vacina inativada contra *Salmonella Enteritidis* pela via intramuscular.

Fonte: Fort Dodge Saúde Animal LTDA (2008).

Bacterinas podem reduzir a mortalidade de aves por *Salmonella* no caso de Tifo e Pulose Aviária. Contudo, as vacinas vivas são consideradas, atualmente, as alternativas mais apropriadas, uma vez que também podem ser administradas oralmente. São mais efetivas em prevenir a infecção por *Salmonella*, induzindo forte resposta imune celular e humoral (sistêmica e local), contra o agente *in vivo*, enquanto bacterinas estimulam apenas a resposta imune humoral, contra antígenos produzidos *in vitro* (BARROW e WALLIS, 2000).

O uso de vacinas vivas contra salmonelas hospedeiro-específica, que causam doença severa induz a forte imunidade mediada por células (RANA e KULSHRESHTHA, 2006), devido à alta invasividade e a apresentação sistêmica de antígenos íntegros e específicos. As vacinas podem diminuir o risco a saúde pública decorrente da presença de *Salmonella* spp. em produtos de origem aviária, por meio da redução da colonização do trato reprodutor, assim como a redução da excreção fecal.

As cepas que tem sido empregada são mutantes de cepas “selvagens” defectivos em algum gene, geralmente o gene *aro A*, apresentando dificuldades em sintetizar os seus próprios aminoácidos aromáticos. Alteração essa, que deve ser permanente e permitir que a bactéria sobreviva por algum tempo no hospedeiro para provocar uma resposta imune (VAN IMMERSEEL et al., 2005).

As vacinas vivas tem como vantagem o uso massivo em criações de aves, devido ao método de aplicação, que pode ser em *spray* ou via oral na água de bebida. O que diminui muito a mão-de-obra de aplicação e favorece o uso da vacina viva na avicultura (ANDREATTI FILHO, 2012).

Ainda como vantagem as vacinas vivas apresentam reação cruzada em sorotipos de *Salmonella* como, por exemplo, a proteção contra o grupo D oferecida por aves vacinas com cepas do grupo B. E também a imunidade promovida pela vacina viva mais antiga e clássica da avicultura, a vacina viva contra *S. Gallinarum* 9R que induz imunidade cruzada contra *S. Enteritidis* (ANDREATTI FILHO, 2012).

Curtiss e Hassan (1996), usando aves SPF (*Specific Pathogen Free*), vacinadas com uma cepa atenuada de *S. Typhimurium* (x3985) e, posteriormente, desafiadas com diferentes sorovares e grupos de *Salmonella*, observaram que duas doses da vacina evitaram a colonização de órgãos para os grupos B, D, E e reduziram significativamente a colonização intestinal para o grupo C. Entretanto, a proteção cruzada foi menos evidente para antígenos flagelares, embora algum grau dessa proteção possa ocorrer (THORNS et al., 1996).

As cepas vivas atenuadas de *Salmonella*, quando administradas por via oral, podem ocupar lugar na microbiota intestinal e competir com cepas homologas selvagens durante os primeiros dias após a vacinação. Esta ação adicional da cepa vacinal ocorre durante um período crítico, quando a resposta imune é limitada (COOPER, 1994).

Babu et al. (2004), testaram a eficácia de uma vacina viva, derivada de uma cepa mutante de *S. Typhimurium* e de uma bacterina em emulsão oleosa, em aves posteriormente desafiadas com *S. Enteritidis*. No grupo em que as aves receberam a vacina viva observou-se redução de *S. Enteritidis* nos órgãos examinados e nas fezes. A vacina inativada estimulou a resposta imune humoral, mas não foi capaz de

gerar uma resposta imune mediada por células. Após o desafio, ocorreu uma grande depleção no número de linfócitos B em todas as aves, mesmo assim, observou-se que a redução de *S. Enteritidis* foi maior no grupo de aves que recebeu a vacina viva. Isso sugere que a vacina viva produza fatores que possam compensar o déficit de linfócitos B e combater a infecção por *S. Enteritidis* nas aves.

Springer et al. (2000) e Clifton-Hadley et al. (2002) demonstraram que a vacinação não resultará em uma proteção absoluta, pois o agente poderá colonizar o intestino das aves vacinadas. O benefício do uso da vacina está relacionado ao melhor preparo do hospedeiro para a uma rápida resposta imunológica e na agilidade da eliminação do agente (BARROW, 2007).

III OBJETIVO

1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência dos tratamentos com vacina viva deletada e probiótico, no decréscimo da contagem de *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg na cama, cloaca e carcaças de frangos de corte experimentalmente infectados.

IV MATERIAL E MÉTODOS

1 Local

O experimento foi realizado no Biotério de aves da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. A execução do experimento foi aprovada pela comissão de

ética e uso de animais – CEUA, sob o protocolo nº 09/2013-CEUA/ Palotina, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de experimentação (COBEA).

2 Aves

Foram utilizados 160 pintos, com um dia de idade, da linhagem Ross, provenientes de um incubatório comercial de frangos de corte. As aves foram alojadas em gaiolas experimentais, medindo 120x80 cm, com comedouro coletivo, quatro bebedouros e lâmpadas de aquecimento. Para mimetizar a situação de campo as gaiolas foram forradas com 15 cm de maravalha. As aves receberam ração e água *Ad libitum*. O manejo das aves e o programa nutricional e de luz seguiram as recomendações para a linhagem utilizada. Toda a ração e a maravalha utilizadas ao longo do experimento foram submetidas a análise microbiológica, visando principalmente à identificação de *Salmonella* spp. As análises foram executadas no laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, localizado na cidade de Palotina – PR.

3 Amostra bacteriana

Foi utilizada uma cepa selvagem de *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg isolada de um surto em uma granja comercial do estado do Paraná. Um *pool* de suabes de cloaca dessa unidade produtora foi remetido a um laboratório particular de referência¹ localizado no município de Cascavel - PR para a realização do isolamento e a sorotipificação. As colônias foram semeadas em meio de transporte e encaminhadas ao laboratório de Doenças Infecciosas dos animais domésticos da UFPR, Setor Palotina.

¹ Laboratório Mercolab, Cascavel, Paraná, Brasil.

4 Preparo do inoculo de *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg

Colônias de *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, foram replicadas em duas placas de ágar MacConkey² e incubadas a 37°C por 24h. O inoculo foi preparado adicionando-se as colônias bacterianas em 500ml de caldo nutriente³. Este foi incubado a 37°C por 24h sob agitação constante (100rpm).

5 Quantificação do inoculo

Para a quantificação do inoculo foi realizado o método das diluições seriadas. Com o auxílio de uma pipeta graduada, uma alíquota de 1 ml da solução concentrada de cultura bacteriana foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 9ml de PBS estéril (diluição 10^{-1}). Após homogeneização foi adicionado 1mL da solução primeiramente diluída (de concentração 10^{-1}) em um novo tubo de ensaio contendo 9ml de PBS estéril obtendo-se a diluição 10^{-2} . Esse procedimento foi executado sequencialmente até a diluição de 10^{-10} .

Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta estéril, retirou-se 0,1mL de cada diluição e esta foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky homogeneamente sobre a superfície de placas contendo Agar MacConkey. As placas foram acondicionadas em estufa microbiológica por 37°C por 24h. A contagem foi realizada na maior diluição em que foi possível observar colônias características isoladas.

6 Preparo e administração do probiótico

A Ração comercial utilizada, a base de milho e farelo de soja, não continha nenhum aditivo, exceto premix e foi acrescida a 8×10^5 UFC/g de *Bacillus subtilis*⁴ na

² DB DIFCO™, Agar MacConkey, cat n° 212123, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

³ DB DIFCO™, NutrientBroth, cat n° 0003-17, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

⁴Gallipro C, ZOETIS Saúde Animal, Brasil.

dose de 1kg por tonelada. Essa ração foi administrada aos grupos que receberam probiótico desde o primeiro até o último dia do experimento.

7 Vacinação

Os pintos foram vacinados logo após nascimento, por meio de aspersão, com a vacina viva deletada POULVAC® ST⁵ na dose recomendada pelo fabricante. No 14^o dia foi ministrado o reforço vacinal de forma oral, via água de bebida.

8 Administração do inoculo

No dia 1 de experimento foi inoculado 1mL do inoculo, contendo *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, diretamente no Inglúvio das aves utilizando-se uma pipeta de vidro de 1ml.

9 Coleta de mecônio para isolamento de *Salmonella* spp.

No dia da chegada dos animais o mecônio presente no fundo das caixas de transporte foi coletado e acondicionado em sacos plásticos estéreis contendo 25 ml de meio de pré-enriquecimento (Água Peptonada Tamponada⁶ estéril a 1%) para subsequente isolamento bacteriano de *Salmonella* spp.

10 Suabe de cloaca

Aos dias, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 do experimento foram realizados suabes de cloaca utilizando-se um suabe estéril. Em cada repetição dos tratamentos quatro aves eram pegas aleatoriamente e um único suabe eram introduzidos na cloaca dos animais (*pool* de cloaca). O suabe foi acondicionado em 10ml de meio de pré-enriquecimento (Água Peptonada Tamponada estéril a 1%) para subsequente isolamento bacteriano de *Salmonella* spp.

⁵ Fort Dodge Animal Health

⁶DB DIFCO™, Buffered Peptone Water, cat n° 218105, Interlab, São Paulo, SP, Brasil.

11 Suabe de arrasto

Nos dias D7, D14, D21, D28, D35 e D42 do experimento foram realizados suabes de arrasto em todas as repetições. Para tanto se utilizava um propé calçado em mão enluvada. Após passagem por toda a extensão da gaiola, o propé era acondicionado em 25ml de Água Peptonada Tamponada estéril a 1% para subsequente isolamento bacteriano de *Salmonella* spp.

12 Coleta de pele

Aos 42 de idade, após a depena e evisceração das carcaças um *pool* de fragmentos de pele de quatro frangos de cada repetição foram coletados de acordo com COSSI et al. (2012). Resumidamente, um fragmento de pele e musculatura medindo aproximadamente 3x4cm foi coletado de forma asséptica da região superior direita do peito das aves. Esses tecidos foram acondicionados em um saco estéril contendo 50ml de Água Peptonada Tamponada estéril a 1% para subsequente isolamento bacteriano de *Salmonella* spp.

13 Coleta de coração, fígado e baço

No D42 após a depena e abertura da cavidade celomática fragmentos de coração, baço e fígado de quatro aves, coletados de forma asséptica, foram acondicionados em sacos plásticos estéreis contendo 25ml de Água Peptonada Tamponada estéril a 1% para subsequente isolamento bacteriano de *Salmonella* spp.

14 Metodologias empregada no isolamento de *Salmonella* spp.

14.1 Pré-enriquecimento das Amostras

As amostras de mecônio, *pool* de suabe cloaca, suabe de arrasto, *pool* de amostras pele, *pool* de amostras de coração, *pool* de amostras de fígado e *pool* de

amostras de baço imersas em Água Peptonada Tamponada⁷ estéril a 1% foram incubadas em estufa a 37°C por 18-24 horas, sob condições normais de aeração (Galdino, 2010).

14.2 Enriquecimento Seletivo

Alíquotas de 1ml, provenientes do pré-enriquecimento, foram transferidas para 10 ml de caldo Selenito⁸ e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas, sob condições normais de aeração (Galdino, 2010).

14.3 Isolamento e Quantificação

Após o enriquecimento uma amostra de 1ml do meio seletivo foi diluída decimalmente em 9ml de solução salina estéril, pH7,4 (PBS) na proporção de 1:10 até a diluição de 10⁻⁸. De cada diluição foram retiradas duas gotas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril. Estas foram semeadas com alça de Drigalsky homogeneamente sobre a superfície de placas de Petri contendo meios seletivos Ágar verde brilhante⁹ (AVB) e Ágar MacConkey 4¹⁰. As placas foram incubadas a 37°C por 24h sob condições normais de aeração. O número de colônias por meio seletivo foi transformado em Log de base 10 para a tabulação dos resultados.

15 Identificação dos isolados

As colônias suspeitas de *Salmonella* sp. foram identificadas pelas características morfológicas e bioquímicas. Para as provas bioquímicas foram utilizados os meios Triple Sugar Iron agar¹¹ (TSI) e caldo uréia¹². Os meios foram semeados e incubados em estufas por 18-24 horas a 37°C, sob condições normais de aeração (Clarke e Gyles, 1993; Bessa et al., 2004).

⁷DB DIFCO™, Buffered Peptone Water, cat n° 218105, Interlab, São Paulo, SP, Brasil.

⁸DB DIFCO™, Selenite Broth, cat n° 218581, Interlab, São Paulo, SP, Brasil.

⁹DB DIFCO™, Brilliant Green Agar, cat n° 228530, Interlab, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁰DB DIFCO™, Agar MacConkey, cat n° 212123, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

¹¹DB DIFCO™, Triple sugar ironagar, cat n° 226540, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

¹²DB DIFCO™, UreaBroth, cat n° 227210, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

Semanalmente uma amostra de suabe de cloca e uma amostra de suabe de maralha positiva para *Salmonella* de cada tratamento foram enviadas para um laboratório de referência para a isolamento e sorotipificação da cepa.

16 Histopatologia

A avaliação histopatologica seguiu o protocolo preconizado por LUNA et al. (1968). Amostras de fígado, coração, baço, ceco e jejuno, oriundas de quatro animais de cada repetição, foram fixadas em uma solução de formol tamponado a 10%, embebidas em parafina e processadas em cortes de 5µm de espessura para coloração por hematoxilina e eosina (H&E). As amostras foram analisadas quanto à presença de células inflamatórias e necrose tecidual e as lesões quando presentes foram quantificadas de acordo com a sua intensidade: ausente, leve, moderada, acentuada (AFIP, 2010).

17 Coloração de ácido periódico de schiff (PAS)

Cortes de 5 µm de espessura de quatro fragmentos de jejuno de cada repetição foram submetidos a coloração de PAS para evidenciação das células caliciformes. Os tecidos foram desparafinizados e hidratados, posteriormente foram submetidos a uma solução de 0,5% de ácido periódico para oxidação. Após sucessivas lavagens foram corados com Reativo de Schiff por 30min, lavados e contracorados com hematoxilina de Harris (CULLING et al., 1985).

18 Contagem de células caliciformes

Para a contagem das células caliciformes foram analisadas as imagens de quatro fragmentos de jejuno de cada repetição. As imagens foram capturadas por meio de microscopia de luz (Olympus DX1000), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus 5.2 – Média cibernética). Foram selecionados dez campos aleatórios e a partir dessas imagens as células caliciformes marcadas foram contabilizadas e destes valores foi obtida uma média.

19 Morfometria intestinal

A altura das vilosidades e a profundidade das criptas foram medidas nas amostras de jejuno (a partir da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel) os quais foram presos e abertos longitudinalmente em placas de isopor e lavados com soro fisiológico. Após fixação em formol tamponado a 10% as amostras foram processadas rotineiramente para a coloração de hematoxilina e eosina de acordo com Luna et al. (1968). Cada fragmento foi submetido a cortes semi-seriados de 5 µm de espessura. Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas por meio de microscopia de luz (Olympus DX1000), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus 5.2 – Média cibernética). Foi mensurada a altura de 20 vilos e a profundidade de 20 criptas de cada repetição por segmento e destes valores foi obtida uma média.

20 Imunohistoquímica e quantificação das imagens

Lâminas silanizadas com secções de 3 µm de jejuno foram submetidas à técnica de imunohistoquímica (IHQ). utilizando a Streptavidina¹³ marcada e anticorpo primário Anti-CD3¹⁴ na diluição de 1:750, de acordo com metodologia previamente descrita por LOURENÇO (2011).

A quantificação de células CD3+ do epitélio intestinal foi realizada em microscopia de luz, em sistema analisador de imagens (MoticImage Plus 2.0 – Motic China GroupCo. 2006) acoplado ao microscópio (Olympus America INC., NY, USA). A quantificação de células CD3+ foi realizada por campo (aumento de 100X) nos fragmentos intestinais. A técnica de IHQ e a contagem de linfócitos T na mucosa do jejuno foi realizada no laboratório Imunova localizado na cidade de Curitiba- PR.

21 Análise estatística

Os resultados relacionados à contagem bacteriana total da cloaca, maravalha, pele e vísceras foram realizados através do teste de regressão das

¹³Dako LSAB+ System –HRP Biotinnylated, cat n° K0690, INVITROGEN, Carpinteria, USA.

¹⁴Dako, CD3 primary antibody, cat n° C7067, INVITROGEN, Carpinteria, USA.

médias ($P < 0,05$). As avaliações morfométricas do jejuno e a contagem das células calciformes foram realizadas através do teste F e as médias de cada tratamento comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

22 Delineamento experimental.

Para o experimento os pintos foram divididos em 16 gaiolas com dez aves cada, totalizando quatro tratamentos com quatro repetições. Os tratamentos foram:

- GRUPO (S) - Controle positivo; inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg.
- GRUPO (SV) - inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado.
- GRUPO (SP) - inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*.
- GRUPO (SVP) - inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*.

No dia -1D do experimento foi realizada a coleta de mecônio presente no fundo das caixas de transporte segundo Zancan et al. (2000) para comprovar a ausência de *Salmonella* spp. Com o objetivo de quantificar e identificar a *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg na maravalha, suabes de arrasto foram realizados semanalmente ao longo do experimento: D7, D14, D21, D28, D35 e D42. Neste mesmo intervalo foram coletados suabes de *pool* de cloaca de cada gaiola para quantificar a *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg nas aves.

No D42, oito aves de cada box foram abatidas. Quatro aves foram destinadas para a coleta de amostras de pele, coração, baço e fígado que foram coletados para quantificação de *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. Das outras quatro, amostras de jejuno, ceco, fígado, baço e coração foram coletados e processados para análise histológica, morfometria intestinal e contagem de células calciformes.

V RESULTADOS

Todas as amostras de ração, maravalha e mecônio submetidas a análise microbiológica para o isolamento de *Salmonella enterica*, ao longo do experimento foram negativas.

A taxa de mortalidade observada foi de 14%, mas nenhuma das mortes estava relacionada à infecção por *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. Todas as aves foram necropsiadas e amostras de tecido foram submetidas a análise histológica e microbiológica. Das 28 aves, 16 foram diagnosticadas com colibacilose e oito foram a óbito devido à síndrome ascítica.

O isolamento bacteriano revelou o crescimento de colônias incolores e translúcidas no ágar MacConkey e rosáceas translúcidas ou ligeiramente opacas no ágar Verde brilhante, sendo essas características de *Salmonella* sp. Todas as amostras de colônias coletadas com as características acima citadas foram positivas para *Salmonella* nas provas bioquímicas empregadas.

Na Tabela 1 são apresentadas as médias das contagens de colônias em suabe de cloaca realizado aos 7, 14, 21, 28, 35, e 42 dias de experimento. Em todas as amostras houve crescimento de *Salmonella*. No D7 pode-se observar que os tratamentos SP e obtiveram uma contagem significativamente maior de salmonela que os demais e o grupo S (controle) apresentou a menor contagem entre os tratamentos. Aos 14 dias os tratamentos SV e SVP apresentaram contagens significativamente maiores que os demais grupos. Aos 21 dias o tratamento S apresentou resultado superior aos demais grupos que não diferiram estatisticamente. Aos 28 dias os grupos S, SVP e apresentaram as maiores contagens de colônias de salmonela e os tratamentos SV e SP não foram estatisticamente diferentes. Aos 35 dias os tratamentos obtiveram contagens estatisticamente iguais. Aos 42 dias o grupo S apresentou resultado estatisticamente superior quando comparados aos demais grupos.

Tabela 1 - Média da contagem de salmonela em log nos dias 7, 14, 21, 35 e 42, isolada da cloaca de frangos inoculados oralmente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg submetidas a diferentes tratamentos utilizando vacina e probiótico

Tratamento	Dias de avaliação						Equação de Regressão
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	
S	1,22x10 ^{8a}	3,70x10 ^{6a}	1,78x10 ^{9b}	5,72x10 ^{9b}	6,20x10 ^{7a}	1,55x10 ^{9b}	$y = e^{2,49+0,0323x-0,0005x^2}$
SP	1,97x10 ^{9b}	1,41x10 ^{8a}	8,10x10 ^{7a}	1,93x10 ^{8a}	2,26x10 ^{8a}	2,12x10 ^{6a}	$y = e^{3,0353-0,01x}$
SV	2,39x10 ^{8a}	5,86x10 ^{8b}	7,53x10 ^{7a}	2,56x10 ^{8a}	4,45x10 ^{7a}	1,08x10 ^{6a}	$y = e^{2,721+0,0213x-0,0006x^2}$
SVP	4,11x10 ^{8b}	3,49x10 ^{8b}	9,26x10 ^{7a}	3,55x10 ^{8b}	1,06x10 ^{7a}	3,77x10 ^{6a}	$y = e^{2,9852-0,0067x}$

Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as médias. S (inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg); SP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*); SV (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado); SVP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*).

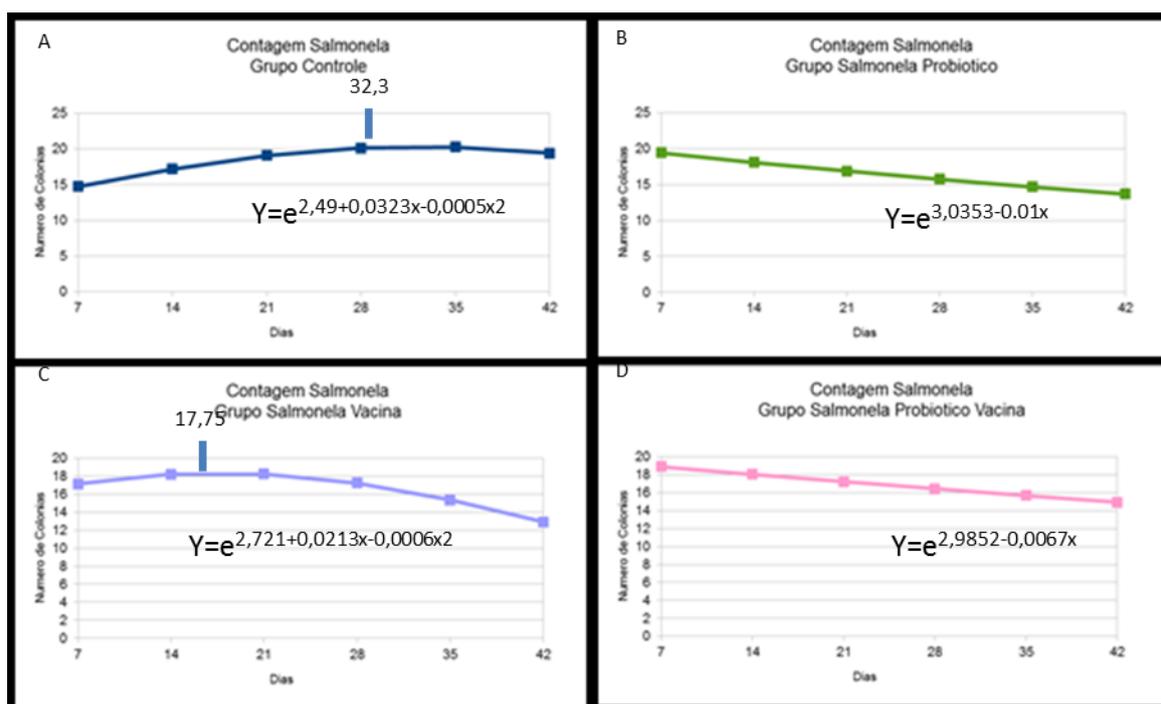


Figura 4 - Gráficos de dispersão das médias de isolamento de salmonela da cloaca de aves experimentalmente inoculadas. A) Grupo S inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. A partir do dia 32,3 observou-se queda na contagem de *Salmonella* na cloaca das aves. B) Grupo SP, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*. C) GrupoSV, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado. A partir do dia 17,75 observou-se queda na contagem de *Salmonella* na cloaca das aves. D) Grupo SVP, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*.

A análise das médias do isolamento de salmonela da cloaca revelou variações significativas na concentração bacteriana, ao longo do experimento nos grupos SP,

SV e SVP respectivamente. Os grupos SP e SPV apresentaram uma diminuição da contagem de salmonela com decréscimo linear contínuo, quando comparadas as médias de isolamento do D7 e D42 do experimento (Gráfico 1B e 1D). Já o grupo SV apresentou um comportamento quadrático com aumento até o dia 17,75 onde iniciou um declínio contínuo até o final do experimento (Gráfico 1C). O grupo S também apresentou um comportamento quadrático, com aumento no valor das médias até o dia 32,3 e decréscimo constate até o dia 42 (Gráfico 1A).

Os resultados do suabe de arrasto realizado sob a maravalha, que compunha o ambiente de criação das aves, revelou que aos 7 dias o tratamento que recebeu apenas vacina (SV) obteve uma maior contagem de *Salmonella enterica* que os demais grupos, característica essa observada também aos 14 dias. Aos 21 dias todos os tratamentos apresentaram contagens de *Salmonella* menores que o grupo controle (S). Aos 28 dias os grupos SV e SVP apresentaram menores contagens que os demais grupos. Aos 35 dias os tratamentos SP e SVP obtiveram as menores contagens entre os grupos avaliados. Aos 42 dias não houve diferença estatística entre os grupos de tratamentos (Tabela 2). O grupo controle apresentou um comportamento quadrático durante o período de experimento, com isolamento crescente de colônias até o dia 20,9 com tendência de decréscimo até a última coleta aos 42 dias. Comportamento que também foi observado no grupo SP, onde o isolamento crescente ocorreu até o dia 18,4. Os grupos SV e SVP obtiveram um comportamento linear de decréscimo ao longo das coletas.

Tabela 2 - Média da contagem de salmonela em log nos dias 7, 14, 21, 35 e 42, isolada de suabe de arrasto de frangos inoculados oralmente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg submetidas a diferentes tratamentos utilizando vacina e probiótico

Tratamento	Dias de avaliação						Equação de Regressão
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	
S	1,66x10 ^{8a}	1,58x10 ^{9a}	9,07x10 ^{9b}	5,33x10 ^{9b}	2,69x10 ^{8b}	5,65x10 ^{6a}	$y = e^{2,6657+0,0335x-0,0008x^2}$
SP	8,35x10 ^{7a}	1,04x10 ^{8b}	3,37x10 ^{8a}	8,47x10 ^{8b}	1,5x10 ^{6a}	2,79x10 ^{7a}	$y = e^{2,7716+0,0184x-0,0005x^2}$
SV	1,49x10 ^{9b}	3,11x10 ^{9a}	2,71x10 ^{8a}	1,10x10 ^{7a}	2,13x10 ^{8b}	4,30x10 ^{7a}	$y = e^{3,0989-0,080x}$
SVP	4,13x10 ^{7a}	3,95x10 ^{8a}	5,55x10 ^{7a}	2,08x10 ^{8a}	6,85x10 ^{5a}	1,83x10 ^{7a}	$y = e^{2,9354-0,0058x}$

Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as médias. S (inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg); SP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*); SV (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado); SVP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*).

Através dos gráficos de regressão (Gráfico 2), é possível observar que a contagem de colônias de salmonela na maravalha apresentou um decréscimo significativo ao longo do experimento nos grupos S, SP, SV e SPV. Ao reunir as médias dos tratamentos ao longo do experimento, nota-se no gráfico de dispersão que somente os grupos SP e SV obtiveram uma diferença estatística significativa de contagem ao longo do tratamento (Gráfico 2F).

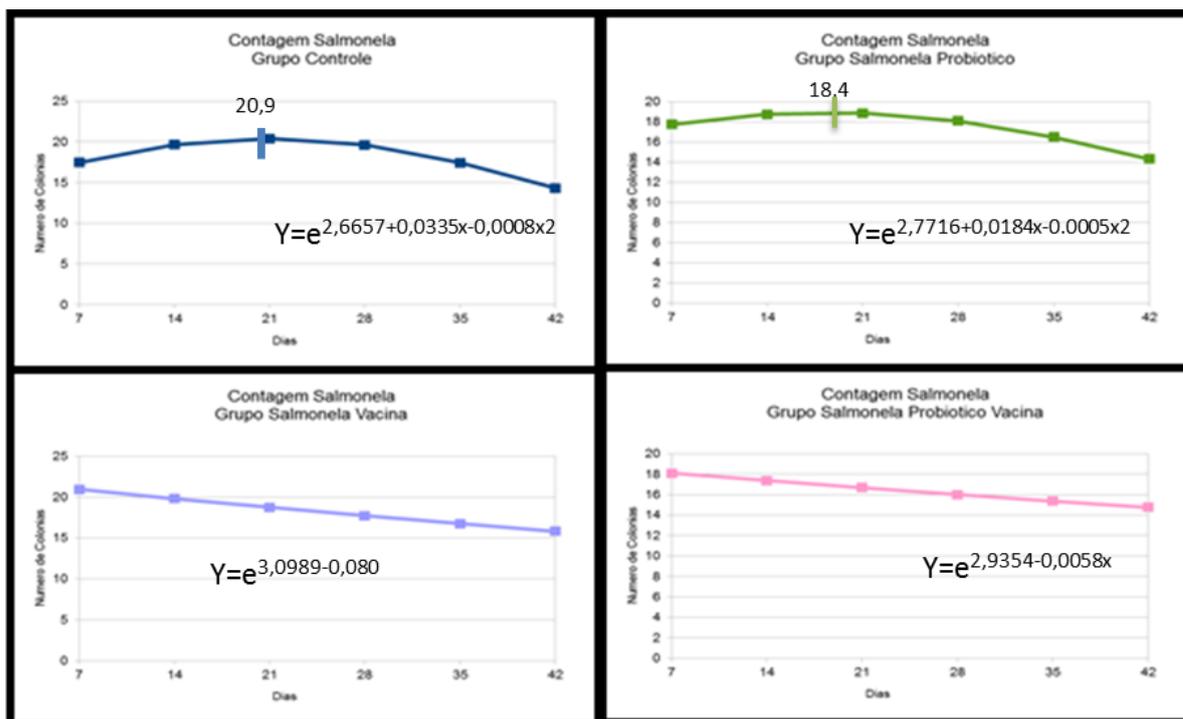


Figura 5 - Gráficos de dispersão das médias de isolamento de salmonela da maravalha de aves experimentalmente inoculadas com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. A) Grupo S inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, a partir do dia 20,9 observou-se queda na contagem de *Salmonella*. B) Grupo SP, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*. A partir do dia 18,4 observou-se queda na contagem de *Salmonella* na maravalha C) Grupo SV, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado. D) Grupo SVP, inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*.

Os resultados das médias da contagem de salmonela na carcaça de frangos de corte após abate estão representados na Tabela 3. Podemos observar que todos os tratamentos apresentaram redução significativa na contagem bacteriana quando comparados aos grupos controles. Apesar de não existir diferença estatística significativa entre os grupos SP, SV e SVP nota-se que a menor média é observada no grupo SV.

As amostras de fígado, baço e coração coletadas após o abate das aves no D42 não apresentaram crescimento de colônias bacterianas.

A coloração de PAS revelou claramente a presença de células caliciformes, coradas em vermelho na mucosa do jejuno tendo como fundo o tecido intestinal contra corado de azul (Figura 4).

Tabela 3 – Estimativa da contagem de salmonela na carcaça das aves abatidas aos 42 dias de experimento sob os tratamentos avaliados

Tratamento	Salmonela	CV
S	17,93 ^b (± 3,82)	3,45
SP	14,02 ^a (± 3,66)	2,83
SV	11,96 ^a (± 3,24)	2,03
SVP	11,97 ^a (± 3,98)	2,97

Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as médias. S (inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg); SP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*); SV (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado); SVP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*). CV; coeficiente de variação.

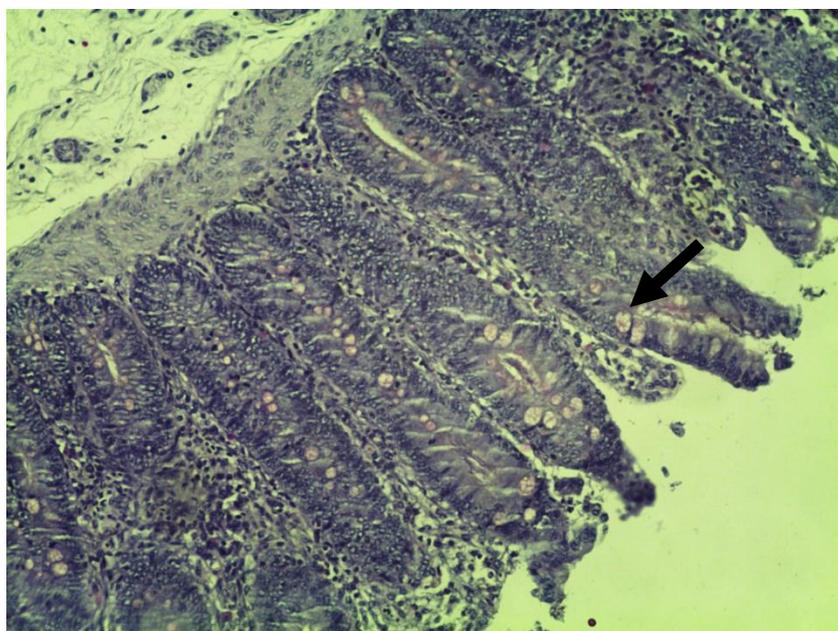


Figura 6 – Células Caliciformes na mucosa intestinal de frangos de 42 dias inoculados oralmente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. As células caliciformes (seta) apresentam coloração vermelha em PAS (Obj.20x).

Na Tabela 4 estão expressos os resultados referentes a contagens de células caliciformes e morfometria intestinal. O grupo SVT apresentou um número inferior na contagem de células caliciformes que os demais grupos. As vilosidades que tiveram as maiores mensurações foram as do grupo S e SP e o grupo SVP apresentou o pior resultado para altura de vilosidade. o Grupo controle (S) apresentou a maior profundidade de cripta e o tratamento SV estatisticamente a pior.

Tabela 4 – Resultados das médias do número de células caliciformes e médias da mensuração da altura das vilosidades e altura de criptas do jejuno de aves com 42 dias de idade, inoculadas com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg sob os tratamentos avaliados

Análise/Grupo	S	SP	SVP	SV	CV
Células caliciformes	332,10 ^a (± 9,94)	324,30 ^a (± 19,45)	321,34 ^a (± 21,14)	259, ^b (± 28,56)	16,07
Vilosidades	1074,79 ^a (± 71,29)	1011,54 ^a (± 35,52)	744,56 ^b (± 54,40)	971,95 ^b (± 54,82)	16,19
Criptas	180,48 ^a (± 7,17)	166,86 ^b (± 9,26)	140,12 ^b (± 13,52)	123,14 ^b (± 11,87)	19,57
Vilo/Cripta	6,02 ^a (± 0,58)	6,11 ^a (± 0,38)	5,52 ^a (± 0,80)	8,02 ^b (± 0,53)	1,09

Letras diferentes nas linhas representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as médias. S (inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg); SP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*); SV (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado); SVP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*); CV - coeficiente de variação.

O resultado da IHQ revelou marcação difusa leve a moderada de linfócitos CD3+ distribuídos tanto na mucosa como na lâmina própria do jejuno (Figura 5A). As células positivas apresentaram imunomarcção citoplasmática, evidenciada pela coloração marrom (Figura 5B).

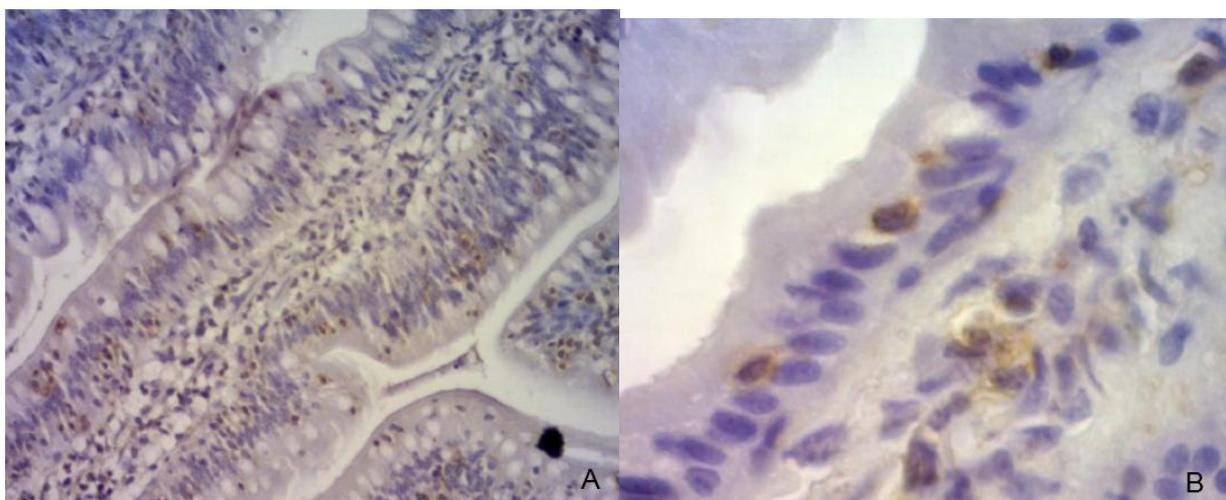


Figura 7 – Linfócitos CD3⁺ na mucosa intestinal de frangos de 42 dias inoculados oralmente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg. A) Foram observadas células imunomarcadas na mucosa e na lamina própria do intestino, IHQ (Obj. 20). B) As células positivas apresentavam o citoplasma intensamente imunomarcado de marrom pelo cromógeno DAB, IHQ (Obj.100).

Na tabela 5 podemos observar os resultados referentes à média da contagem de células CD3+ nas amostras de jejuno. Nota-se que todos os tratamentos tiveram resultados superiores em relação ao controle na contagem de linfócitos T, sendo que os tratamentos SV e SP apresentaram maior contagem.

Tabela 5 – Média da contagem de linfócitos T na mucosa do jejuno de aves com 42 dias de idade, inoculadas com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg sob os tratamentos avaliados

Tratamento	Média Linf. T	CV
S	13 ^c ($\pm 0,99$)	8,20
SP	32,8 ^a ($\pm 1,46$)	12,20
SV	35,44 ^a ($\pm 1,75$)	14,69
SVP	22,92 ^b ($\pm 1,26$)	7,56

Letras diferentes na coluna representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as médias. S (inoculado somente com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg); SP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*); SV (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg e vacinado); SVP (inoculado com *Salmonella enterica* sorotipo Heidelberg, vacinado e tratado com probiótico contendo *Bacillus subtilis*), CV - coeficiente de variação.

Não foram observadas lesões histológicas nas amostras de jejuno, ceco, fígado, coração e baço analisadas através da coloração de H&E.

VI DISCUSSÃO

Ao final de cada semana, durante o período de experimento, uma cepa positiva de suabe de cloaca e de maravalha foi enviada a um laboratório de referência para a sorotipificação e 100% das cepas foram identificadas como *S. Heidelberg*. As amostras de suabe da maravalha utilizada como substrato para formação da cama e de toda ração utilizada durante o experimento também foram negativas para *Salmonella*, o que nos leva a concluir que não houve contaminação cruzada por outras salmonelas durante o período de criação das aves.

A mortalidade de 14% registrada durante o experimento ocorreu de forma aleatória entre os grupos, o que indica que o tratamento utilizado não possui influência direta na mortalidade. Aproximadamente 57% das aves mortas tiveram diagnóstico de Colibacilose após análise microbiológica e histológica. Esta enfermidade ocorre com frequência na avicultura industrial. Durante o período de criação das aves não foi utilizado nenhum tipo de tratamento com antibiótico, seja terapêutico ou profilático, o que aumenta a probabilidade de ocorrência da enfermidade (GUNNER et al., 2004). A causa mais provável de contaminação neste caso é a vertical. Segundo Ito et al. (2007) a contaminação do ovo pela bactéria pode acontecer durante a ovoposição se estendendo até a fase de incubação, culminando na infecção do pinto e desenvolvimento do quadro de colibacilose.

Cerca de 28% das mortes foi por Ascite, doença metabólica comum na criação de frangos de corte. A distribuição da mortalidade por ascite também foi aleatória entre os grupos, sugerindo que não há relação com os tratamentos utilizados. Gonzáles e Macari (2000) afirmam que o percentual de mortalidade pode ser elevado nos lotes submetidos a condições que favorecem o desencadeamento do problema: hipóxia, ventilação deficiente, frio, estresse e crescimento rápido com bom desempenho inicial. Acreditamos que nos períodos mais frios do experimento a falta de circulação adequada no ambiente propiciou ao desenvolvimento dos casos de ascite observados.

A metodologia bacteriológica utilizada para isolamento de *Salmonella*, segundo a portaria número 212 e Instrução normativa número 22 prevê seis fases de processamento das amostras sendo elas: pré-enriquecimento, enriquecimento

seletivo, isolamento em meio sólido, seleção de colônias suspeitas, identificação bioquímica e sorológica (BRASIL, 1995). No presente trabalho não foi realizada a fase de identificação sorológica em 100% das amostras, devido à inoculação de apenas um sorotipo de *Salmonella* e ao baixo risco de contaminação cruzada, porém todas as amostras enviadas a um laboratório de referência durante o experimento foram positivas para *S. Heidelberg*.

Os meios utilizados foram o Ágar MacConkey e Ágar Verde Brilhante, sendo o segundo considerado um meio altamente seletivo e recomendado para isolamento de vários sorotipos de *Salmonella* exceto o sorovar Typhi. O crescimento de outras bactérias é quase completamente inibido pela presença da tintura verde brilhante que facilmente diferencia a colônia característica de *Salmonella* das outras presentes no meio (DIFCO, 1984).

A avaliação de métodos de isolamento de *Salmonella* realizada por Kingston (1980) comparou resultados obtidos entre amostras de suabes de arrasto e suabes de cloaca. O resultado mostrou maior eficiência na detecção de salmonelas através do método de suabe de arrasto, recuperando maior número de amostras positivas e apresentando menos custo de aplicação. No presente estudo, ambos os métodos foram eficientes no isolamento de *Salmonella*, possibilitando o isolamento da bactéria em todas as coletas semanais realizadas. O grupo S (controle) apresentou um crescimento constante na contagem de *Salmonella* na cloaca até a coleta do dia 32,3, posteriormente apresentou uma leve tendência de diminuição até o dia 42, semelhante aos grupos tratados. Acredita-se que esse comportamento, na fase final do experimento, se deva a maturidade do sistema imune da ave frente ao desafio gerado pela *S. Heidelberg*. Os casos de isolamento de *S. Enteritidis* na avicultura ocorrem, geralmente, nas aves jovens ou sob condições de estresse, raramente em aves adultas. A resistência a salmonelose em aves aumenta com a idade, possivelmente, devido ao desenvolvimento da flora intestinal normal e do sistema imune com o avanço da idade (CORRIER et al., 1991; SMITH e TUCKER, 1980; ZIPRIN et al., 1989). Aves jovens têm poucas células produtoras de imunoglobulinas no intestino, aumentando sua concentração como resposta à colonização do trato gastrointestinal (PARRY et al., 1997).

No exame de suabe de arrasto, a contagem de colônias de *Salmonella* na maravalha os grupos S e SP apresentaram um crescimento constante até os dias 20,9 e 18,4, respectivamente, com uma tendência de diminuição até o dia 42.

Comportamento semelhante aos observados no grupo S (controle) no suabe de cloaca, sugerindo que a excreção de *Salmonella* pelas aves tem relação direta com o volume de bactérias que é isolado no ambiente. Essa diminuição discreta observada no grupo S pode ter ocorrido devido aos fatores como atividade de água, umidade, pH, e concentração de amônia que interferem nos resultados de contagem de *Salmonella* na cama aviária (CARR et al., 1995). Já nos demais grupos acredita-se que tenha relação direta com os tratamentos empregados.

O grupo SP, que teve o uso de probiótico na ração como tratamento, obteve a maior contagem bacteriana na cloaca aos 7 dias, porém ao longo do experimento a contagem apresentou uma redução linear contínua e aos 42 dias atingiu a menor valor numérico entre todos os tratamentos. Resultado semelhante foi encontrado por Knap et al. (2011) que avaliaram através de suabe de cloaca aos 42 dias de idade, aves de corte que receberam dieta suplementada com *Bacillus subtilis* e foram desafiadas com S. Heidelberg, o resultado foi uma decréscimo de 3 logs na contagem de *Salmonella* no grupo tratado e a redução de 58% no número de amostras positivas. Muniz et al. (2013) pesquisando a eficiência de quatro probióticos comerciais no controle de S. Minnesota, verificaram a redução de 76,04% e 62,09% no número de amostras positivas em aves tratadas com ração contendo *Bacillus subtilis*, redução de 46,27% em ração contendo cepas de *Lactobacillus* e *Enterococcus faecium* e 73,45% em produto contendo apenas *Enterococcus faecium*, em cecos de aves aos 35 dias. Portanto podemos concluir que o *B. subtilis* apresenta alta eficiência no controle de *Salmonella* na criação de frangos de corte.

O isolamento de colônias de salmonela na cloaca do grupo tratado somente com a vacina foi estatisticamente semelhante ao grupo que recebeu SP e SVP aos 42 dias do experimento e estatisticamente menor que o grupo S, indicando a eficiência da vacina na redução da eliminação de *Salmonella* pelas aves. O aumento exponencial observado na contagem da cloaca e da maravalha nesse grupo durante os primeiros dias de tratamento, pode estar relacionado ao somatório das bactérias inoculadas no D1 associadas às bactérias da cepa vacinal que foi administrada as aves no D1 e D14. Segundo Alderton et al. (1991) a cepa vacinal utilizada é autolimitante na ave e no ambiente de criação de aves, não permitindo isolamento após o 14^o “pós inoculação.

Uma das vantagens de se utilizar vacinas vivas é a proteção cruzada entre sorotipos oferecida pela cepa vacinal. No presente estudo observamos que utilizando uma cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium obtivemos uma redução na contagem da bactéria em cloaca de frangos de corte aos 42 dias de idade. Resultado semelhante foi encontrado por Hassan e Curtiss (1994), utilizando a mesma cepa vacinal, imunizaram aves e, duas semanas após, obtiveram proteção contra o desafio com salmonelas de sorotipos homólogos como *S. Enteritidis*, *Salmonella enterica* sorotipo Agona, *Salmonella enterica* sorotipo Bredeney e *S. Heidelberg* e contra sorotipos heterólogos como *Salmonella enterica* sorotipo Hadar, *Salmonella enterica* sorotipo Montivideo e *Salmonella enterica* sorotipo Anatum. Em outro experimento em aves de postura, porém com a mesma cepa, Hassan e Curtiss (1994a), vacinaram galinhas na 2ª e na 4ª semana de idade e avaliaram a proteção resultante contra o desafio de amostras selvagens de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* no 3º, 6º, 9º e 12º meses de idade, mostrando que a vacina induziu a uma excelente proteção contra a invasão e/ou contaminação intestinal, visceral, do trato reprodutivo e dos ovos por *Salmonella*.

Ao final do experimento os tratamentos não apresentaram redução significativa na contagem de *Salmonella* na maravalha, porém aos 35 dias de idade os grupos que receberam probiótico como tratamento (SP e SVP) apresentaram redução na contagem em relação ao controle e ao grupo que recebeu apenas a vacina. Resultado que pode ter sido obtido a partir da característica de esporulação e colonização do ambiente que o probiótico utilizado possui. O *Bacillus subtilis* tem a capacidade de esporular logo que as condições do meio não são favoráveis (um só esporo por célula vegetativa); o que lhe oferece a vantagem de ser muito resistente no meio ambiente. O fenômeno de esporulação ao contrário que acontece pelas espécies do gênero *Clostridium*, não é inibido pelo oxigênio (INGRAHAM, 2010). Sendo assim, podemos supor que a viabilidade deste probiótico na criação de frangos de corte seja maior do que outras cepas.

Outro fator que interfere na contagem de *Salmonella* na cama aviária é a reutilização da cama (Muniz et al., 2014). Quando as aves são criadas em uma cama reutilizada, possivelmente a colonização por bactérias normais da flora ocorre antes da infecção por *Salmonella*. Snoeyenbos et al. (1985), descreveram que fatores como a colonização das bactérias da microbiota intestinal normal, antes do desafio, limita eficazmente a infecção por *Salmonella*, mas não previne totalmente

quando o desafio for superior a 10^6 UFC/ave. No presente estudo utilizamos maravalha nova para formação da cama, fator que pode ter favorecido o desenvolvimento de *Salmonella* tanto no intestino das aves como no ambiente de criação. Em uma situação normal de campo, alojando aves sob uma cam; reutilizada poderíamos ter uma menor pressão de infecção pela *Salmonella*, devido a colonização prévia do intestino das aves pelas bactérias da cama e ao menor número de bactérias ingeridas pela ave, uma vez que a situação parece promover uma menor exposição da bactéria do que a inoculação direta no esôfago.

Os grupos que utilizaram vacina e probiótico (SVP) como tratamentos não apresentaram diferença estatística, no suabe de cloaca e maravalha, quando comparado a cada ferramenta de controle separada. O uso de cepa vacinal atenuada apresenta como vantagem adicional à possibilidade de ser aplicada via oral em aves recém-eclodidas, o que lhe permite colonizar o trato digestivo rapidamente em função da ausência de uma flora microbiana normal. Fato que impede o estabelecimento de uma infecção por *Salmonella* através de um efeito de exclusão e não em função de uma resposta imune específica (AVILA 2005). Efeito este semelhante ao do probiótico, o que nos leva a supor que as duas ferramentas de controle de *Salmonella* podem competir pelo mesmo sítio de ligação no enterócito, diminuindo a eficiência de ambas as formas de controle quando utilizadas simultaneamente.

Com relação à contagem de salmonela na carcaça das aves, todos os tratamentos empregados apresentaram resultados satisfatórios ao final do experimento. Foi observada também uma redução numérica expressiva nos grupos que receberam vacina, porém os tratamentos não se diferenciaram estatisticamente nesta análise.

As células caliciformes são responsáveis pela manutenção da camada de muco, este atua como um meio de proteção físico e biológico contra patógenos e é considerado componente da resposta imune inata que é regulada em resposta à inflamação e infecção por agentes patogênicos (UNI et al., 2003). Esta camada de muco, formada por glicoproteínas, pode conter substâncias antimicrobianas e imunoglobulinas IgA provenientes de plasmócitos da lâmina própria que auxiliam na eliminação de patógenos (BAURHOO et al., 2007). No presente estudo, não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos que receberam o probiótico *Bacillus subtilis* (SP e SVP) e o grupo controle, sugerindo que o uso de probióticos em ração

de frango de corte não altera o número de células caliciformes no intestino da ave na idade de 42 dias, porém pode ter efeito estimulatório em animais jovens. Muniz et al. (2013) em estudo comprovando a eficiência de quatro diferentes probióticos no controle de *S. Minnesota*, verificou que aos 7 dias de idade a quantidade de células caliciformes na mucosa do íleo e ceco das aves era estatisticamente maior nos grupos que receberam o probiótico, porém aos 35 dias de idade não ocorreu diferença entre o grupo controle e os grupos que receberam probióticos. O aumento de número de células caliciformes no sétimo dia de idade da ave, promovendo uma melhor resposta inata, pode ser importante para a prevenção e/ou diminuição da infecção por *Salmonella*, uma vez que aves jovens são mais suscetíveis à bactéria (CORRIER et al., 1991).

O grupo vacinado se diferenciou estatisticamente dos demais com menor número de células caliciformes, resultado este que sugere que a cepa vacinal diminuiu a produção de células caliciformes. Acreditamos que uma maior estimulação do sistema imune celular e humoral provocado pela vacina diminui a necessidade de expressão do sistema imune inato, do qual faz parte as células caliciformes, porém estudos mais específicos devem ser realizados para comprovação.

A proliferação dos organismos patogênicos leva a um espessamento da parede intestinal e a redução do tamanho das vilosidades, uma forma de defesa, com conseqüente redução da eficiência absorptiva intestinal que, na prática, resulta em piora na conversão alimentar e no ganho de peso dos animais (FURLAN et al, 2004). O tamanho das vilosidades no grupo SV foi menor quando comparado aos demais tratamentos, porém obteve uma maior relação vilo/cripta. Esse resultado pode inferir em maior ganho de peso e melhor conversão alimentar, porém em um trabalho realizado por Coloe et al. (1994) não evidenciaram vantagens zootécnicas da vacina sobre animais não vacinados. O nosso estudo não objetivou a avaliação de ganho de peso e conversão alimentar das aves ao longo experimento, portanto estudos futuros deverão ser realizados para esclarecer se existe influência.

Em relação à profundidade de criptas, o grupo controle (S) obteve o maior resultado, sugerindo uma maior agressão à mucosa intestinal no grupo inoculado com salmonela que não recebeu nenhum tratamento. Segundo, Hancock (1990) a profundidade da cripta é um indicativo do nível de hiperplasia das células epiteliais, sendo que a redução da profundidade indica um menor nível de agressão à

morfologia da parede intestinal. O aumento da proliferação celular nas criptas determinar o aparecimento de enterócitos imaturos, que apresentam baixa capacidade absorptiva, bem como reduzida atividade das enzimas (BUTS, et al., 1987).

Segundo Van Immerseelet et al. (2002), quando ocorre o encontro de células epiteliais especializadas com microorganismos patogênicos, rapidamente há estímulo para a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias que atraem células imunológicas inatas, como granulócitos e macrófagos, que são responsáveis por reações imunológicas, como o aparecimento de linfócitos T. Correlaciona-se o aumento de linfócitos T com uma melhor proteção da ave frente ao desafio apresentado pela *Salmonella* (ANDREATTI FILHO, 2012). Todos os tratamentos obtiveram um resultado estatisticamente superior na contagem de linfócito T em relação ao controle, sugerindo melhor resposta imune da ave frente ao desafio gerado pelo patógeno. Porém os melhores resultados foram observados nos grupos SP e SV, que apresentaram a maior quantidade de linfócitos T na mucosa intestinal.

A *Salmonella* é considerada microrganismo intracelular facultativo, pois algumas amostras sobrevivem dentro dos fagossomos, indicando que a imunidade celular seja mais importante que a humoral durante o processo de infecção por amostra selvagem ou vacinal, pois vacinas vivas são mais efetivas do que bacterinas na indução da resposta imune celular. Já o uso de microorganismos probióticos, segundo Maldonado Galdeano et al. (2007), quando incluídos nos alimentos, podem influenciar a composição e atividade da microbiota intestinal, modular a resposta inflamatória, melhorar a barreira intestinal inespecífica e reforçar ou modular as respostas imunes da mucosa ou sistêmica. Muniz et al. (2011) em um trabalho com probióticos no controle de *S. Minnesota*, verificou que aos 7 dias de idade as aves a quantidade de linfócitos T eram estatisticamente maior nos grupos que receberam o probiótico.

Segundo Hirsh (2003) algumas cepas de salmonelas tem habilidade de sobreviver e replicar dentro de macrófagos, condição que favorece o seu deslocamento até órgãos como o fígado, baço e coração. Borsoi (2011) em estudo comparando duas cepas de *S. Heidelberg* e uma de *S. enteritidis* verificou que as duas cepas de *S. Heidelberg* foram isolados no fígado de aves 6h após inoculação, sugerindo que esta via sistêmica faz parte patogenia deste sorotipo. No presente estudo não houve isolamento de *Salmonella* nas amostras de órgãos coletados,

sugerindo que a cepa vacinal utilizada não tem característica de persistência e/ou invasividade em órgãos de aves.

Nas amostras destinadas ao exame histopatológico não se observou alterações em fígado, coração, baço, ceco e jejuno. Segundo Berchieri Jr. (2000) a infecção por salmonelas paratíficas raramente produzem sinais clínicos ou lesões nas aves adultas já em aves jovens as chances de manifestação da doença clínica são maiores, onde se observa elevação da mortalidade, presença de diarreia, porém sem graves consequências.

VII CONCLUSÕES GERAIS

Avaliando os resultados do presente estudo podemos concluir que o uso da bactéria probiótica *B. subtilis* na alimentação de frango de corte contribuiu para a redução da pressão de infecção por *S. Heidelberg* no suabe de cloaca aos 42 dias de idade, suabe de arrasto aos 35 dias e de carcaça após o abate das aves, em relação ao grupo controle. Além de aumentar a contagem de Linfócitos T no jejuno quando comparado a aves do grupo controle.

A administração de uma cepa viva atenuada de *S. Typhimurium* promoveu a redução na contagem de aves inoculadas com *S. Heidelberg*, no suabe de cloaca aos 42 dias e na carcaça após abate quando comparado com o grupo controle. Aumentando também a contagem de Linfócitos T quando comparado ao grupo controle, o que promove uma melhor imunidade celular a ave, favorecendo o processo de eliminação do patógeno em questão.

A associação entre probiótico e vacina teve, na maioria dos indicadores, um desempenho inferior ao resultado dos tratamentos individuais, porém mais estudos devem ser realizados para compreender o mecanismo de interação entre eles.

Todos os tratamentos empregados foram eficientes na redução da contagem de *S. Heidelberg* na carcaça, sugerindo que o uso dos mesmos, aliadas as boas práticas de produção, pode ser uma ferramenta efetiva no controle de salmonelose na avicultura comercial, tendo como benefício a redução do risco de transmissão do patógeno ao consumidor.

VIII REFERÊNCIAS

AFIP. **Contributor Manual**. Disponível em: <<http://www.afip.org/consultation/resources/AFIPManual40-40.pdf>>. Acesso em: 02 mar. 2010.

ALDERTON, M. R.; FALEY, K. J.; COLOE, P. J. Humoral responses and salmonellosis protection in chickens given a vitamin - dependent *Salmonella typhimurium* mutant. **Avian Dis**, Kennett Square, v. 35, p. 435-442, 1991.

ANDREATTI FILHO, R. L. Vacinas contra *Salmonella*: vantagens e desvantagens. *Avicultura industrial*, Itu, SP: Gessulli, v.103, n.1211, Avicultura, Maio. 2012.

AVILA, L. A. F. **Redução do nível de contaminação por *Salmonella Enteritidis* em frango de corte**. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005 15 p. 23 p. 24 p.

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**, Laurel, v. 101, n. 3-4, p. 251-257, 2004.

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

BARROW, P. A.; WALLIS, T. S. Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In: Wray, C. (Ed.). **Salmonella in domestic animals**. Oxford: CAB International, 2000, v. 1, p. 323-339.

BARROW, P. A.; JONES, M. A.; SMITH, A. L.; WIGLEY, P. The long view: *Salmonella* – the last forty years. **Avian Pathol**, v. 41, n.5, p. 413-420, 2012.

BARROW, P. A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. cap.14, p. 231-257.

BARROW, P. A. *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathol**, v. 36, n. 1, p. 1-13, feb. 2007.

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

BARROW, P. A.; BERCHIERI, A., JR.; AL-HADDAD, O. Serological response of chickens to infection with *Salmonella gallinarum* - *S. pullorum* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Dis**, Kennett Square, v. 36, n. 2, p. 227-36, Apr.-Jun. 1992.

BAURHOO, B., A. Letellier, X. Zhao, and C. A. Ruiz-Feria. Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and *Escherichia coli* populations after in vivo *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. **Poult Sci** 86:2509-2516, 2007.

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, feb. 2006.

BEFUS, A.D.; JOHNSTON, N.; LESLIE, G.A.; BIENENSTOCK, J. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches, **J Immunol**, Baltimore, v.125, n. 6, p. 2626-2632, 1980.

BELIAVSKAIA, V.A. et al. Adjuvant properties of subalin, a recombinant interferon-producing probiotic. **Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii I Immunobiologii**, Moskva, v.78, n.6, p.77-82, 2001.

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

BERG, R. D. Indigenous intestinal microflora and host immune response. **EOS J Immunol and Immunopharmacol**, v. 4, p. 161-168, 1985.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, V. Chicken Cecum Immune Response to *Salmonella* Enterica Serovars of Different Levels of Invasiveness. **Infect Immun**, Washington, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos abatidos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesq Vet Brasil**, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.

BOROWSKY, L.M.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.I.; AVANCINI, C.A.M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodo for. **Ciênc Rural**, v. 36, p.1474-1479, 2006.

BORSOI, A.; MORAES, H.S.; SALLE, C.T.P.; BETTIOL, G.; E.; LEAL, D.M.; NASCIMENTO, V.P. Sorovares de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas e swab de arrasto. **Rev Brasil Ciênc Avícola**, Santos, 2006. Suplemento.

BORSOI, A.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following Broiler Chick inoculation: Evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. **Brazil J Microbiol**, v. 42, p. 266-273, 2011.

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

BRANDTZAEG, P.; BAEKKEVOD, E. S.; FARSTAD, I. N.; JAHNSEN, F. L.; JOHANSEN, F. E.; NILSEN, E. M.; YAMANAKA, T. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments. **Immunol Today**, v. 20, p. 141-151, 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária Programa Nacional de Sanidade Avícola. Portaria nº 193 de 19 de setembro de 1994. Atos Legais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 set. 1994. Seção 1, p. 14309-14312.

BUTS, A. R.; CROOM J.R.; FAN, W. J. et al. Jejunal glucose absorption is enhanced by epidermal growth factor in mice. **J Nutr**, v. 124, p. 231-240, 1994.

CARR, L. E.; MALLINSON, E. T.; TATE, C. R.; et al. Prevalence of *Salmonella* in broiler flock: effect of litter water activity, house construction and waterind devices. **Avian Dis**, v. 39, p. 39-44, 1995.

CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; CHARLES, O. T. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa StateUniversity, 1993. p. 133-153.

CLIFTON-HADLEY, F. A.; BRESLIN, M.; VENABLES, L. M.; SPRIGINGS, K. A.; COOLES, S. W.; HOUGHTON, S.; WOODWARD, M. J. A laboratory study 40 of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. **Vet Microbiol**, v. 89, n. 2-3, p. 167-79, oct. 2002.

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; CHOPRA, I. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v.68, p.69–74, 1990.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R. V.; FRY, A. M. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **J Food Prot.**, v. 69, p.1150–1153, 2006.

COLLINS, M. D.; GIBSON G. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **Am J Clin Nutr**, v. 69, p.1052S–1057S, 1999.

COLOE, P.J., N.L. Gerraty, W. Christopher, M.R. Alderton, and S.C. Smith. Vaccination of poultry with *salmonella* typhimurium STM-1. **Laboratory and field evaluations**. Proc. 43rd West. Po. Dis. Conf. p. 37-39. 1994.

COOPER, G. L. Salmonellosis infection in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines – a review. **Vet Bull**, Weybridge, v. 64, n. 2, p. 123-143, 1994.

CORRIER, D. E.; ELISSALDE, M. H.; ZIPRIN, R. L.; DELOACH, J. R. Effect of immunosuppression with cyclophosphamide, cyclosporin, or dexamethasone on *salmonella* colonization of broiler chicks. **Avian Dis**, v. 35, p. 40-45, 1991.

CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunol Med Microbiol**, Amsterdam, v.34, n.4, p.245-253, 2002

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. **Cellular pathology technique**. 4 ed. London: Butterworths, 1985. p. 111-152.

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, nov. 1996.

DAI PRA, M.A.; ROLL, V.F.B. **Cama de aviário: utilização, reutilização e destino**. Porto Alegre: Manas/Evangraf, 2012. 86p.

DEMEZUK, W.; SOULE, G.; CLARK, C. Phage-based typing scheme for *Salmonella* enteric Serovar Heidelberg, a causative agent of food poisonings in Canada. **J Clin Microbiol**, v.41, n.9, p.4279-4284, 2003.

DE BUCK, J.; VAN IMMENSEEL, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 233-245,. 2004.

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

DICKEL, E.L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate 2004**. 137f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DIFCO MANUAL. **Dehydrated culture media reagentes for microbiology**. 20 ed. Detroit, p.115, 1984.

DOBROGSZ, W. J.; BLACK B. L.; CASAS, I. A. Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 70, 158p. 1991.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Rio de Janeiro: Editorial Acribia, 1996.

FREITAS NETO, O. C.; MESQUITA, A. L.; PAIVA, J. B.; ZOTESSO, F.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Control of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in laying hens by Inactivated *Salmonella enteritidis* vaccines, **Brazil J Microbiol**, v. 39, p. 390-396, 2008.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. **Rev Sci Tech**, Paris, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

FULLER R., Probiotics in man and animals. **J Appl Bacteriol**, v. 66, p.365-378, 1989.

FORT DODGE Saúde Animal Ltda. **MANUAL Poulvac SE e Poulvac SE-ND-IB**. Campinas: São Paulo, 2008.

FURLAN, L. R.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 2004, Balneário Camboriú. **Anais...** Balneário Camboriú: 2004. p. 6-28.

GALDINO, V. M. C. A. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em lotes de galinhas de postura comercial vacinadas e não vacinadas contra *Salmonella enteritidis***. 2010. 75f. Dissertação - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2010.

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

GAST, R. K.; BEARD, C. W. Production of *Salmonella enteritidis*-contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Dis**, v. 34, n. 2, p. 438-46, apr.-jun. 1990.

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

HANCOCK, J. D.; PEO JR, E. R.; LEWIS, A. J.; MOXLEY, P. A. Effects of ethanol extraction and heat treatment of soybean flakes on function and morphology of pig intestine. **J Anim Sci**, v. 68, p. 3244–3251, 1990.

HASSAN, J. O.; CURTISS, R., 3RD. Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent *Salmonella typhimurium* strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p. 5519-27, dec. 1994a.

HASSAN, J. O.; CURTISS, R., 3RD. Virulent *Salmonella typhimurium*-induced lymphocyte depletion and immunosuppression in chickens. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 2027-36, may 1994b.

HASSAN, J. O.; PORTER, S. B.; CURTISS, R., 3RD. Effect of infective dose on humoral immune responses and colonization in chickens experimentally infected with *Salmonella typhimurium*. **Avian Dis**, v. 37, n. 1, p. 19-26, jan.-mar. 1993.

HASSAN, J. O.; MOCKETT, A. P.; CATTY, D.; BARROW, P. A. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: bacteriology and immune responses. **Avian Dis**, v. 35, n. 4, p. 809-19, oct.-dec. 1991.

HIRSH, D.C. *Salmonella*. In: HIRSH, D.C.; ZEE Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, c2003. cap. 10, p. 159-73.

HOLT, P.S.; GAST, R.K.; KELLY-AEHLE, S. Use of a live attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine to protect hens against *Salmonella enteritidis* infection while undergoing molt. **Avian Dis**, v. 47, p. 656-661. 2003.

IKUNO, A. A.; KANASHIRO, A. M. I.; KIYOTA, S.; CASTRO, A. G. M.; FERREIRA, V. C. A. Multiplex PCR for accurate diagnosis of poultry infection by using *Salmonella* *invA*, *sefA*, *spvC* genes sequences as molecular markers. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v. 71, p. 265-267, 2004.

KAISER, M. G.; LAKSHMANAN, N.; WING, T.; LAMONT, S. J. *Salmonella enterica* serovar enteritidis burden in broiler breeder chicks genetically associated with vaccine antibody response. **Avian Dis**, v. 46, n. 1, p. 25-31, jan.-mar. 2002.

KAISER, M. G.; LAMONT, S. J. Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure. **Poult Sci**, v. 80, n. 8, p. 1105-8, aug. 2001.

KINGSTON, D. J. Comparison of culturing drag swab and litter for identification of infections with *Salmonella* spp. in commercial chicken flocks. **Avian Disease**, v. 25, n. 2, p. 513-516, 1980.

KURTI P.; LUND, B. S. Hansen, and Efficacy of Gallipro A microbial feed additive for broilers. In: Proc Eur Symp Poult Nutr, 15. 2005. **Anais...** Budapest: World's Poultry Science Association, 2005.

KNAP, I. ; KEHLET, A. B.; BENNEDSEN, M.; MATHIS, G. F. C.; HOFACRE, L.; LUMPKINS, B. S.; JENSEN, M. M.; RAUN, M.; LAY, A. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poul Sci**, v. 90, p. 1690–1694, 2011.

INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. **Introdução à microbiologia**: uma abordagem baseada em estudos de caso. São Paulo: Cengage Learning, 2010. XXp.

LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S.; NOUJAIM, J.C.; BARROS, M.R.; CROCCI, A.J. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **Can J Vet Res**, v. 71, p. 103-107, 2007.

LOURENÇO, M. C. **Quantificação de Linfócitos T na mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com mananoligossacarídeos e desafiados com *Salmonella* Enteritidis**. 2011. Dissertação (Mestrado em ??) – Universidade Federal do Paraná, 2011. Disponível em: www.cpgcv.agrarias.ufpr.br/dissertacoes.htm.

LUNAA, L. G. Routine Staining Procedures. In: Luna, L. G. (Ed). **Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw- Hill Book Co, 1968. p. 24-58.

MALDONADO GALDEANO, C.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; VINDEROLA, G.; BIBAS BONET, M.E.; PERDIGÓN, G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. **Clin Vaccine Immunol**, v.14, p.485 – 492, 2007.

MACIOROWSKI, K. G.; Jones, F. T.; Pillai, S. D.; Ricke, S. C. Incidence, sources, and control of food-borne *Salmonella* spp. in poultry feeds. **World's Poul Sci J**, v. 60, p.446-457, 2004.

MUNIZ, E.; MESA, D.; CUASPA, R. Presence of *Salmonella* spp. in reused broiler litter. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 27, n. 1, p. 12-17, 2014.

NASCIMENTO, V. P. Salmonelose aviárias: uma revisão. In: Simpósio de Produção de Matrizes de Corte, 1. **Anais...** Chapecó: 1995. p.51-61.

NICHOLAS, R. A.; CULLEN, G. A. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. **Vet Rec**, v. 128, n. 4, p. 74-6, jan. 1991.

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

PARRY, S. M.; ALLEN, W. D.; PORTTER, P. Intestinal immune response to *E. coli* antigens in germ-free chicken. **Immunol**, v. 32, p. 731-741, 1997.

PENHA FILHO, R. A. C. Utilização de um mutante atenuado de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar GALLINARUM cobScbiA para proteção de aves contra a infecção por *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovares Gallinarum e Enteritidis P399u. 2009. Dissertação - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2009.

PERDIGÓN, G.; HOLGADO, A.P.R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: **Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p.213-233.

PRICE, R. J.; LEE, J. S. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **J Milk Food Technol**, v. 33, p. 13-8, 1970.

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. **Vet Microbiol**, Haryana, v. 115, n. 1-3, p. 156-162, 2006.

REEVES, P. R.; HOBBS, M.; VALVANO, M. A.; SKURNIK, M.; WHITFIELD, C.; COPLIN, D.; KIDO, N.; KLENA, J.; MASKELL, D.; RAETZ, C. R. H.; RICK, P. D. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. **Trends in Microbiol**, Oxford, v. 4, n. 12, p. 495-503, 1996.

RODRIGUES, L. B. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Sci Vet**, v. 37, n. 3, p. 225-230, 2008.

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

SELANDER, R.K.; LI, J.; NELSON, K. Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. In: NEIDHARDI, F.C.; CURTISS, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN, E.C. C.; SHARR, H. Controle de *Salmonella* na União Européia. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2003, p. 357-368.

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

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

SILVA, E. N. Probióticos e Prebióticos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2000,. **Anais**., 2000. p. 242.

SILVA, V.S.; VOSS, D.; COLDEBELLA, A. et al. **Efeito de tratamentos sobre a carga bacteriana de cama de aviário reutilizada em frangos de corte**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. 4p.

SMITH, H. W.; TUCKER, J. F. The virulence of *Salmonella* strains for chickens: their excretion by infected chickens. **J Hyg**, Cambridge, v. 84, p. 479-488, 1980.

SNOEYENBOS, G.H.; WEINACK, O.M.; SOERJADI, A.S. et al. Large-scale trial to study competitive exclusion of *Salmonella* in chickens. **Avian Dis**, v.29, p.1004-1011, 1985.

SPRINGER, S.; LEHMANN, J.; LINDNER, T.; THIELEBEIN, J.; ALBER, G.; SELBITZ, H. J. A new live *Salmonella enteritidis* vaccine for chickens - experimental evidence of its safety and efficacy. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 113, n. 6, p. 246-52, jun. 2000.

SUO, B.; HE, Y.; TU, S. I.; SHI, X. A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Salmonella* sp., *Escherichia coli* o157, and *Listeria monocytogenes* in meat products. **Foodborne Pathog Dis**, v. 7, n. 6, p. 619-628, 2010.

TAGG J.R.; Dajani, A. S.; Wannamaker, L. W. Bacteriocins of gram positive bacteria. **Bact Rev**, v. 40, p. 722- 56, 1976.

THAXTON, Y.V.; BALZLI, C.L.; TANKSON, J.D. Relationship of broiler flock numbers to litter microflora. **J Appl Poul Res**, v. 12, p. 81-84, 2003.

THOMPSON, K. L.; APPLGATE, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of Broiler. **Poult Sci**, v. 85, p. 1535–1540, 2006.

THORNS, C. J.; TURCOTTE, C.; GEMMELL, C. G.; WOODWARD, M. J. Studies into the role of the SEF14 fimbrial antigen in the pathogenesis of *Salmonella enteritidis*. **Microb Pathog**, v. 20, n. 4, p. 235-46, apr. 1996.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. P. 324

UBABEF – União Brasileira de Avicultura; **Relatório Anual.**, 2014. Disponível em: <em:<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and Posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poul Sci**, v.82, p.320–327, 2003.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* enteritidis strain. **Dev Comp Immunol**, v. 26, n. 4, p. 355-64, may. 2002.

VAN IMMERSEEL, F.; MEULEMANS L.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; VELGE, P.; BOTTREAU, E.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. **Bacteria-host interactions of *Salmonella* Paratyphi B** *Salisbury*aan, v. 132, n. 2, p. 239-243, 2004.

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, dec. 2005.

WEISS, L.H.N.; CARDOSO, R.B.; COSTA, M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesq Vet Bras**, v. 22, p.104-108, 2002.

YUN, C.H.; LILLEHOJ, H.S.; LILLEHOJ, E.P. Intestinal immune responses to coccidiosis. **Dev Comp Immunol**, New York, v. 24, n. 2-3, p. 303-324, 2000.

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

ZIPRIN, R. L.; CORRIER, D. E.; ELISSALDE, M. H. Maturation of resistance to salmonellosis in newly hatched chicks: inhibition of cyclosporine. **Poul Sci**, Champaign, v.68, p. 1637-1642, 1989.