

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA CAMARGO LOURENÇO

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS DE FRANGOS DESAFIADOS
COM DIFERENTES SOROVARES DE *SALMONELLA ENTERICA***

CURITIBA

2016

MARIANA CAMARGO LOURENÇO

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS EM FRANGOS DESAFIADOS
COM DIFERENTES SOROVARES DE *SALMONELLA ENTERICA***

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Clínica, cirurgia e sanidade animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

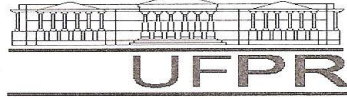
Orientação: Prof^a Dr^a Elizabeth Santin

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

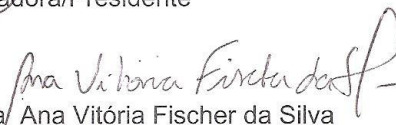


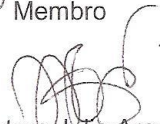
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada “**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS DE FRANGOS DESAFIADOS COM DIFERENTES SOROTIPOS DE *Salmonella enterica***” apresentada pela Doutoranda **MARIANA CAMARGO LOURENÇO** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata Nota para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

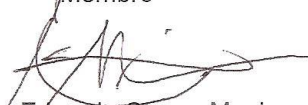
Curitiba, 16 de dezembro de 2016


Professora Dra. Elizabeth Santin
Orientadora/Presidente


Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva
Membro


Professora Doutora Julia Arantes Galvão
Membro


Professora Doutora Lucy Ono
Membro


Doutor Eduardo Correa Muniz
Membro

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos e me encorajar nos momentos difíceis.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão durante esta caminhada.

À minha orientadora Dra. Elizabeth Santin pelo aprendizado e incentivo.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, na pessoa do seu coordenador Prof. Fabiano Montianni Ferreira, e à todos os professores deste Programa por todos os ensinamentos durante esses anos.

Aos colegas de pós-graduação pelo auxílio nesta pesquisa.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia por estarem sempre prontos a cooperar.

.

À Fundação CAPES e ao programa Ciência Sem Fronteiras pela oportunidade de realizar doutorado sanduíche no exterior.

RESUMO

São conhecidos atualmente mais de 2500 sorovares de *Salmonella*, sendo que as salmoneloses em humanos podem estar relacionadas ao consumo de produtos derivados de frango contaminados com tal microrganismo durante as diversas fases da cadeia de produção avícola. O controle deste patógeno apresenta-se bastante complexo, pois além das práticas de biosseguridade, cepas diferentes respondem de forma ímpar frente às ferramentas de controle como antimicrobianos, ácidos orgânicos, probióticos e prebióticos. Além disso, observa-se alta variabilidade no que diz respeito à endemicidade, genética e fontes de infecção. A presente tese está dividida em 2 capítulos. A Introdução aborda os aspectos básicos sobre a bactéria, epidemiologia e formas de controle. No capítulo 1 foram comparadas as alterações histológicas em frangos desafiados com *Salmonella enterica*, bem como a resposta de aves frente à infecção por diferentes cepas de *Salmonella* Enteritidis e Heidelberg utilizadas como desafio. Já no capítulo 2 foi avaliado o efeito de um prebiótico a base de mananligossacarídeos na resposta imune, histologia da mucosa intestinal e no controle de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e sorovar Minnesota em frangos experimentalmente desafiados.

Palavras-Chave: frangos, histologia, imunidade, prebiótico.

ABSTRACT

There are over than 2500 serovars of *Salmonella* with an important relation between salmonellosis in humans. The consumption of poultry products contaminated with this microorganism during all process phases throughout the poultry production chain. The control of this pathogen is very complex due to variables such as biosecurity practices and the different responses of the strains when exposed to varied mechanisms of control: antimicrobials, organic acids, probiotics and prebiotics. Besides, there are high variability on epidemiologic data, diagnosis, genetic and sources of infection. The present thesis is divided in two chapters. The Introduction is about bacteria, epidemiology and forms of control. The first chapter compared histological alterations in chickens challenged with *Salmonella enterica* and immune response against different strains of *Salmonella* Enteritidis e Heidelberg used as challenge. In the second chapter it was evaluated the effect of a mananoligosaccharides prebiotic on chicken's immune response, intestinal mucosa histology and control of *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Minnesota on chicken experimentally challenged.

Key-words: broiler, histology, immunity, prebiotic.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DE FRANGOS DESAFIADOS COM DIFERENTES CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO DE AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

FIGURA 1 – FOTOMICROGRAFIA DO FÍGADO DE FRANGOS NÃO DESAFIADOS (A) E DESAFIADOS COM <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> CEPA A (B) AOS 21 DIAS	28
FIGURA 2 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE PRESENÇA DE <i>SALMONELLA</i> E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO FÍGADO DAS AVES NOS DIFERENTES TRATAMENTOS	30
FIGURA 3 – DISPERSÃO DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM CECO AS 16 HORAS PI, 14 E 21 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS	36
FIGURA 4 – FOTOMICROGRAFIA DO CECO DE FRANGOS NÃO DESAFIADOS E DESAFIADOS COM <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> CEPA A AOS 14 DIAS	37
FIGURA 5 – MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DA EXPRESSÃO DE IL6, IL8, IL10 E IL 12 EM FÍGADO E CECO DE FRANGOS AS 16 HORAS PI NOS DIFERENTES TRATAMENTOS	39

CAPÍTULO 2 – RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PREBIÓTICO DERIVADO DE *SACHAROMYCES CEREVISIAE* DESAFIADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS* OU MINNESOTA

FIGURA 1 - RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE IL10 E IL12 EM FÍGADO E CECO DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PREBIÓTICO A BASE MOS	57
FIGURA 2 - FOTOMICROGRAFIA DO ÍLEO DE FRANGOS NÃO SUPLEMENTADOS (A) E SUPLEMENTADOS COM PREB (B) AS 0 HORAS PI	59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DE FRANGOS DESAFIADOS COM DIFERENTES CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO DE AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

TABELA 1 - ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS AVALIADAS EM FÍGADO E ÍLEO ...	24
TABELA 2 – SEQUÊNCIA DOS PRIMERS DE CITOCINAS	25
TABELA 3 – MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DE PESO MÉDIO (PM) AOS 21 DIAS, GANHO DE PESO MÉDIO (GPM) CONSUMO DE RAÇÃO MÉDIO (CRM) E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) NO PERÍODO DE 14 A 21 DIAS DE VIDA NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	26
TABELA 4 – PORCENTAGEM (%) DE PRESENÇA EM FÍGADO E MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DA CONTAGEM DE COLÔNIAS DE <i>SALMONELLA</i> EM CECO AOS 14 E 21 DIAS DE VIDA NOS DIFERENTES TRATAMENTOS	27
TABELA 5 – MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM FÍGADO AS 16 HORAS PI, 14 E 21 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS....	29
TABELA 6 – MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM ÍLEO AS 16 HORAS PI, 14 E 21 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS	32
TABELA 7 – MÉDIA \pm ERRO-PADRÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM CECO AS 16 HORAS PI, 14 E 21 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	35
TABELA 8 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (R) ENTRE ANÁLISE HISTOLÓGICA NO FÍGADO E ÍLEO DAS AVES E DE DESEMPENHO (GPM, CRM E CA ¹) NOS DIFERENTES PERÍODOS.....	40
TABELA 9 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (R) ENTRE ANÁLISE HISTOLÓGICA E DE QUANTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA NO CECO DAS AVES NOS DIFERENTES PERÍODOS.....	42

CAPÍTULO 2 – RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PREBIÓTICO DERIVADO DE *SACHAROMYCES CEREVISIAE* DESAFIADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS* OU MINNESOTA

TABELA 1 – SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> DE CITOCINAS	53
TABELA 2 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DO GANHO DE PESO (GP) DE FRANGOS DESAFIADOS AOS 8 DIAS COM <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> E FRANGOS	

DESAFIADOS AOS 10 DIAS COM *SALMONELLA* MINNESOTA, NO PERÍODO DE 0 A 16 HORAS PÓS-INOCULAÇÃO (PI) NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....54

TABELA 3 – PORCENTAGEM (%) DE *SALMONELLA* SP. NO FÍGADO E CECO DE FRANGOS DESAFIADOS AOS 8 DIAS COM *SALMONELLA* ENTERITIDIS E FRANGOS DESAFIADOS AOS 10 DIAS COM *SALMONELLA* MINNESOTA, NO PERÍODO DE 0 A 16 HORAS PÓS-INOCULAÇÃO (PI) NOS DIFERENTES TRATAMENTOS55

TABELA 4 – ESCORE DE ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS OBSERVADAS NA MUCOSA DE ÍLEO E CECO DE FRANGOS DESAFIADOS AOS 8 DIAS COM *SALMONELLA* ENTERITIDIS E FRANGOS DESAFIADOS AOS 10 DIAS COM *SALMONELLA* MINNESOTA, NO PERÍODO DE 0 A 16 HORAS PÓS-INOCULAÇÃO (PI) NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....58

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 AVALIAÇÃO DE FRANGOS DESAFIADOS COM DIFERENTES CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO DE AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	18
1.1 RESUMO.....	19
1.2 ABSTRACT	20
1.3 INTRODUÇÃO	20
1.4 MATERIAL E MÉTODOS	21
1.4.1 AVES, DESENHO EXPERIMENTAL, DIETAS E ALOJAMENTO	21
1.4.2 PESAGENS E COLETA DE AMOSTRAS	22
1.4.3 DESAFIO.....	22
1.4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	23
1.4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	23
1.4.6 ISOLAMENTO DE RNA E RT-PCR	24
1.4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
1.6 CONCLUSÕES	42
2 RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PREBIÓTICO DERIVADO DE <i>SACHAROMYCES CEREVISIAE</i> DESAFIADOS COM <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> OU MINNESOTA	47
2.1 RESUMO.....	48
2.2 ABSTRACT	49
2.3 DESCRIÇÃO DO PROBLEMA.....	49
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.4.1 AVES, DESENHO EXPERIMENTAL, DIETAS E ALOJAMENTO	51
2.4.2 PESAGENS E COLETA DE AMOSTRAS	51
2.4.3 DESAFIO.....	52
2.4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	52
2.4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	52
2.4.6 ISOLAMENTO DE RNA E RT-PCR	52
2.4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54

2.6 CONCLUSÕES E APLICAÇÕES	59
REFERÊNCIAS.....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
ANEXO A - IMMUNE RESPONSE OF BROILER CHICKENS SUPPLEMENTED WITH PREBIOTIC FROM <i>SACHAROMYCES CEREVISIAE</i> CHALLENGED WITH <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS OR MINNESOTA	73

INTRODUÇÃO

As primeiras bactérias do gênero *Salmonella*, anteriormente conhecidas como *Bacterium typhosa*, foram isoladas de seres humanos e identificadas em 1880. Já em 1885, o veterinário Dr. Daniel Salmon isolou um bacilo de suínos doentes, e erroneamente identificou como o agente da peste suína, sendo posteriormente denominado de *Bacillus cholerae suis*. Em 1888, Gartner isolou a bactéria de um homem com gastroenterite, que havia ingerido carne bovina crua; mais tarde a bactéria foi denominada *Bacillus Enteritidis*, e em 1900 foi proposto o nome *Salmonella*, em homenagem ao Dr. Salmon (MERCHANT; PARCKER, 1980). Em aves, mais especificamente pombos, o primeiro relato documentado de salmoneloses foi realizado em 1885, e entre os anos de 1920 e 1930 ocorreu a descrição dos primeiros surtos em galinhas e perus (MOORE, 1895).

Para a caracterização das bactérias do gênero *Salmonella*, a partir de 1925, devido à utilização de provas sorológicas, foi estabelecido o esquema de Kauffmann-White, reconhecido a partir de 1932 (BRENNER, 1998). Este esquema está baseado na composição antigênica das salmonelas, com relação a seus antígenos de superfície somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi).

Atualmente o gênero *Salmonella* é composto de duas espécies: *Salmonella enterica*, classificada em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) e *Salmonella bongori* (BRENNER et al, 2000). Os nomes foram mantidos somente para os sorovares da subespécie *enterica* e devem ser escritos com a primeira letra maiúscula e não devem ser de forma itálica (POPOFF; LE MINOR, 1997).

São conhecidos atualmente mais de 2500 sorovares de *Salmonella*, dos quais, 1547 encontram-se na subespécie *enterica* (GUIBOURDENCHE et al, 2010). Entre eles, estão os principais sorovares causadores de salmoneloses aviárias e doenças alimentares em humanos (BERCHIERI JR; FREITAS NETO, 2009). Este grande número de sorovares pode ser dividido em duas classes gerais. A primeira compreende um pequeno número de sorovares espécie-específicos, que incluem *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* nas aves (BARROW; FREITAS NETO, 2011), *S. Typhi* nos humanos, *S. Dublin* em bovinos e *S. Choleraesuis* em suínos. Estes sorovares são transmitidos por via fecal-oral, apresentam baixa colonização intestinal e se multiplicam em outros órgãos como fígado e baço. Após esta multiplicação podem

voltar a colonizar o intestino na presença de doença clínica e, por consequência, raramente entram na cadeia alimentar humana (UZZAU et al., 2000; BARROW, 2011).

A segunda classe engloba os sorovares paratíficos capazes de infectar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo o homem e as aves. Estes raramente provocam doença sistêmica em indivíduos saudáveis, mas são capazes de colonizar o intestino sem a presença de sinais clínicos, sendo então relacionados a contaminação de produtos de origem animal e doenças transmitidas por alimentos em humanos. Este grupo compreende os sorovares não espécie-específicos, como *S. Enteritidis* (SE), *S. Typhimurium* (ST), *S. Heidelberg* (SH), *S. Minnesota* (SM) e muitos outros.

A infecção com *Salmonella enterica* em humanos é uma das doenças transmitidas por alimentos mais importantes no mundo, por apresentar alta complexidade relacionada a endemicidade, diagnóstico, ampla variedade do agente infeccioso, múltiplas fontes de infecção e difícil controle. Entretanto, o consumo de carne de frango é considerado um importante fator de risco nas infecções em humanos (FAO-WHO, 2009). A contaminação por este microrganismo prejudica o comércio nacional e internacional de produtos derivados de frango, o que pode representar um alto impacto na economia brasileira. O Brasil produziu em 2015 um total de 13,14 milhões de toneladas de carne de frango, o que lhe confere a classificação de segundo lugar mundial, perdendo apenas para os Estados Unidos. Deste total, 32,7% foi destinado ao mercado externo e somos hoje o maior exportador mundial de carne de frango (ABPA, 2016). ST foi o sorovar mais relacionado com infecções alimentares de origem bacteriana, mas nas últimas décadas SE tem se destacado como o principal responsável por estas infecções (ANVISA, 2007).

Estudo de Medeiros et al. (2011) verificou a incidência de 48,8% de SE em carcaças de frangos brasileiras, seguido do sorovar Infantis (7,6%), Typhimurium (7,2%) e Heidelberg (6,4%). Em algumas regiões outros sorovares têm sido reportados com grande importância e a prevalência dos diferentes sorovares pode variar entre localidades, estados e países (CDC, 2016). Em trabalho de tipificação de *Salmonella*, em amostras positivas de frangos de corte no abatedouro, embora SE seja o principal sorovar detectado, percebeu-se também elevação do percentual de SM, encontrado em 9,38% das amostras entre o período de 2009/2010 (FREITAS,

2011). Neste mesmo período um estudo de Voss-Rech et al. (2015), em amostras provenientes de aviários de frangos de corte do sul do Brasil, encontrou 15 sorovares, sendo Minnesota o de maior prevalência, representando 37,93% das amostras, seguido pelos sorovares Infantis (13,79%), Senftenberg (8,05%) e Heidelberg (6,9%). Pandini *et al.* (2015) avaliou 342 suabes de arrasto de granjas avícolas do Paraná coletados entre 2010 e 2011 e encontrou alta prevalência de *S. Heidelberg* (12,83%), seguido de 7,7% para *S. Enteritidis*. Boni et al., 2011 verificaram a predominância dos sorovares Typhimurium e Enteritidis em amostras coletadas de aviários e abatedouros de frangos de corte na região central do Mato Grosso do Sul.

Estudos epidemiológicos mostram que existe relação de exclusão competitiva entre diferentes sorovares. Este comportamento de alternância entre sorovares distintos na população indica que o nicho ecológico de um sorovar específico pode ser ocupado por outro (RABSCH et al., 2000; CALLAWAY et al., 2008). Dessa forma, tendo em vista a emergência de novos sorovares e a re-emergência de outros em determinadas áreas, o controle das salmoneloses passa pelo conhecimento dos comportamentos dos diferentes sorovares em relação a sua identificação, prevalência, formas de controle e características de patogenicidade.

A principal forma de controle da *Salmonella* na produção avícola relaciona-se a elaboração de um criterioso e específico programa de biossegurança envolvendo todos os elos da cadeia avícola (reprodutoras, incubatórios, fábricas de ração, granjas, e abatedouros). Associadas a isso, várias ferramentas têm sido empregadas como uso de antibióticos, ácidos orgânicos de cadeia curta na água ou ração, prebióticos, probióticos e vacinação.

Em especial o uso de antibióticos para controle de salmoneloses em animais de produção demonstrou-se pouco eficiente e ainda, provocou o aparecimento de estirpes resistentes a diversas moléculas utilizadas (GEBREYES et al, 2000; RIBEIRO et al., 2008; 2009; COSBY et al., 2015). Ácidos orgânicos são conhecidos por afetar a atividade microbiana por acidificação do citoplasma com consequente falha metabólica e acúmulo de íons H^+ dissociados no meio externo. Porém sua atividade antimicrobiana pode ser variável de acordo com a concentração do ácido, pH do ambiente e constante de dissociação (MANI-LÓPEZ et al., 2012). Sendo assim, a eficiência destes compostos pode ser variável no controle deste microrganismo (MANI-LÓPEZ et al., 2012; PICKLER et al., 2012; ALALI et al., 2013).

A utilização de probióticos, como um mecanismo de exclusão competitiva (NURMI; RANTALA, 1973), também pode ser uma ferramenta no controle de *Salmonella* em criações comerciais de frangos, porém sua forma de atuação difere quanto à cepa probiótica e ao sorovar de *Salmonella* estudados (KABIR, 2009; LOURENÇO et al., 2012; TELLEZ et al., 2012; MUNIZ et al., 2013). Além destes compostos, prebióticos estimulam o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas e dificultam a colonização intestinal das aves por microrganismos patogênicos (GIBSON; ROBERFROID 1995), porém sua eficiência também pode variar dependendo do sorovar utilizado (SPRING et al., 2000; BOROWSKY et al., 2009; LOURENÇO et al., 2015).

Além disso, os sorovares de *Salmonella* podem diferir quanto a sua patogenicidade, ou seja, sua capacidade de causar doença. Os microrganismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie pelo fato de possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, isto é, fatores que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira, ocasionando o aparecimento de sinais e sintomas anormais, que irão, finalmente, definir o estado de doença.

Organismos de *Salmonella* normalmente infectam o hospedeiro por via oral. O patógeno penetra no epitélio da mucosa intestinal e sobrevive em células fagocíticas (STERZENBACH et al., 2013). O desenvolvimento da doença sistêmica requer translocação para os órgãos ricos em células da série de monócitos-macrófagos, tais como o baço e fígado, onde sobrevivem e se multiplicam. Além disso, fatores como a sobrevivência e a invasividade também estão relacionados a uma maior virulência do microrganismo (BERNDT et al., 2009).

Sendo assim, o objetivo desta Tese foi avaliar aves desafiadas com diferentes sorovares e cepas de *Salmonella enterica* no que se refere a alterações histológicas e imunológicas, e avaliar o efeito de um prebiótico sobre o controle destes patógenos.

REFERÊNCIAS

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal) Relatório Anual 2016. 136p. Disponível em <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>. Acessado em 01 de outubro de 2016.

ANVISA. 2007. Relatório anual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.

ALALI, W.Q.; HOFACRE, C.L.; MATHIS, G.F.; FALTYS, G.; RICKE, S.C. e DOYLE, M.P. Effect of non-pharmaceutical compounds on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. **Food Control**, v.31, p. 125-128, 2013.

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

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

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75, p.5993-6007, 2009.

BONI, H.F.K.; CARRIJO, A.S.; FASCINA, V.B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12(1), p.84-95, 2011.

BOROWSKY, L.; CORÇÃO, G.; CARDOSO, M. Mannanligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.458-464, 2009.

BRENNER, F.W. 1998 Modified Kauffmann-White scheme. Center of Diseases Control and Prevention, Atlanta, GA.

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

CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014. Acessado em 14 de outubro de 2016.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; BYRD, J.A.; NISBET, D.J. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. **Journal of Animal Science**, v.86, E163-E172, 2008.

COSBY, D.E.; COX, N.A.; HARRISON, M.A.; WILSON, J.L.; BUHR, R.J.; FEDORKA-CRAY, P.J. Salmonella and antimicrobial resistance in broilers: A review. **Journal Applied of Poultry Research**, v.24, p.408-426, 2015.

FAO – WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization). Microbiological Risk Assessment Series 19. 2009. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: Meeting report.

FREITAS, J. B. Evolución epidemiológica de serovares prevalentes en la cadena productiva de aves y modelo de banco de cepas brasileiro. SEMINÁRIO

INTERNACIONAL SOBRE SALMONELOSE AVIÁRIA. Rio de Janeiro-RJ, 28 a 30 de junho/2011.

GEBREYES, W.A.; DAVIES, P.R.; MORGAN MORROW, W.E.; FUNK, J.A.; ALTIER, C. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38(12), p.4633-4636, 2000.

GIBSON, G.R. e ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401–1012, 1995.

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

KABIR, S.M.L. The role of probiotics in the poultry industry. **Intenational Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.3531 – 3546, 2009.

LOURENÇO, M.C.; KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; MUNIZ, E.; PICKLER, L.; SANTIN, E. Effects of *Bacillus subtilis* in the dynamics of infiltration of immunological cells in the intestinal mucosa of chickens challenged with *Salmonella* Minnesota. **International Journal of Poultry Science**, v.11(10), p. 630 – 634, 2012.

LOURENÇO MC, KURITZA LN, HAYASHI RM, MIGLINO LB, DURAU JF, PICKLER L, SANTIN E. Effect of mannanoligosaccharides supplemented diet on intestinal mucosa T lymphocyte populations in chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Applied Poultry Research**, v.24(1), p.15-22, 2015.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H.S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v.45, p. 713–721, 2012.

MEDEIROS, M.A.; OLIVEIRA, D.C.; RODRIGUES D.P.; FREITAS, D.R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamena de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011

MERCHANT, L.A.; PACKER, R.A. Bacteriologia e Virologia Veterinária. Zaragoza: Acribia, v.3. 1980. P.299-322.

MOORE, V.A. On a pathogenic bacillus of the hog-cholera group associated with a fatal diseases in pigeons. **Dep. Agric. BAI Bull**, v.8, p.71-76, 1895.

MUNIZ, E.C.; PICKLER, L.; LOURENÇO, M.C.; WESTPHAL, P.; KURITZA, L.N.; SANTIN, E. Probióticos na ração para controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, 52-60, 2013.

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

PANDINI, J.A.; PINTO, F.G.S.; MULLER, J.M.; WEBER, L.D.; DE MOURA, A.C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-6, 2015.

PICKLER, L., HAYASHI, R. M. LOURENÇO, M. C. MIGLINO, L. B. LAGO, A. L. BEIRAO, C. B. B. FISHER DA SILVA, A. V. SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.27-36, 2012.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Formules antiigeniques des serovars de Salmonella. Paris: WHO. 1997. P.1-15.

RABSCH, H.B.M.; TSOLIS, R.M.; KINSLEY, R.A.; HINZ, K. Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, p.443-448, 2000.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.1259-1262, 2008.

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

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharide on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, n.2, p.205-211, 2000.

STERZENBACH, T.; CRAWFORD, R.W.; WINTER, S.E.; BAUMLER, A.J. *Salmonella* virulence mechanisms and their genetic basis. In :Barrow, PA, Methner, U. (Eds.), **Salmonella in Domestic Animals**. CABI Publishing, Wallingford, UK, 2013.

TELLEZ, G.; PIXLEY, C.; WOLFENDEN, R.E.; LAYTON, S.L.; HARGIS, B.M. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in Poultry. **Food Research International**, v.45, p.628 – 633, 2012.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; LEORI, G.; BERNARD, S.; CASADESÚS, J.; PLATT, D. J.; OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella* enterica. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.125, n.2, p.229-255, 2000.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES, D.P.; BACK A. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94(3), p.433-441, 2015.

**CAPITULO 1 AVALIAÇÃO DE FRANGOS DESAFIADOS COM DIFERENTES
CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO DE
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA**

1 AVALIAÇÃO DE FRANGOS DESAFIADOS COM DIFERENTES CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO DE AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Evaluation of chickens challenged with different strains of Salmonella enterica and application of a histological evaluation method

1.1 RESUMO

A infecção por *Salmonella enterica* em humanos constitui uma importante zoonose mundial. No Brasil, os sorovares Enteritidis e Heidelberg apresentam alta prevalência em amostras de frangos e o controle destas bactérias depende do bom entendimento de sua interação com o hospedeiro. O objetivo deste estudo foi comparar as alterações histológicas em frangos desafiados com *Salmonella enterica*, bem como a resposta de aves frente ao desafio com duas cepas de *Salmonella* Enteritidis e uma de Heidelberg, isoladamente. As cepas foram capazes de colonizar o fígado e ceco das aves. *Salmonella* Enteritidis cepa A mostrou-se mais adaptada ao hospedeiro, com alto e constante isolamento microbiológico associado a pouca indução de resposta inflamatória inicial nos órgãos avaliados, seguida de alta alteração histológica no ceco hospedeiro. A cepa de *Salmonella* Heidelberg induziu maior alteração histológica inicial em fígado e íleo, seguida de maior dificuldade de colonização, com posterior redução nas alterações histológicas, sugerindo menor adaptação ao hospedeiro.

Palavras-chave: histologia, salmoneloses, sorovares, inflamação

1.2 ABSTRACT

Salmonella enterica is one of the most important zoonotic pathogens for humans worldwide. In Brazil, serovars Enteritidis and Heidelberg had been described with high prevalence in poultry samples and the understanding of this microorganism interaction with host is essential for its control. The objective of this study was to compare histological alterations in broilers challenged with *Salmonella enterica* and the response of chickens against two different strains of *Salmonella* Enteritidis and one strain of Heidelberg. The strains were capable to colonize liver and cecum of chickens. *Salmonella* Enteritidis strain A was better adapted to the host, with high and constant microbiological isolation associated with low induction of initial inflammatory response, followed by high histological alterations in cecum. *Salmonella* Heidelberg strain induced higher initial alterations in liver and ileum, with lower colonization and, consequently, reduction in histological alterations and lower adaptation to the host.

Key words: histology, salmonellosis, serovars, inflammation

1.3 INTRODUÇÃO

A infecção causada pela *Salmonella enterica* no homem é uma das zoonoses relacionadas a alimentos mais importantes no mundo. O gênero *Salmonella* caracteriza-se por um elevado grau de diversidade sorológica, sendo conhecidos mais de 2500 sorovares capazes de causar a doença. Estes casos estão fortemente relacionados ao consumo de ovos e produtos cárneos de frangos. Nos Estados Unidos, os principais sorovares envolvidos são Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, Infantis, Hadar e Mbandaka (CDC, 2015). Segundo Medeiros et al. (2011), o sorovar Enteritidis foi o mais incidente em carcaças de frango avaliadas em 15 cidades brasileiras, representando 48,8% dos isolados, seguido do sorovar Infantis, com 7,6%, Typhimurium com 7,2% e Heidelberg com 6,4%. Boni et al., 2011 verificaram a predominância dos sorovares Typhimurium e Enteritidis em amostras coletadas de aviários e abatedouros de frangos de corte na região central do Mato Grosso do Sul.

Pandini *et al.* (2015) avaliou 342 suabes de arrasto de granjas avícolas do Paraná coletados entre 2010 e 2011 e encontrou alta prevalência de *S. Heidelberg* (12,83%), seguido de 7,7% para *S. Enteritidis*. Voss-Rech *et al.* (2015) analisaram suabes de arrasto de granjas avícolas, coletados nos estados do Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul em 2009 e 2010, e isolaram 15 diferentes sorovares de *Salmonella enterica*, sendo Heidelberg com prevalência de 7,31%.

A alternância entre os diferentes sorovares na população indica que um sorovar pode ocupar o nicho ecológico de outro (RABSCH *et al.*, 2000; CALLAWAY *et al.*, 2008). Entretanto, considerando estas diferenças relacionadas ao isolamento dos mesmos e a emergência de novos sorovares em certas regiões (LAHELLEC; COLIN, 1985; FOLEY *et al.*, 2011; VOSS-RECH *et al.*, 2015), o controle das salmoneloses depende do conhecimento do comportamento de cada um deles no que diz respeito a suas características patogênicas.

Devido à epidemiologia e patogenicidade complexa, sua ampla distribuição na natureza, com inúmeros reservatórios, sua habilidade de modular a resposta e desenvolver tolerância imunológica e não causar doença em aves, as salmonelas paratíficas tornaram-se um problema de difícil controle mesmo em granjas tecnificadas. Além da biossegurança e o uso de aditivos alimentares e vacinas, conhecer as particularidades dos sorovares auxilia no controle destas infecções e a utilização de novas metodologias pode contribuir com o estudo da interação dos diversos sorovares com o hospedeiro.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi comparar as alterações histológicas em frangos desafiados com *Salmonella enterica*, bem como a resposta de aves frente ao desafio com duas cepas de *Salmonella* Enteritidis e uma de Heidelberg, isoladamente.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de ética no Uso de Animais do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - Protocolo 040/2014.

1.4.1 Aves, desenho experimental, dietas e alojamento

Foram utilizados 240 frangos de corte machos de um dia de idade da linhagem Cobb (Cobb-Vantress Brasil Ltda.), os quais foram individualmente

pesados e distribuídos em 4 tratamentos com 4 repetições de 15 aves cada. Um grupo de aves não foi desafiado, sendo denominado de grupo controle negativo (NEG), e cada um dos demais foi desafiado com uma cepa de *Salmonella enterica*, sendo *Salmonella* Heidelberg (SH), *Salmonella* Enteritidis cepa A (SEA) e *Salmonella* Enteritidis cepa B (SEB).

As aves foram alojadas em salas isoladas com pressão negativa. Cada sala continha duas gaiolas verticais (repetições) com cama de maravalha esterilizada para evitar a contaminação por *Salmonella* ou outros microrganismos de outras fontes que não os utilizados como desafio, bebedouro nipple, com temperatura e iluminação de controle automático. Os animais foram mantidos em condições ideais de umidade e temperatura de acordo com a idade.

Foram utilizadas dietas a base de milho e farelo de soja, seguindo as recomendações nutricionais para aves brasileiras (ROSTAGNO, 2011) sem a adição de antibióticos promotores de crescimento e anticoccidianos.

1.4.2 Pesagens e coleta de amostras

No momento do alojamento, 7, 9, 10, 14 e 21 dias de idade as aves e a ração foram pesadas para avaliação de desempenho zootécnico. Para garantir a negatividade dos animais, no momento do alojamento foi realizado exame de presença/ausência de *Salmonella* sp. em amostras de fígado e ceco de 5 aves. As 16h após o desafio (10 dias), 14 e 21 dias, 8 aves por tratamento foram necropsiadas de forma asséptica para coleta de fígado (lobo acessório), íleo (2 cm abaixo da junção ileocecal) e ceco (esquerdo) fixados em Solução de Davidson para análises histológicas e amostras de fígado e ceco armazenadas em RNAlater (Ambion®) para PCR. Aos 14 e 21 dias também foram coletadas amostras destes mesmos órgãos para análise microbiológica de *Salmonella*.

1.4.3 Desafio

As cepas de *Salmonella* Enteritidis A e B foram isoladas de um abatedouro de frangos e de uma granja de reprodutoras, respectivamente. Já a cepa de *Salmonella* Heidelberg é proveniente de granjas comerciais de frangos de corte. Os inóculos de SEA, SEB e SH foram preparados de acordo com metodologia modificada (PICKLER et al., 2012). As mesmas foram identificadas com provas bioquímicas e subsequentemente plaqueadas em Ágar Verde Brilhante (Oxoid®) para

quantificação. Aos 9 dias de idade as aves foram inoculadas com 1mL de solução de acordo com os tratamentos: SH, 19×10^8 UFC / mL; SEA, 22×10^8 UFC / mL e SEB, 35×10^8 UFC / mL.

1.4.4. Análises microbiológicas

As amostras de fígado e ceco foram diluídas em água peptonada 2% (Oxoid[®]) na proporção de 1:9. Uma alíquota de 1mL desta solução foi adicionada em 9 mL de água peptonada 0,1%, seguida de diluições decimais até atingir a diluição 10^{-3} . Em seguida, 100 uL de cada diluição foram plaqueados em duplicata em ágar Verde Brilhante (Oxoid[®]). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas para subsequente contagem de colônias típicas. A solução inicial de água peptonada 2% foi incubada a 35°C por 24 horas. Para amostras que não apresentaram crescimento nas análises quantitativas, 100uL da solução inicial foram adicionados a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e Tetracionato (Oxoid[®]) e incubados a 42°C por 24 horas para confirmar a negatividade/positividade para *Salmonella*. Os resultados das contagens de colônias típicas foram expressos de acordo com os Procedimentos para Contagem de Colônias (MAPA/Brasil, 2003). Amostras das colônias foram enviadas ao FIOCRUZ para tipificação.

1.4.5. Análises histológicas

As amostras foram processadas rotineiramente para histologia, coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.) associada com Alcian Blue (Smirnov et al, 2004). Para mensuração das alterações microscópicas observadas nas amostras de fígado e íleo foi utilizado metodologia adaptada de Kraieski et al. (2016) / Patente INPI-BR1020150036019. Nesta avaliação, para cada alteração microscópica observada foi atribuído um fator de impacto (FI) de acordo com a sua importância em reduzir a capacidade funcional do órgão, variando de 0 a 5, onde 5 é o maior impacto para a função do órgão. Além disso, a extensão de cada alteração ou a frequência em comparação com a de um órgão não afetado foi avaliada, considerando escores de 0 a 3: escore 0 (ausência de lesão ou frequência), escore 1 (alteração de até 25% da área ou frequência), escore 2 (alteração varia de 25 a 50% da área ou frequência) e escore 3 (alteração maior que 50% da área ou frequência observada). Para chegar ao valor final do índice, o FI de cada alteração foi multiplicado pelo respectivo número de escore, e os resultados de todas as alterações foram somados

(TABELA 1). Nas amostras de ceco foi utilizada metodologia adaptada de Fasina et al.(2010). O número de células calciformes, hemácias, heterófilos, linfócitos epiteliais, infiltração inflamatória mista na lâmina própria e infiltração inflamatória mista epitelial foi demonstrado em densidade, que foi definido pelo número de células avaliadas por μm^2 de área de superfície do vilão. A área do vilão foi calculada pela multiplicação da altura do vilão (do topo do vilão até o ponto superior ao início da cripta) e largura do vilão (meia altura). Foi também mensurada a espessura de lâmina própria (da região das criptas até a camada muscular da mucosa). As medidas e quantificações foram realizadas em microscópio óptico DM 1000 LED, Leica.

TABELA 1. Alterações histológicas avaliadas em fígado e íleo.

Alterações	Fator de impacto (FI)	Escore máximo ¹
FÍGADO		
Congestão	2	81
Degeneração hidrópica	2	
Vacuolização celular	4	
Proliferação de ductos biliares	4	
Infiltração linfoide	2	
Necrose	5	
Pericolangite	5	
Agregado linfoide	3	
ÍLEO		
Espessura de lâmina própria	3	72
Espessura epitelial	2	
Proliferação de enterócitos	2	
Infiltração plasmática epitelial	1	
Infiltração inflamatória mista	5	
Hiperplasia de células calciformes	3	
Congestão	3	
Necrose	5	

¹Escore máximo representa o resultado final considerando o escore 3 para cada alteração multiplicado pelo fator de impacto (valor fixo para cada alteração) e somados no final.

1.4.6 Isolamento de RNA e RT-PCR

Os procedimentos para extração de RNA e quantificação de citocinas por RT-PCR foram realizadas conforme descrito por Lourenço et al. (2016), utilizando os genes descritos na TABELA 2.

TABELA 2. Sequência dos *primers* de citocinas^a

Gene	Sequencia do <i>primer</i> (5'-3')	Nº de acesso no banco de genes
<i>ch IL-6</i>	F:GCTCGCCGGCTTCGA R:GGTAGGTCTGAAAGGCGAACAG	AJ250838
<i>ch IL-8</i>	F:ATGAACGGCAAGCTTGGAGCT R:GCCATAAGTGCCTTTACGATCAG	NM205498
<i>ch IL-10</i>	F:CGGGAGCTGAGGGTGAA R:GTGAAGAAGCGGTGACAGC	AJ621614
<i>ch IL-12p40</i>	F:AGACTCCAATGGGCAAATGA R:CTCTTCGGCAAATGGACAGT	NM 213571

^aOs oligonucleotídeos listados foram utilizados para analisar a expressão do gene em ceco e fígado por PCR em tempo real . F= forward; R= reverse.

1.4.7 Análise estatística

Os dados foram avaliados por meio do programa estatístico Statistix 9, sendo submetidos ao teste de correlação de Pearson, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para avaliar os dados de presença/ausência das análises microbiológicas para *Salmonella*.

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, três diferentes cepas de *Salmonella* foram avaliadas quanto a sua interferência no desempenho zootécnico, capacidade de colonização e alterações histológicas em fígado, íleo e ceco.

De maneira geral, os parâmetros de desempenho zootécnico dos frangos não são alterados nas infecções por salmonelas paratíficas, pois estes patógenos estão altamente adaptados a este hospedeiro, com o qual convivem de forma relativamente equilibrada. Frangos desafiados com SEA apresentaram menor GPM entre 14 e 21 dias quando comparado ao grupo controle negativo (TABELA 3). Alguns estudos relatam que determinados sorovares e/ou cepas, apresentam extensa colonização no trato digestório com desenvolvimento de doença e envolvimento do sistema imunológico, o que pode prejudicar o desempenho dos animais (GAST; BENSON, 1995; MUNIZ et al., 2015). O sorovar SEA também apresentou maior colonização de fígado, tanto aos 14 como aos 21 dias, o que pode

indicar maior patogenicidade e justificar o menor GPM comparado ao desafio com as demais cepas neste mesmo período.

TABELA 3. Média \pm Erro Padrão de peso médio (PM) aos 21 dias, Ganho de Peso Médio (GPM) Consumo de Ração Médio (CRM) e Conversão Alimentar (CA) no período de 14 a 21 dias de vida nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	PM 14 dias	PM 21 dias	GPM 14-21 dias	CRM 14-21 dias
NEG	315,40 \pm 5,31	671,67 \pm 5,53	393,20 \pm 10,69a	637,97 \pm 36,95
SH	312,93 \pm 8,28	642,70 \pm 13,34	366,42 \pm 10,57ab	660,95 \pm 16,41
SEA	321,32 \pm 8,56	643,02 \pm 10,47	356,45 \pm 7,15b	610,50 \pm 29,61
SEB	319,88 \pm 11,21	666,48 \pm 16,03	391,70 \pm 10,23ab	627,63 \pm 23,97
P	0,891	0,235	0,048	0,641

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no Teste de Tukey(P<0,05).

As amostras de fígado e ceco coletadas ao primeiro dia apresentaram resultado negativo para *Salmonella* sp. e o grupo não desafiado permaneceu negativo durante todo o período experimental, indicando o bom isolamento das instalações de alojamento.

O desafio com os diferentes sorovares de *Salmonella* permitiu a colonização do fígado e ceco dos frangos (TABELA 4), mas não foram observados sinais de morbidade ou lesão macroscópica sugestiva de inflamação intestinal, o que indica que a presença da *Salmonella* nos órgãos internos não resulta, necessariamente, no aparecimento de sinais clínicos. Aos 14 dias, os sorovares SEA e SEB apresentaram maior isolamento em fígado, relacionado à maior invasividade quando comparados a SH. Aos 21 dias, o sorovar SEA manteve sua maior porcentagem de presença em relação aos demais, e SH se igualou a SEB, o que indica que SH precisa de um tempo maior para colonizar o fígado. Também se pode observar a melhor adaptação da cepa SEA quando comparada às demais, uma vez que manteve alto nível de isolamento durante todo o período. Os diferentes sorovares não apresentaram diferenças na capacidade de colonizar o ceco, pois não foram observadas diferenças estatísticas significativas nestas análises (TABELA 4). Berndt et al.(2007), em trabalho comparativo de frangos desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*, observou que somente a *S. Enteritidis* apresentou alta contagem em fígado e ceco quando comparada a *S. Typhimurium*, *Infantis* e *Hadar*, bem como

maior capacidade invasiva na mucosa do ceco, sendo observado em regiões mais profundas da mucosa intestinal. Borsoi et al. (2009) comparou duas cepas de *S. Heidelberg* e observou diferenças significativas relacionadas a presença de genes de virulência e capacidade de colonização em fígado e ceco.

TABELA 4. Porcentagem (%) de presença em fígado e média \pm erro-padrão da contagem de colônias de *Salmonella* em ceco aos 14 e 21 dias de vida nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Fígado		Ceco	
	14 dias	21 dias	14 dias	21 dias
	% (+/total)	% (+/total)	Log10	Log10
NEG	0(08) b	0(08)c	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 0,00 b
SH	37,5(38) a	75(68)a	4,88 \pm 1,48 a	5,72 \pm 0,71 a
SEA	100(88) c	100(88)b	5,73 \pm 0,76 a	6,46 \pm 1,31 a
SEB	100(88) c	75(68)a	5,75 \pm 1,08 a	6,42 \pm 0,63 a
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no Teste de Qui- quadrado(P< 0,05) para fígado e Teste de Tukey(P<0,05) para ceco.

Nas análises histológicas de fígado (TABELA 5) as 16 horas PI observa-se menor alteração histológica em frangos do grupo SEA quando comparado a SEB e SH. As alterações que mais contribuíram no resultado do escore total do grupo SEB foram presença de congestão e agregados linfóides, as quais sugerem maior inflamação e resposta imunológica quando comparado ao grupo SEA. Aos 14 dias não foram observadas diferenças estatísticas nas alterações histológicas entre as cepas, mas SEA e SEB induziram maior escore de lesão quando comparados ao grupo NEG. As alterações de maior impacto no escore total foram congestão, degeneração hidrópica e vacuolização (FIGURA 1). A congestão pode estar relacionada com a resposta imuno-inflamatória frente a infecção com *Salmonella*. A degeneração hidrópica e a vacuolização são expressões de injúria celular frente a causas diversas, incluindo fatores infecciosos e tóxicos (ITO et al., 2009). Aos 21 dias não foi observada diferença estatística significativa no escore total, porém frangos SEA apresentaram maior índice de pericolangite comparados a SH e NEG. Frangos SEB apresentaram mais degeneração hidrópica e vacuolização em relação a SH. Nas avaliações de proliferação de ductos biliares, infiltração linfóide e necrose não houve diferença estatística em todos os períodos avaliados.

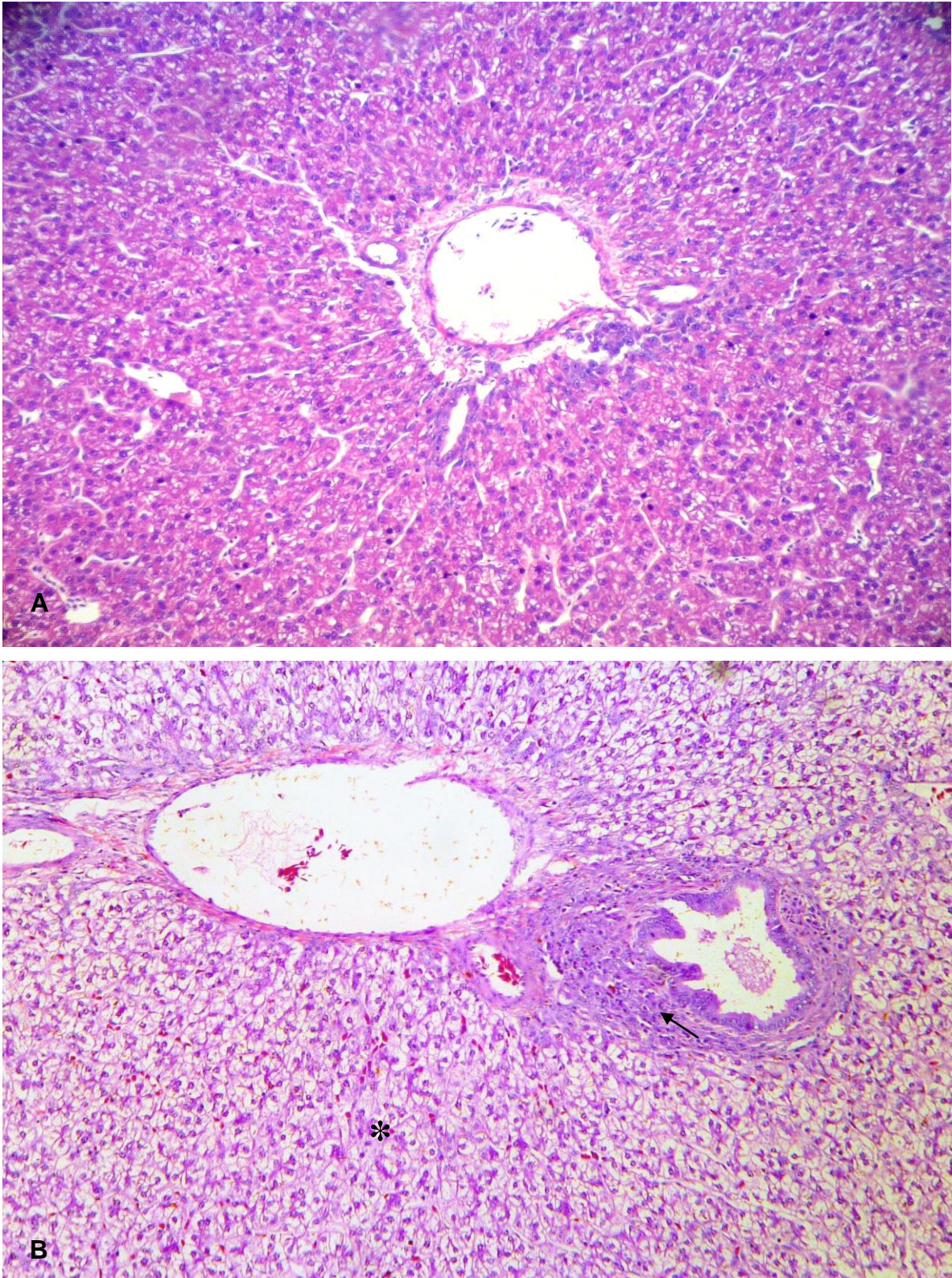


FIGURA 1. Fotomicrografia do fígado de frangos não desafiados (A) e desafiados com *Salmonella* Enteritidis cepa A (B) aos 21 dias. Notar diferença em degeneração hidrópica, vacuolização celular (asterisco) e pericolangite (seta). Hematoxilina e eosina, objetiva 20X.

TABELA 5. Média ± Erro-padrão das alterações histológicas em fígado as 16 horas PI, 14 e 21 dias nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Congestão	Degeneração Hidrópica	Vacuolização	Proliferação de Ductos Biliares	Infiltração Linfoide	Necrose	Pericolangite	Agregado linfóide	Total
16 horas PI									
NEG	2,28±0,28ab	0,91±0,17	5,71±0,33	3,08±0,52	1,02±0,27	0,14±0,14	0,00±0,00	0,17±0,14ab	11,85±0,88ab
SH	2,57±0,26a	1,08±0,17	5,71±0,37	2,74±0,48	0,57±0,15	0,00±0,00	0,00±0,00	0,35±0,11a	13,42±0,64a
SEA	1,48±0,26b	0,80±0,16	5,25±0,31	2,62±0,46	0,74±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00b	10,91±0,61b
SEB	2,97±0,33a	1,31±0,23	5,48±0,43	2,74±0,45	1,08±0,20	0,28±0,19	0,14±0,14	0,51±0,19a	14,54±0,85a
P	0,003	0,236	0,790	0,917	0,268	0,295	0,395	0,059	0,009
14 dias									
NEG	1,32±0,22b	0,05±0,06b	2,97±0,30b	2,28±0,41	0,51±0,14	0,42±0,24	0,00±0,00	0,85±0,26	8,42±0,81b
SH	1,03±0,24b	0,28±0,12ab	3,54±0,32b	1,94±0,41	0,86±0,22	0,85±0,38	0,14±0,14	0,85±0,26	9,51±0,80ab
SEA	1,73±0,22ab	0,63±0,16a	5,26±0,32a	2,17±0,38	0,62±0,17	0,14±0,14	0,00±0,00	1,20±0,33	11,7±0,59a
SEB	2,28±0,31a	0,46±0,14ab	5,03±0,30a	1,71±0,38	0,28±0,12	0,71±0,36	0,00±0,00	1,37±0,41	11,8±0,73a
P	0,003	0,013	<0,001	0,746	0,130	0,341	0,395	0,596	0,002
21 dias									
NEG	2,22±0,24	0,80±0,16b	4,68±0,25ab	2,97±0,57	1,42±0,22	0,42±0,31	0,14±0,14b	0,60±0,20	13,28±0,97
SH	2,85±0,26	0,68±0,16b	4,00±0,32b	3,42±0,59	1,08±0,26	0,71±0,46	0,14±0,14b	0,34±0,16	13,25±1,10
SEA	2,34±0,20	1,20±0,18ab	4,68±0,25ab	2,74±0,53	0,85±0,20	0,42±0,24	1,57±0,60a	0,08±0,08	13,90±1,01
SEB	2,22±0,29	1,48±0,17a	5,25±0,31a	3,31±0,41	1,08±0,22	0,14±0,14	0,57±0,34ab	0,51±0,26	14,60±0,82
P	0,245	0,004	0,029	0,793	0,373	0,647	0,018	0,238	0,743

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no Teste de Tukey (P<0,05).

Analisando os resultados de fígado entre os diferentes sorovares ao longo dos períodos de 16 horas PI e 14 dias observa-se que SEA mostrou-se mais adaptado ao hospedeiro, uma vez que mantém o escore de alteração histológica hepática, atrelado a alta taxa de infecção ao longo dos dias avaliados. Já os sorovares SH e SEB induzem maior alteração dos parâmetros histológicos avaliados as 16 horas PI, com conseqüente maior indução de resposta inflamatória, redução ou aumento na presença do microrganismo no fígado e posterior redução de alteração histológica aos 14 dias.

Os resultados da presença de *Salmonella* no fígado dos frangos apresentam relação direta com os resultados de alterações histológicas (FIGURA 2), onde aos 14 dias observa-se maior alteração histológica nos grupos SEA e SEB com posterior equilíbrio entre os valores de histologia e microbiologia aos 21 dias dentro os grupos desafiados.

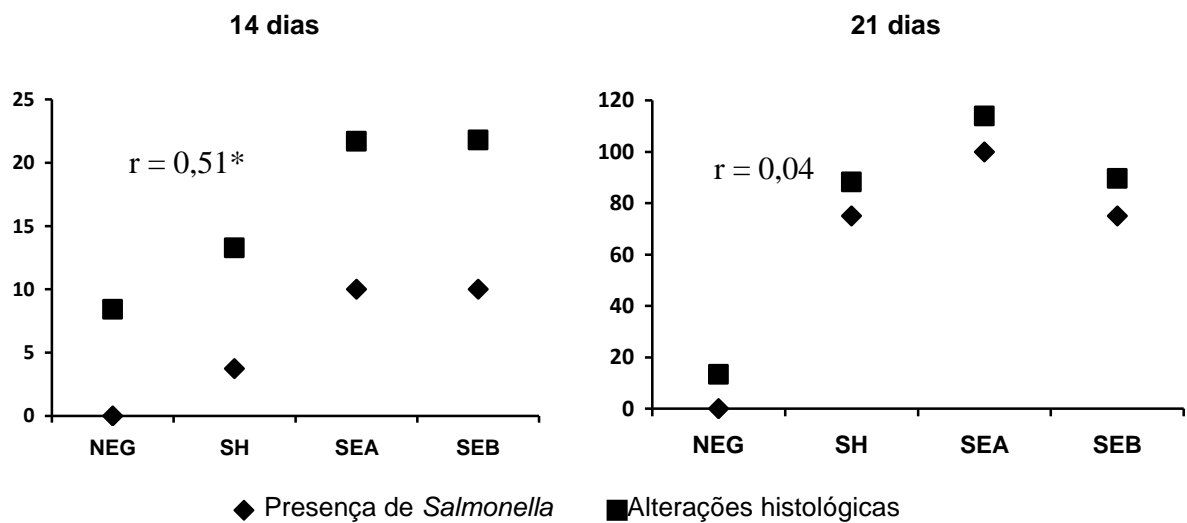


FIGURA 2. Correlação entre os valores de presença de *Salmonella* e alterações histológicas no fígado das aves nos diferentes tratamentos. Coeficiente de correlação de Pearson (r) aos 14 dias, $r=0,51^*$ e aos 21 dias, $r=0,04$. $*(P < 0,05)$.

No íleo (TABELA 6), as 16 horas PI observa-se que aves SEA apresentam menor escore quando comparadas a NEG e SEB, com menores níveis de infiltração inflamatória mista e congestão. Aos 14 dias aves SEB apresentam maior escore de alteração histológica em íleo quando comparadas a SH e SEA. Estes dados estão de acordo com Desmit et al. (1997) que observaram maior presença de células plasmáticas na lâmina própria do íleo de aves desafiadas com *S. Enteritidis*. Aos 21 dias não foi observada diferença estatística significativa no escore total entre os tratamentos. Segundo Thompson e Applegate (2006) e Lourenço et al. (2015), o desafio microbiológico com *Salmonella* desencadeia alteração na dinâmica celular do íleo, mas que parece ser uma consequência compensatória em relação ao que acontece no ceco.

O epitélio intestinal é uma barreira física, fisiológica e imunológica contra organismos patogênicos. As células envolvidas com a resposta imunológica inata atuam de maneira conjunta com a imunidade específica (KAISER, 2010), além de influenciar na natureza e intensidade da resposta específica, a qual pode variar de acordo com o sorovar de *Salmonella* envolvido no processo de infecção (PARISH et al., 1997, SETTA et al., 2012). A camada de muco, produzido pelas células caliciformes, dificulta a adesão do patógeno na superfície celular intestinal, além de auxiliar na lubrificação e no transporte entre o conteúdo luminal e a camada epitelial (UNI et al., 2003; FORDER et al., 2007). A invasão do TGI promove a interação da *Salmonella* com macrófagos e heterófilos, os quais podem ser encontrados no epitélio em um número significativamente maior em apenas 3 e 6 horas após a infecção, respectivamente (VAN IMMERSEEL et al., 2002). Após o reconhecimento da bactéria por receptores tipo *Toll*, ocorre aumento da população de heterófilos, bem como maior expressão de IL6 e IL8 (SWAGGERTY et al., 2004; GENOVESE et al., 2013). O processo de eliminação continua com um forte recrutamento de linfócitos T e B, sendo este último encontrado em proporções muito pequenas na mucosa do ceco (RYCHLIK et al., 2014). Estas alterações também podem ser observadas na morfologia das vilosidades intestinais, devido ao aumento de células inflamatórias como também observado por Borsoi et al. (2009) em aves desafiadas com SH.

TABELA 6. Média \pm Erro-padrão das alterações histológicas em íleo as 16 horas PI, 14 e 21 dias nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Espessura de Lamina Propria	Espessura Epitelial	Proliferação de enterócitos	Infiltração plasmática epitelial	Infiltração inflamatória mista	Hiperplasia de células caliciformes	Congestão	Necrose	Total
16 horas PI									
NEG	3,49 \pm 0,37	2,43 \pm 0,17	2,65 \pm 0,20	0,27 \pm 0,06	4,36 \pm 0,39bc	2,45 \pm 0,24	0,18 \pm 0,17b	2,00 \pm 0,38	17,54 \pm 1,05ab
SH	3,72 \pm 0,38	2,28 \pm 0,21	2,48 \pm 0,21	0,30 \pm 0,07	5,20 \pm 0,51ab	2,28 \pm 0,27	0,70 \pm 0,11a	1,10 \pm 0,32	18,38 \pm 1,10a
SEA	3,24 \pm 0,37	2,04 \pm 0,17	2,36 \pm 0,19	0,24 \pm 0,08	2,90 \pm 0,38c	2,34 \pm 0,27	0,12 \pm 0,08b	0,80 \pm 0,29	14,04 \pm 0,97b
SEB	4,52 \pm 0,40	2,40 \pm 0,19	2,94 \pm 0,20	0,10 \pm 0,04	6,18 \pm 0,44a	2,18 \pm 0,25	0,60 \pm 0,16ab	1,18 \pm 0,34	20,12 \pm 1,09a
P	0,096	0,453	0,198	0,177	<0,001	0,898	0,004	0,078	0,001
14 dias									
NEG	5,40 \pm 4,77	2,60 \pm 1,67ab	3,00 \pm 2,48ab	0,12 \pm 0,10	6,70 \pm 11,84	3,48 \pm 2,33a	1,08 \pm 2,85b	1,50 \pm 6,37a	23,88 \pm 65,7ab
SH	5,70 \pm 7,07	2,20 \pm 1,18b	2,64 \pm 2,84b	0,18 \pm 0,15	6,90 \pm 16,21	2,46 \pm 2,09b	1,08 \pm 3,95b	0,90 \pm 4,78ab	22,06 \pm 72,05b
SEA	5,16 \pm 4,42	2,20 \pm 0,69b	2,92 \pm 2,15ab	0,14 \pm 0,12	6,40 \pm 11,26	1,98 \pm 2,06b	1,26 \pm 2,97ab	0,30 \pm 1,43b	20,36 \pm 41,62b
SEB	5,70 \pm 6,70	2,92 \pm 1,66a	3,52 \pm 2,37a	0,26 \pm 0,19	8,10 \pm 11,11	3,48 \pm 2,70a	2,10 \pm 4,13a	1,40 \pm 6,16ab	27,48 \pm 76,62a
P	0,618	0,003	0,044	0,266	0,088	<0,001	0,018	0,023	0,001
21 dias									
NEG	5,62 \pm 0,39	2,80 \pm 0,15	3,40 \pm 0,21	0,87 \pm 0,10 ^a	8,00 \pm 0,50	3,60 \pm 0,30	1,12 \pm 0,25	0,75 \pm 0,45	26,17 \pm 1,04
SH	4,57 \pm 0,38	2,60 \pm 0,19	3,05 \pm 0,17	0,57 \pm 0,07ab	7,75 \pm 0,59	3,37 \pm 0,26	1,42 \pm 0,30	0,37 \pm 0,21	23,72 \pm 1,28
SEA	5,77 \pm 0,42	2,75 \pm 0,18	3,05 \pm 0,23	0,50 \pm 0,08b	7,75 \pm 0,56	3,07 \pm 0,22	1,87 \pm 0,31	0,12 \pm 0,12	24,90 \pm 1,06
SEB	5,55 \pm 0,40	2,85 \pm 0,17	3,75 \pm 0,20	0,15 \pm 0,05c	6,12 \pm 0,41	4,05 \pm 0,27	0,97 \pm 0,22	0,62 \pm 0,36	24,07 \pm 1,01
P	0,142	0,774	0,057	<0,001	0,046	0,079	0,110	0,518	0,411

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no Teste de Tukey (P<0,05).

No ceco (TABELA 7), observa-se maior presença de células caliciformes em frangos desafiados com SEB as 16 horas PI e aves desafiadas com SEA e SEB aos 21 dias. A camada de muco, produzida pelas células caliciformes, atua como um meio de proteção físico e biológico e também é um componente da resposta imune inata que é regulada em resposta à inflamação e infecção (UNI et al., 2003). Aos 14 dias, aves SEA apresentam maior quantidade de heterófilos/ μm^2 e linfócitos epiteliais/ μm^2 associado a maior infiltração inflamatória mista na lâmina própria e epitelial/ μm^2 relacionados ao início da resposta imunológica contra o patógeno. Estes dados podem exemplificar a diferença entre o tempo necessário para o processo de infecção entre duas cepas de um mesmo sorovar ou cepas de sorovares diferentes. Heterófilos estão relacionados ao início da resposta imunológica, seguido do aumento de linfócitos e demais células plasmáticas (RYCHLIK et al., 2014). O processo de colonização intestinal pela *Salmonella* se inicia com a replicação e adaptação da bactéria no lúmen intestinal, seguida pela adesão as células epiteliais com o auxílio de adesinas. Após esta etapa, o sistema de secreção tipo III auxilia a passagem de proteínas bacterianas para o citoplasma celular, com posterior alteração na estrutura celular, reconhecimento e desencadeamento de resposta inflamatória (RYCHLIK et al., 2014). Vários fatores bacterianos, como lipopolissacarídeos, flagelos, fimbrias e algumas proteínas de membrana têm sido reportados por atuar como responsáveis por iniciar a adesão e/ou invasão no epitélio do TGI hospedeiro (BERNDT et al., 2007). Estas possíveis variações no início do processo de infecção estão diretamente relacionadas à patogenicidade bacteriana (IMRE et al., 2013) e a presença/ausência de genes de virulência, associada a maior ou menor indução de alteração histológica, expressão de interleucinas e consequente excreção do microrganismo. Aos 14 e 21 dias, aves SEA apresentam maior processo inflamatório no ceco, o que pode desencadear uma resposta sistêmica com consequente interferência no desempenho da ave. Pode-se sugerir que a redução no ganho de peso observada em frangos desafiados com SEA não está relacionada às alterações histológicas observadas em íleo, mas sim a presença da bactéria no trato gastrointestinal da ave e seus anexos, como fígado e ceco. Segundo Klasing (2007), o aumento da demanda de células inflamatórias pode modificar o direcionamento da utilização de recursos orgânicos pelo animal e afetar o ganho de peso das aves.

Na FIGURA 3 observa-se maior amplitude nos valores referentes às alterações histológicas do ceco de frangos desafiados com SEA e SEB quando comparados aos grupos NEG e SH. Esta variação pode ser observada em todos os períodos avaliados, o que pode estar relacionado a maior adaptação deste sorovar ao hospedeiro, com presença de alteração histológica no local considerado seu principal órgão de colonização associado a maior número de isolamento microbiológico (TABELA 4).

Após a infecção por microrganismos patogênicos intracelulares, a área do vilo e a espessura de lâmina própria podem ser alteradas devido ao desenvolvimento de resposta inflamatória na mucosa intestinal. Aos 14 e 21 dias, frangos desafiados com o sorovar SEA apresentaram aumento nestes índices quando comparado aos demais tratamentos, bem como maior infiltração inflamatória mista (IIMLP) (FIGURA 4). Estes dados estão de acordo com Rychlik et al. (2014) e Borsoi et al. (2009), que observaram espessamento da mucosa cecal associada com edema e maior quantidade de células inflamatórias em aves desafiadas com os sorovares Enteritidis e Heidelberg, respectivamente.

TABELA 7. Média \pm Erro-padrão das alterações histológicas em ceco as 16 horas PI, 14 e 21 dias nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Área do viló (μm^2)	Caliciformes / μm^2 (10^{-5})	Hemácias / μm^2 (10^{-5})	Heterófilos / μm^2 (10^{-5})	Linfócitos Epiteliais / μm^2 (10^{-5})	IIMLP/ μm^2 (10^{-5})	IIMEP/ μm^2 (10^{-5})	Espessura de lâmina própria(μm)
16 horas PI								
NEG	21549 \pm 843,56	8,49 \pm 1,31b	6,09 \pm 1,01	0,73 \pm 0,34c	6,59 \pm 0,98bc	18,26 \pm 1,28c	6,96 \pm 0,98bc	22,61 \pm 1,92
SH	24403 \pm 1149,7	7,43 \pm 1,03b	8,35 \pm 1,81	2,87 \pm 0,76b	4,90 \pm 0,81c	19,23 \pm 1,54c	5,27 \pm 0,83c	25,27 \pm 2,09
SEA	23212 \pm 1005,5	7,71 \pm 1,35b	4,04 \pm 0,77	2,06 \pm 0,53b	0,10 \pm 0,95b	35,84 \pm 2,58b	10,41 \pm 0,96b	22,87 \pm 2,08
SEB	21597 \pm 947,37	21,75 \pm 2,26a	6,33 \pm 0,98	3,45 \pm 1,09a	15,96 \pm 1,64a	56,17 \pm 4,96a	16,59 \pm 1,70a	22,57 \pm 2,64
P	0,126	<0,001	0,098	0,057	<0,001	<0,001	<0,001	0,791
14 dias								
NEG	25770 \pm 1044,6b	6,78 \pm 1,16	6,31 \pm 1,04b	4,12 \pm 1,40b	3,76 \pm 0,59b	26,21 \pm 2,14	8,07 \pm 0,93bc	21,09 \pm 2,24b
SH	27230 \pm 1228,5b	5,00 \pm 0,89	12,66 \pm 2,36a	5,26 \pm 1,06b	4,73 \pm 0,58ab	26,39 \pm 3,82	5,07 \pm 0,62c	41,68 \pm 4,28a
SEA	34749 \pm 1824,9a	6,94 \pm 0,88	10,10 \pm 1,89ab	21,40 \pm 3,58a	6,79 \pm 0,78a	34,15 \pm 4,44	13,47 \pm 1,94a	52,83 \pm 7,06a
SEB	25943 \pm 1322,2b	4,39 \pm 0,79	7,02 \pm 1,74b	13,65 \pm 4,04ab	5,63 \pm 0,75ab	28,16 \pm 3,92	11,27 \pm 1,78ab	39,55 \pm 4,26a
P	<0,001	0,146	<0,001	<0,001	0,015	0,386	<0,001	<0,001
21 dias								
NEG	27087 \pm 927,0 bc	7,31 \pm 0,82b	10,41 \pm 1,10a	1,77 \pm 0,45	6,19 \pm 0,68b	43,35 \pm 3,19b	6,37 \pm 0,68b	18,12 \pm 1,80c
SH	26357 \pm 917,09c	7,20 \pm 0,94b	5,73 \pm 0,84b	1,46 \pm 0,58	9,25 \pm 0,94a	48,55 \pm 3,98b	9,89 \pm 0,96ab	35,87 \pm 3,20b
SEA	33659 \pm 1243,1a	17,43 \pm 1,82a	6,41 \pm 0,69b	3,06 \pm 0,43	9,33 \pm 1,38a	72,17 \pm 4,19a	10,58 \pm 1,46a	61,02 \pm 6,86a
SEB	30786 \pm 1339,5ab	19,52 \pm 1,76a	4,42 \pm 0,78b	2,65 \pm 0,60	6,53 \pm 0,74b	37,13 \pm 4,00b	7,41 \pm 0,78ab	38,12 \pm 4,33b
P	<0,001	<0,001	<0,001	0,096	0,037	<0,001	0,012	<0,001

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no Teste de Tukey (P<0,05).

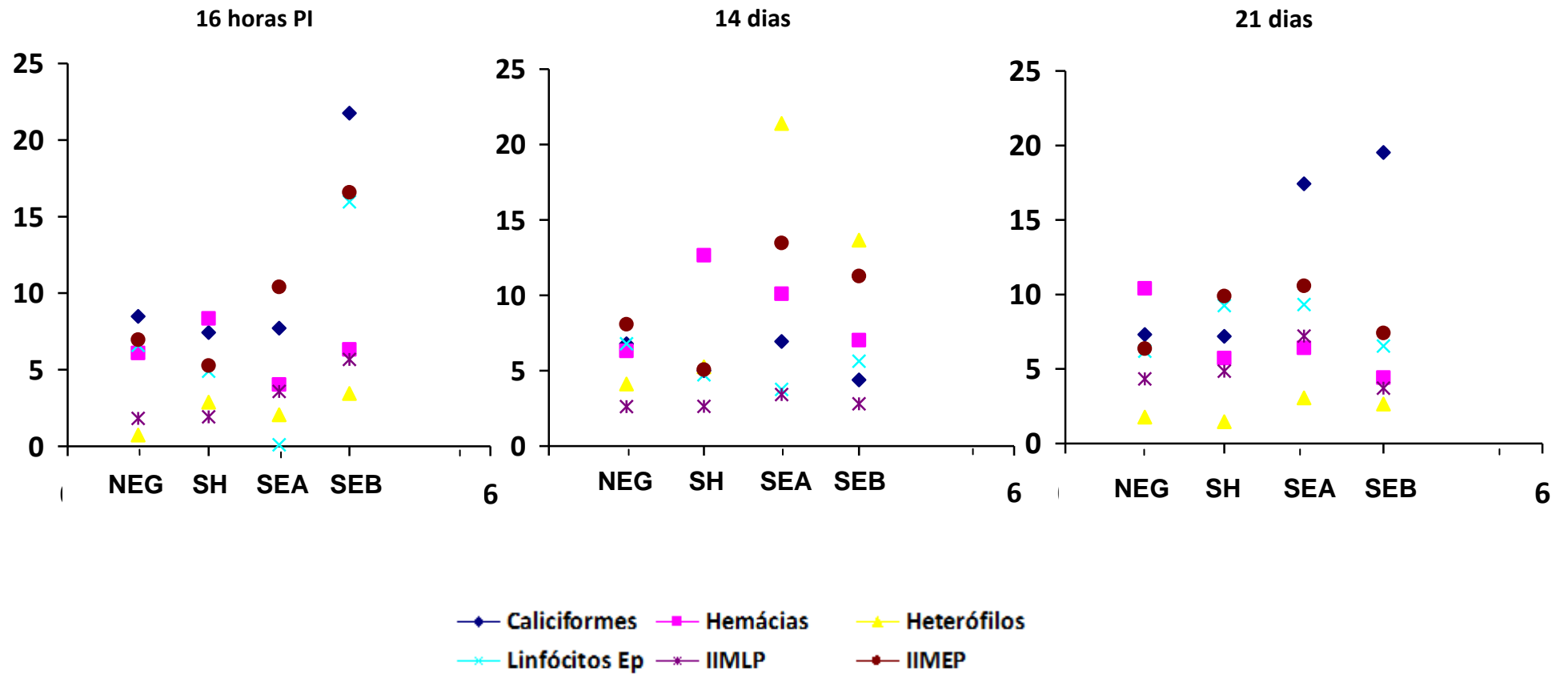


FIGURA 3. Dispersão de alterações histológicas em ceco as 16 horas PI, 14 e 21 dias nos diferentes tratamentos.

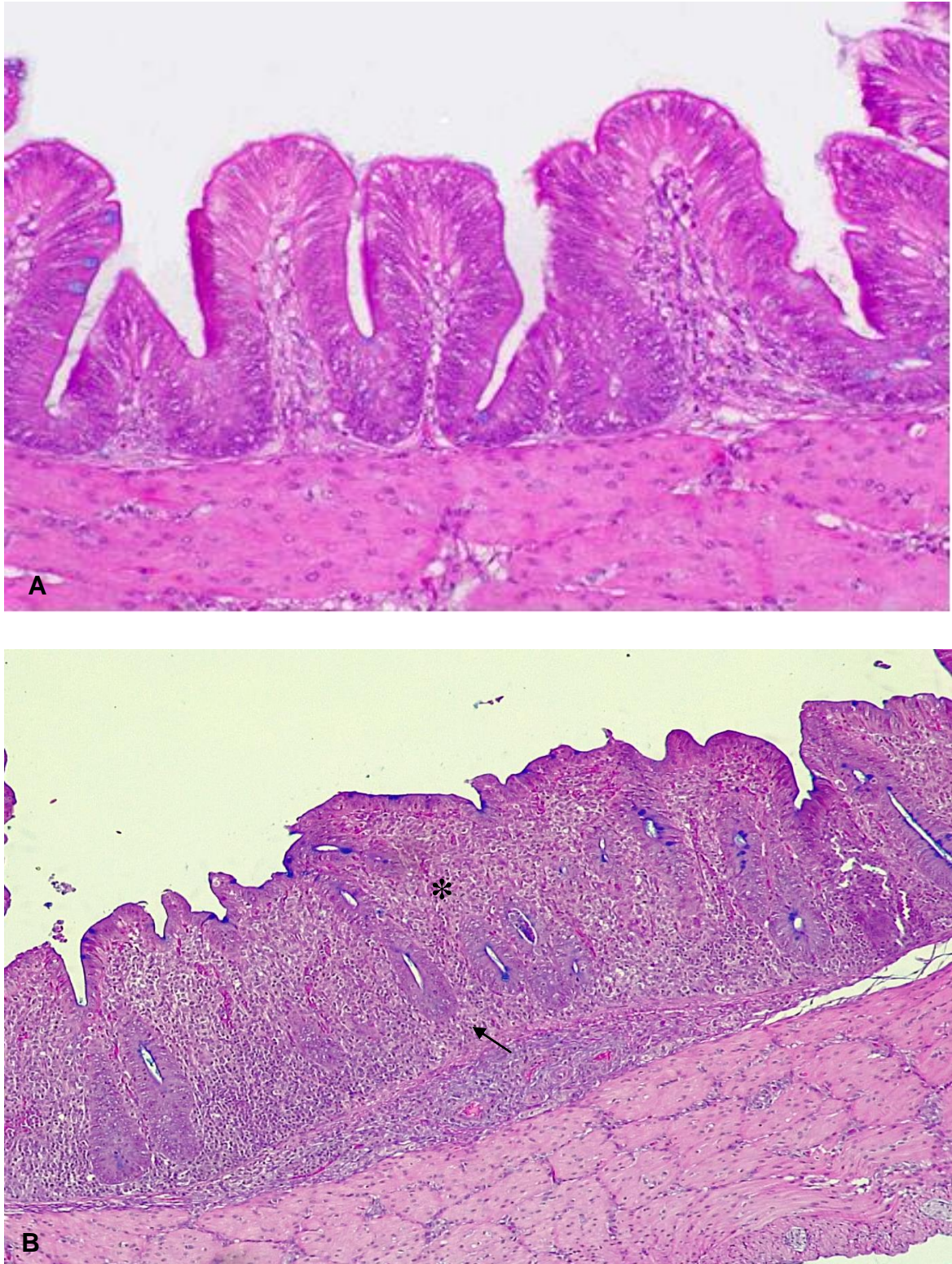


FIGURA 4. Fotomicrografia do ceco de frangos não desafiados (A) e desafiados com *Salmonella* Enteritidis cepa A (B) aos 14 dias. Notar diferença em espessura de lâmina própria (seta) e área do vilão com infiltração inflamatória mista na lâmina própria (asterisco). Hematoxilina e eosina associada com Alcian Blue, objetiva 10X.

Após a detecção inicial da *Salmonella* no epitélio intestinal, macrófagos, heterófilos e linfócitos iniciam uma resposta para restringir a propagação do microrganismo para os demais órgãos do hospedeiro. Neste processo, a indução de citocinas tem sido amplamente reportada (ECKMANN; KAGNOFF, 2001; ROSENBERGER et al., 2001; VAN IMMERSEEL et al., 2002; BERNDT et al., 2007; FASINA et al., 2010; SETTA et al., 2012; RYCHLIK et al., 2014). As análises de interleucinas no fígado e ceco as 16 horas pós-inoculação não apresentam diferença significativa para IL6 e IL12, bem como IL8 no fígado e IL10 no ceco dos frangos (FIGURA 5). Setta et al. (2012) em estudo comparativo entre os sorovares Enteritidis, Infantis, Gallinarum e Pullorum não observou diferença estatística na expressão de IL6 no ceco das aves. Já Berndt et al. (2007) observou maior expressão de IL12 no ceco de aves desafiadas com o sorovar Enteritidis quando comparado aos sorovares Typhimurium, Hadar e Infantis. No presente trabalho frangos desafiados com SEB apresentam maior expressão de IL10 no fígado quando comparada as aves desafiadas com SH, assim como maior expressão de IL8 no ceco em comparação com SEA e SH. Estes resultados podem estar relacionados com a presença do patógeno e as alterações histológicas no fígado e ceco dos frangos desafiados. Frangos SEB apresentam altos valores de alteração histológica em fígado 16 horas PI, assim como foi observada alta quantificação de heterófilos, linfócitos epiteliais, IIMLP e IIMEP no ceco de frangos SEB. Após a infecção, como uma tentativa de eliminar o patógeno, pode ocorrer aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL8, com posterior elevação dos níveis de IL10 para modular a inflamação e desenvolver tolerância imunológica. Enquanto IL8 está relacionada a recrutamento de heterófilos para o local da infecção (RYCHLIK et al., 2014), a interleucina 10 inibe as defesas do organismo contra a infecção por *Salmonella* (BERNDT et al., 2007).

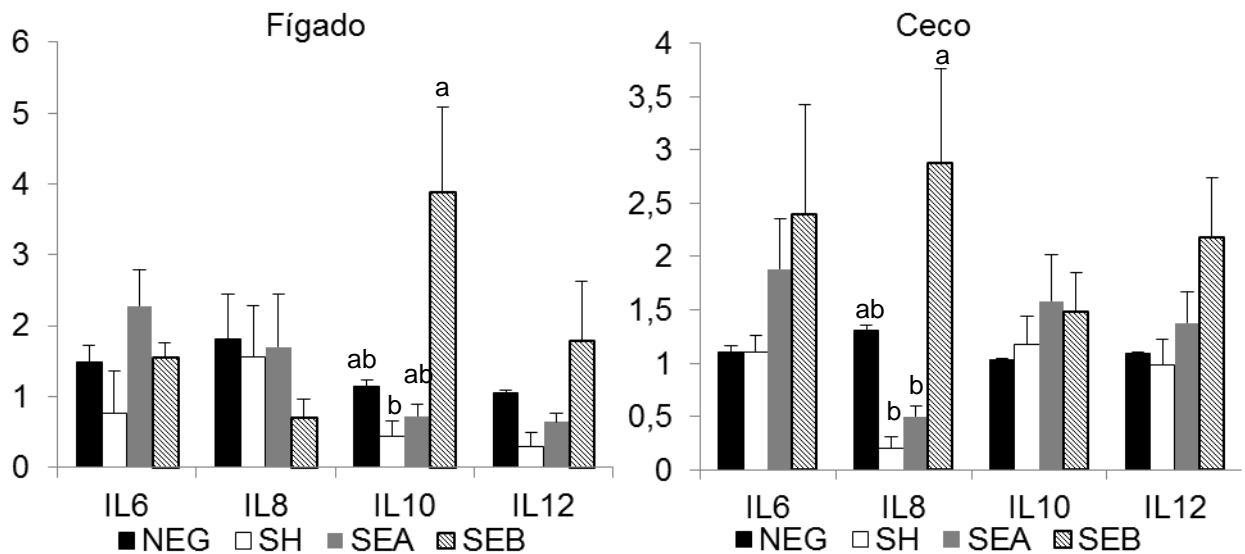


FIGURA 5. Média \pm Erro-padrão da expressão de IL6, IL8, IL10 e IL 12 em fígado e ceco de frangos as 16 horas PI nos diferentes tratamentos. Barras com letras diferentes indicam diferença estatística para o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados das análises de correlação entre os dados de histologia de fígado e íleo, e desempenho estão apresentados na TABELA 8. Foram observados poucos resultados significativos uma vez que o desafio com salmonelas paratíficas tende a causar pouca interferência nos parâmetros relacionados ao desempenho das aves. Vale ressaltar que os valores atribuídos para o fator de impacto (FI) destas análises foram determinados com base na redução da capacidade funcional do órgão, ou seja, digestão e absorção de alimentos.

Os resultados de fígado apresentam correlação positiva significativa entre CRM, CA e vacuolização celular, observada aos 10 dias (16 horas PI), o que indica que quanto maior o consumo de ração médio e a conversão alimentar, maior a observação de vacuolização celular nos hepatócitos. O fígado participa ativamente da digestão de nutrientes e, alterações metabólicas e/ou doenças hepáticas estão relacionadas com a presença de diferentes graus de vacuolização celular (ITO et al., 2009). Esta alteração não é diretamente prejudicial à célula, mas sim uma resposta comum a causas variadas, como a absorção da gema nos primeiros dias de vida dos frangos, as quais podem também afetar a ingestão de alimento na tentativa de compensar disfunções fisiológicas em outros tecidos (CENTER, 1996). Este mesmo mecanismo pode ser utilizado para explicar a correlação positiva significativa

observada entre CRM, CA e o escore total das alterações histológicas neste mesmo período.

TABELA 8. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre análise histológica no fígado e íleo das aves e de desempenho (GPM, CRM e CA¹) nos diferentes períodos.

Análise histológica	r para GPM			r para CRM			r para CA		
	10 d	14 d	21 d	10 d	14 d	21 d	10 d	14 d	21 d
Parâmetros para fígado:									
Congestão	-0,21	-0,51*	-0,26	0,32	-0,09	-0,24	0,41	0,36	-0,04
Degeneração hidrópica	-0,19	-0,08	-0,17	0,23	-0,12	-0,19	0,35	-0,03	-0,05
Vacuolização celular	0,03	0,28	-0,13	0,54*	0,05	0,13	0,51*	-0,18	0,16
Proliferação de ducto biliar	-0,01	0,01	-0,02	-0,09	-0,03	0,27	0,01	-0,02	0,19
Infiltração linfóide	-0,41	-0,49*	0,11	0,07	-0,36	0,13	0,54*	0,08	0,05
Pericolangite	0,11	0,02	-0,33	-0,02	-0,17	-0,12	-0,13	-0,18	0,10
Necrose	-0,40	0,17	0,05	0,01	-0,01	-0,12	0,46	-0,16	-0,13
Agregado linfóide	0,27	0,36	0,09	-0,01	0,46	0,28	-0,27	0,12	0,16
Total	-0,11	0,03	-0,26	0,49*	0,07	0,03	0,59*	0,05	0,15
Parâmetros para íleo:									
Espessura de lâmina própria	-0,02	0,43	0,27	0,51*	0,30	0,11	0,46	-0,08	-0,07
Espessura epithelial	-0,01	-0,08	-0,24	-0,18	0,07	-0,03	-0,12	0,14	0,12
Proliferação de enterócitos	-0,01	0,14	0,24	-0,10	0,22	0,38	-0,08	0,08	0,16
Infiltração plasmática epithelial	-0,13	-0,19	0,04	-0,27	-0,06	-0,11	-0,09	0,13	-0,11
Infiltração inflamatória mista	0,24	0,12	-0,20	0,58*	0,18	0,19	0,31	0,08	0,24
Hiperplasia de células caliciformes	-0,03	-0,06	0,01	-0,27	-0,03	-0,05	-0,08	0,06	-0,05
Congestão	0,25	-0,18	-0,08	0,16	0,21	0,06	-0,06	0,38	0,07
Necrose apical do vilos	-0,47	0,06	0,03	-0,14	0,12	0,12	0,39	0,07	0,07
Total	0,04	0,06	-0,02	0,37	0,22	0,21	0,34	0,17	0,16

*Indica coeficiente de correlação de Pearson significativo ($P < 0.05$).

¹GPM: ganho de peso médio; CRM: consumo de ração médio; CA: conversão alimentar.

²Para a análise de correlação os dados de desempenho foram obtidos nos períodos de 1 a 10 (16hPI), 1 a 14 e 1 a 21 dias e as análises histológicas foram realizadas aos 10 (16hPI), 14 e 21 dias, respectivamente.

Aos 14 dias observa-se correlação negativa significativa entre GPM, congestão e infiltração linfóide, ou seja, quanto menor o ganho de peso médio dos frangos, maior a observação de congestão e infiltração linfóide na histologia de fígado. O desenvolvimento do processo inflamatório envolve o acúmulo de hemácias e o recrutamento de células de defesa, com conseqüente aumento na produção de

células e proteínas. A produção de proteínas de fase aguda no fígado pode aumentar a necessidade de recursos orgânicos pelo animal e assim, afetar o ganho de peso das aves (KLASING, 1998; 2007; KOGUT, 2009). Essa correlação também foi observada por Kraieski et al. (2016).

No íleo os valores de espessura de lâmina própria, infiltração inflamatória mista e CRM estão positivamente correlacionados ($P < 0,05$), o que demonstra que o aumento do consumo médio de ração está diretamente relacionado com maior espessura e infiltração inflamatória mista na lâmina própria do íleo. Em mamíferos considera-se que as doenças intestinais (enteropatias) ocasionam má absorção de nutrientes gerando um aumento compensatório no consumo de alimentos (LEWIS et al., 1994). Segundo Williams (1996), a estrutura da lâmina própria é importante para uma ótima absorção de líquidos e nutrientes. Os vasos sanguíneos estão localizados logo abaixo da lâmina basal das células da mucosa, formando um curto caminho para partículas absorvidas alcançarem a circulação. Lesões na lâmina própria que afetam a absorção incluem infiltração celular, fibrose e acúmulo de líquido, e tais lesões formam uma barreira entre a superfície da mucosa e os capilares sanguíneos, interferindo com a difusão normal de fluidos e solutos.

Os demais parâmetros avaliados não apresentam correlação significativa com o desempenho das aves. Salmonelas paratíficas tendem a causar pouca ou nenhuma alteração no desempenho, o que justifica o baixo índice de correlação com as análises histológicas de íleo, uma vez que este órgão participa da digestão de gorduras, proteínas e amido, bem como da absorção de água e minerais (SVIHUS, 2014). Conforme observado em outros trabalhos com desafio de *Salmonella* em frangos (THOMPSON; APPLGATE, 2006; LOURENÇO et al., 2015) ocorre uma modificação na dinâmica celular do íleo mas que parece ser uma consequência das alterações observadas no ceco, principal órgão relacionado a colonização deste patógeno (FANELLI et al., 1971; SETTA et al., 2012).

No ceco, os dados de histologia foram correlacionados com a quantificação microbiológica (TABELA 9), uma vez que este órgão é o local de maior colonização de *Salmonella*. O ceco possui grande relação com a absorção de eletrólitos e água e pouca relação com a digestão e absorção de nutrientes (SVIHUS et al., 2013), o que pode explicar a escolha de não correlacionar seus dados com o desempenho das aves.

TABELA 9. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre análise histológica e de quantificação microbiológica no ceco das aves nos diferentes períodos.

Análise histológica	r para quantificação microbiológica	
	14d	21d
Área do vilo	0,36	0,28
Espessura de lâmina própria	0,69*	0,71*
Hiperplasia de células calciformes	-0,04	0,12
Linfócitos epiteliais	-0,09	0,51*
Hemácias	-0,41	0,51*
Heterófilos	-0,49*	0,27
Infiltração inflamatória mista na lâmina própria	0,51*	0,63*
Infiltração inflamatória mista epithelial	0,49*	-0,59*

*Indica coeficiente de correlação de Pearson significativo ($P < 0.05$).

A análise de correlação entre a histologia e a quantificação de *Salmonella* sp. em ceco mostrou-se bastante significativa, uma vez que quase todos os parâmetros avaliados apresentaram correlação com a maior ou menor presença do microrganismo. Aos 14 dias foi observado que o aumento na quantificação microbiológica de *Salmonella* no ceco induziu maior espessura e infiltração inflamatória mista na lâmina própria, além de maior infiltração inflamatória mista epithelial. Neste mesmo período o aumento na quantificação microbiológica estava relacionado a menor presença de heterofilos. Aos 21 dias o desafio microbiológico provocou aumento de espessura e infiltração inflamatória mista de lâmina própria, presença de linfócitos epiteliais, hemácias e infiltração inflamatória mista epithelial, além de menor infiltração inflamatória mista epithelial, acompanhada de aumento na quantificação microbiológica. Uma característica das infecções por salmonelas paratíficas é sua extensa multiplicação no lúmen intestinal e indução de resposta inflamatória no ceco, com limitada disseminação para órgãos como fígado e baço (RYCHLIK et al., 2014).

1.6 CONCLUSÕES

Os dados revelam que existem diferenças significativas relacionadas à capacidade e tempo de colonização, bem como alterações histológicas e expressão de citocinas entre as cepas de *Salmonella* utilizadas como desafio. *Salmonella* Enteritidis cepa A mostrou-se mais adaptada ao hospedeiro, com alto e constante

isolamento microbiológico associado a pouca indução de resposta inflamatória inicial nos órgãos avaliados, seguida de alta alteração histológica no ceco hospedeiro. A cepa de *Salmonella* Heidelberg induziu maior alteração histológica inicial em fígado e íleo, seguida de maior dificuldade de colonização, com posterior redução nos índices histológicos, sugerindo menor adaptação ao hospedeiro. Os dados mostram que a invasividade, ou isolamento microbiológico, está correlacionada com os dados de alterações histológicas em ceco, local de sobrevivência da *Salmonella*.

A metodologia utilizada para avaliação histológica do fígado e íleo de aves desafiadas com *Salmonella* apresentou poucas correlações significativas para fígado e íleo, uma vez que o desafio com salmonelas paratíficas tem pouca interferência no desempenho das aves. Já os parâmetros avaliados em ceco apresentam alta correlação com a presença do microrganismo.

REFERÊNCIAS

BARROW, P.A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathology**, v.20(1), p. 145-153, 1991.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75(12), p.5993-6007, 2007.

BONI, H.F.K.; CARRIJO, A.S.; FASCINA, V.B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12(1), p.84-95, 2011.

BORSOI, A., SANTIN, E.; SANTOS, L.R.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v.88, p. 750-758, 2009.

CENTER, S.A. Pathophysiology of liver diseases: Normal and Abnormal function. In: GUILFORD, W.G.; CENTER, S.A.; STROMBECK, R.D.; WILLIAMS, D.A.; MEYER, D.J. *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1996. p.553 – 632.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Persons infected with the outbreak strains of *Salmonella* Enteritidis, Hadar, Indiana, Muenchen or Muenster, by state of residence, as of September 23, 2015. Available in <http://www.cdc.gov/salmonella/live-poultry-07-15/map.html>. Acessado em 05 de outubro de 2016.

DESMIT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK., F. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.56, p.99-109, 1997.

ECKMANN, L. e KAGNOFF, M.F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.3, p.1191-1200, 2001.

FANELLI, M.J.; SADLER, W.W.; FRANTI, C.E.; BROWNELL, J.R. Localization of salmonellae within the intestinal tract of chickens. **Avian Diseases**, v.15, p. 366–375, 1971.

FASINA, Y.O.; HOERR, F.J.; MCKEE, S.R.; CONNER, D.E. Influence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection on intestinal goblet cells and villous morphology in broiler chicks. **Avian Diseases**, v.54, p.841 – 847, 2010.

FOLEY, S.L.; NAYAK, R.; HANNING, I.B.; JOHNSON, T.J.; HAN, J.; RICKE, S.C. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77(13), p.4273-4279, 2011.

FORDER, R.E.A.; HOWARTH, G.S.; TIVEY, D.R.; HUGHES, R.J. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. **Poultry Science**, v.86, p.2396 – 2403, 2007.

GAST, R.K. e BENSON, S.T. The comparative virulence for chicks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 isolates and isolates of phage types commonly found in poultry in the United States. **Avian Diseases**, v. 39, p. 567 – 574, 1995.

GENOVESE, K.J.; HE, H.; SWAGGERTY, C.L.; KOGUT, M.H. The avian heterophil. **Developmental and Comparative Immunology**, v.41, p.334 – 340, 2013.

IMRE, A.; BUKOVINSZKI, A.; LOVELL, M.A.; LI, H.; ZHOU, X.; BARROW, P.A. Gene expression analysis of *Salmonella enterica* SPI in macrophages indicates differences between serovars that induce systemic disease from those normally causing enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 675 – 679, 2013.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; MIYAJI, S.O.; LIMA, E.A. Fisiopatologia do Sistema digestório e anexos. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANASE, M.A.F. Ed(s). *Doenças das Aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 2009. p.215 – 264.

KAISER, P. Advances in avian immunology – prospects for disease control: a review. **Avian Pathology**, v.39(5), 309-324, 2010.

KLASING K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, n.8, p.1119-1125, 1998.

KLASING, K.C. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science**, v.48, p. 525-537, 2007.

KOGUT, M. H. e KLASING, K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. **Journal of Applied Poultry Research**, v.18, p.103–110, 2009.

KRAIESKI, A.L.; HAYASHI, R.M.; SANCHES, A.; ALMEIDA, G.C.; SANTIN, E. Effect of aflatoxin experimental ingestion and *Eimeria* vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. **Poultry Science**, DOI: 10.3382/ps/pew397, *in press*, 2016

LAHELLEC, C., e COLIN, P. Relationship between serotypes of *Salmonella* from hatcheries and rearing farms and those from processed poultry carcasses. **Brazilian Poultry Science**, v.26(2), p.79-186, 1985.

LEWIS, L.D.; MORRIS JR, M.L.; HAND, M.S. Gastrointestinal, Pancreatic and Hepatic Diseases. In: _____ *Small Animal Clinical Nutrition*. Kansas: Mark Morris Institute. 1994. p.1-40.

LOURENÇO, M.C.; KURITZA, L.N.; HAYASHI, R.M.; MIGLINO, L.B.; DURAU, J.F.; PICKLER, L., SANTIN, E. Effect of a mannanoligosaccharide-supplemented diet on intestinal mucosa T lymphocyte populations in chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Applied Poultry Research**, v.24, p. 15–22, 2015.

LOURENÇO, M.C.; DE SOUZA, A.M.; HAYASHI, R.M.; DA SILVA, A.B.; SANTIN, E. Immune response of broiler chickens supplemented with prebiotic from *Sacharomyces cerevisiae* challenged with *Salmonella* enteritidis or Minnesota. **Journal of Applied Poultry Research**, v.25 (2), p. 165-172, 2016.

MEDEIROS, M.A.; OLIVEIRA, D.C.; RODRIGUES D.P.; FREITAS, D.R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamena de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011

MUNIZ, E.C.; PICKLER, L.; LOURENÇO, M.C.; KRAIESKI, A.L.; MESA, D.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Avaliação da resposta imunológica intestinal de frangos de corte desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35(3), p.241 – 248, 2015.

PANDINI, J.A.; PINTO, F.G.S.; MULLER, J.M.; WEBER, L.D.; DE MOURA, A.C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-6, 2015.

PARISH, C.R. e O'NEIL, E.R. Dependence of the adaptative immune response on innate immunity: some questions answered but new paradoxes emerge. **Immunology & Cell Biology**, v.75(6), p. 523 – 527, 1997.

RICHLIK, I; ELSHEIMER-MATULOVA, M.; KYROVA, K. Gene expression. In the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. **Veterinary Research**, v.45, p.119 – 132, 2014.

Rostagno, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais - 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 252p, 2011.

ROSENBERGER, C.M.; POLLARD, A.J.; FINLAY, B.B. Gene array technology to determine host responses to *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.3, p.1353–1360, 2001.

SETTA, A. M.; BARROW, P.A.; KAISER, P.; JONES, M.A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella* enterica serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: Cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.35, p.397-410, 2012.

SMIRNOV, A.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v.134, p.736-742, 2004.

SVIHUS, B.; CHOCT, M.; CLASSEN, H.L. Function and nutritional roles of the avian caeca: a review. **World's Poultry Science Journal**, v.19, 2013.

SVIHUS, B. Function of the digestive system. **Journal of Applied Poultry Research**, v.23, p.1 – 9, 2014.

SWAGGERTY, C.L.; KOGUT, M.H.; FERRO, P.J.; ROTHWELL, L.; PEVZNER, I.Y.; KAISER, P. Differential cytokine mRNA expression in heterophils isolated from *Salmonella*-resistant and –susceptible chickens. **Immunology**, v.113, p. 139 – 148, 2004.

THOMPSON, K.L. e APPLGATE, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. **Poultry Science**, v.85(9), p.1535 – 1540, 2006.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and post-hatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v.82, p. 320 – 327, 2003.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the cecal lamina propria of chickens after neonatal infection with *Salmonella* Enteritidis strain. **Developmental and Comparative Immunology**, v.26, p.355-364, 2002.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES, D.P.; BACK A. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94(3), p.433-441, 2015.

**CAPÍTULO 2 RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM
PREBIÓTICO DERIVADO DE *SACHAROMYCES CEREVISIAE* DESAFIADOS
COM *SALMONELLA* ENTERITIDIS OU MINNESOTA**

Artigo publicado na revista Journal of Applied Poultry Research, n.25 (2), 165-172,
2016. (Anexo A)

2 RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PREBIÓTICO DERIVADO DE *SACHAROMYCES CEREVISIAE* DESAFIADOS COM *SALMONELLA ENTERITIDIS* OU MINNESOTA

*Immune response of broiler chickens supplemented with prebiotic from *Sacharomyces cerevisiae* challenged with *Salmonella Enteritidis* or Minnesota*

2.1 RESUMO

Salmonella enterica possui mais de 2.500 diferentes sorovares que têm sido descritos como causa de infecções no homem, sendo que *S. enterica* sorovar Enteritidis é o mais prevalente. Em algumas regiões do Brasil *S. enterica* sorovar Minnesota apresentou prevalência de 37,93% em amostras de frangos. Este estudo avaliou o efeito do prebiótico (PREB) a base de mananoligossacarídeo na resposta imune de frangos desafiados contra *Salmonella* Enteritidis (SE) ou Minnesota (SM). PREB aumentou o ganho de peso e reduziu a recuperação de *Salmonella* e a expressão de genes de IL12 em fígado de aves desafiadas com SE, mas não preveniu a colonização por SM no fígado das aves as 16 horas pós-inoculação. No momento do desafio, aves suplementadas com PREB apresentaram maior escore para infiltração linfocitária na lâmina própria e dilatação de vilosidade, sugerindo maior reação inflamatória quando comparado com o grupo não suplementado. A suplementação com PREB pode prevenir a colonização de SE no fígado dos frangos as 16 horas pós-inoculação, entretanto não apresentou efeito em frangos desafiados com SM. O desafio com o sorovar Enteritidis induziu maior expressão de mRNA IL12 quando comparado ao sorovar Minnesota.

Palavras-chave: citocinas, IL10, IL12, imunidade, mucosa intestinal, MOS

2.2 ABSTRACT

Salmonella enterica has over 2,500 different serovars that have been described as causes of human infections and *S. enterica* serovar Enteritidis is the most prevalent of these serovars. In some regions in Brazil *S. enterica* serovar Minnesota was prevalent in 37.93% of broilers samples. This study evaluated the effect of a prebiotic (PREB) based on mannan oligosaccharide on the immune response of broilers challenged against *Salmonella* Enteritidis (SE) or Minnesota (SM). PREB supplementation increased the weight gain and reduced *Salmonella* recovered and mRNA gene expression of IL12 in livers of SE-challenged broilers, but did not prevent colonization by SM in the liver at 16 hours after challenge. At the time of challenge, birds supplemented with PREB had higher lymphocyte scores in the lamina propria and villi dilation, suggesting an inflammatory reaction when compared to a non-supplemented group. PREB supplementation could prevent SE colonization in livers of broilers 16 hours after challenge; however has no effect on SM challenged birds. The challenge with serovar Enteritidis induces higher IL12 mRNA expression levels than challenge with SM.

Key words: cytokines, IL10, IL12, immunity, intestinal mucosa, MOS

2.3 DESCRIÇÃO DO PROBLEMA

Salmonella enterica possui mais de 2.500 diferentes sorovares que têm sido descritos como causa de infecções em humanos (MURMANN et al., 2008), sendo que *S. enterica* sorovar Enteritidis (SE) é o mais prevalente (OLSEN et al., 2001; ANVISA, 2007).

Outro sorovar também tem se mostrado prevalente em algumas partes do mundo. Um estudo brasileiro (VOSS-RECH et al., 2015) encontrou 20 diferentes sorovares de *Salmonella* em amostras de frangos e *S. enterica* sorovar Minnesota (SM) apresentou prevalência de 37.93%.

Estudos epidemiológicos (RABSCH et al., 2000; CALLAWAY et al., 2008) demonstram alternância entre os diferentes sorovares na população, o que indica que um sorovar pode ocupar o nicho ecológico de outro sorovar específico. Entretanto, considerando a emergência de novos sorovares e a re-emergência de outros (LAHELLEC E COLIN, 1985; FOLEY et al., 2011; VOSS-RECH et al., 2015)

em certas regiões, o controle das salmoneloses depende do conhecimento do comportamento de cada sorovar no que diz respeito a sua prevalência e características patogênicas.

As práticas de biossegurança são o método mais importante para prevenção da infecção por *Salmonella* em lotes comerciais de frangos. Além disso, o uso de aditivos alimentares como prebióticos pode auxiliar neste controle. Prebióticos (PREB) a base de mananoligossacarídeos (MOS), derivados de parede celular de levedura *Sacharomyces cerevisiae* são efetivos para o controle de SE por atuar diretamente na aglutinação de fimbrias tipo 1, prevenindo a ligação da bactéria com as células do trato gastrointestinal (TGI) (SPRING et al., 2000). Entretanto, um estudo *in vitro* (BOROWSKY et al., 2009) demonstrou que o MOS possui pouca ação sobre a aglutinação de SM e não existem estudos *in vivo* demonstrando que MOS possui efeito na aglutinação deste mesmo sorovar.

Prebióticos derivados de leveduras também são descritos como moduladores da resposta imunológica (SHASHIDHARA; DEVEGOWDA, 2003) com consequente efeito indireto no controle de microrganismos. As células de defesa do hospedeiro reconhecem moléculas chamadas "padrões moleculares associados a patógenos", como os componentes da parede celular de leveduras, glucanos e mananos (ABBAS, 2000). Estas moléculas podem desencadear uma resposta imunológica com aumento ou redução da expressão de algumas citocinas e quimiocinas, as quais apresentam importante função e diferentes níveis de expressão no controle de infecções por bactérias como a *Salmonella* spp. (VAN HEMERT et al., 2006; BERNDT et al., 2007; SETTA et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar um PREB a base de MOS na resposta imunológica, histologia da mucosa intestinal e no controle de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e sorovar Minnesota em frangos experimentalmente desafiados contra estes sorovares.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de ética no Uso de Animais do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - Protocolo 013/2009.

2.4.1 Aves, desenho experimental, dietas e alojamento

Foram utilizados 160 frangos de corte machos de um dia de idade da linhagem Cobb (Cobb-Vantress Brasil Ltda.), os quais foram individualmente pesados e distribuídos em dois diferentes testes, ambos com dois tratamentos e quatro repetições de 10 aves cada. Teste A: 1) SE – aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis e alimentadas com dieta controle sem PREB e 2) SE + PREB – aves desafiadas com SE e alimentadas com dieta controle suplementada com PREB (400g/t, Actigen, Alltech Inc.). Teste B: 3) SM – aves desafiadas com *Salmonella* Minnesota e alimentadas com dieta controle e 4) SM + PREB – aves desafiadas com SM e alimentadas com dieta controle suplementada com PREB (400g/t, Actigen, Alltech Inc.).

O PREB (Actigen, Alltech Inc.) utilizado é derivado de *Sacharomyces cerevisiae* com pelo menos 400 ppm of MOS como garantia.

As aves foram alojadas em salas isoladas, com pressão negativa, cama de maravalha e em condições ideais de umidade e temperatura. A cama de maravalha foi previamente autoclavada a 121° C por 15 minutos para evitar a contaminação por *Salmonella* ou outros microrganismos de outras fontes que não os utilizados como desafio.

Foram utilizadas dietas a base de milho e farelo de soja (NRC, 1994) sem a adição de antibióticos promotores de crescimento e anticoccidianos ou outro aditivo alimentar que não o objeto deste estudo. As aves receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidas sob programa de luz contínua.

2.4.2 Pesagens e coleta de amostras

Cada ave foi individualmente pesada no início do experimento (dia 1), as 0 e 16 horas pós-inoculação (PI), nos momentos das necropsias (8 e 9 dias no Teste A e 10 e 11 dias no Teste B). As 0 e 16 horas PI, oito aves por tratamento foram eutanasiadas para coleta asséptica de amostras de fígado e ceco para análises microbiológicas. No mesmo período, amostras de íleo (2 cm abaixo da junção ileocecal) e ceco (fragmento final do ceco esquerdo) foram fixados em formol tamponado 10% para análise histológica. Amostras de fígado e íleo foram armazenadas em RNAlater (Ambion®) para as análises de citocinas.

2.4.3 Desafio

Os inóculos de SE e SM foram preparados de acordo com metodologia modificada (PICKLER et al., 2012). As cepas de *Salmonella* Enteritidis e Minnesota provenientes de granjas comerciais de frangos foram identificadas e subsequentemente plaqueadas em Ágar Verde Brilhante (Oxoid®) para quantificação. Aves do Teste A foram inoculadas com 1 mL de solução oral contendo $12,3 \times 10^6$ UFC / mL de *Salmonella* Enteritidis aos 8 dias de idade e aves do Teste B foram inoculadas com 1 mL de solução oral contendo $7,5 \times 10^6$ UFC / mL de *Salmonella* Minnesota aos 10 dias de idade.

2.4.4 Análises microbiológicas

As amostras foram diluídas em água peptonada 2% (Oxoid®) na proporção de 1:9. Uma alíquota de 1mL desta solução foi adicionada em 9 mL de água peptonada 0,1%, seguida de diluições decimais até atingir a diluição 10^{-3} . Em seguida, 100 uL de cada diluição foram plaqueados em duplicata em ágar Verde Brilhante (Oxoid®). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas para subsequente contagem de colônias típicas. A solução inicial de água peptonada 2% foi incubada a 35°C por 24 horas. Para amostras que não apresentaram crescimento nas análises quantitativas, 100uL da solução inicial foram adicionados a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e Tetrionato (Oxoid®) e incubados a 42°C por 24 horas para confirmar a negatividade/positividade para *Salmonella*. Os resultados das contagens de colônias típicas foram expressos de acordo com os Procedimentos para Contagem de Colônias (MAPA/Brasil, 2003).

2.4.5 Análises histológicas

As amostras foram processadas rotineiramente (Smirnov et al, 2004) e em seguida, analisadas histologicamente (MESA et al, 2014). As avaliações incluíram dilatação de vilo e vasos, fusão de vilo, infiltração linfocitária e edema na lâmina própria, hiperplasia de células caliciformes, presença de células plasmáticas no epitélio e necrose apical.

2.4.6 Isolamento de RNA e RT-PCR

A extração de RNA total foi realizada utilizando Trizol (Invitrogen®) e quantificada por espectrofotometria a 260 nm utilizando NanoDrop 2000. Após a

verificação da integridade do RNA em gel de agarose, este material foi submetido a tratamento com DNase I (Invitrogen®). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen®). A quantificação da expressão de mRNA para genes de citocinas utilizando RT-PCR foi realizada de acordo com protocolo previamente publicado (HUMPREY; KLASING, 2005) utilizando os genes descritos na TABELA 1. Foi utilizado o kit SYBR Green PCR Master Mix (Biosystems®) e o nível da expressão dos genes foi analisado em um termociclador StepOnePlus (Biosystems®) com protocolo de 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 58°C e 30 seg a 72°C. Os resultados do PCR em tempo real foram analisados utilizando o método comparativo 2- $\Delta\Delta$ CT (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Este método é baseado na redução dos valores do Ct (threshold cycle ou cycle threshold) do grupo controle comparado com o grupo de interesse. Cada amostra foi analisada em triplicata sendo que o valor do Ct de cada triplicata para o gene alvo foi subtraído da média dos valores das triplicatas do valor médio de Ct das triplicatas para o gene constitutivo antes da sua utilização na análise estatística.

TABELA 1. Sequência dos *primers* de citocinas^a

Gene	Sequencia do <i>primer</i> (5'-3')	Nº de acesso no banco de genes
<i>ch IL-10</i>	F:CGGGAGCTGAGGGTGAA R:GTGAAGAAGCGGTGACAGC	AJ621614
<i>ch IL-12p40</i>	F:AGACTCCAATGGGCAAATGA R:CTCTTCGGCAAATGGACAGT	NM 213571

^aOs oligonucleotídeos listados foram utilizados para analisar a expressão do gene em intestino e fígado por PCR em tempo real. F= forward; R= reverse.

2.4.7 Análise estatística

Os dados foram avaliados utilizando o programa estatístico Statistix 9 pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Dados paramétricos foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para médias com diferença significativa. Dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para avaliar os dados de presença/ausência das análises microbiológicas para *Salmonella*.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora vários estudos (HOOGE, 2004; HOOGE E CONNOLLY, 2011; BORZUK et al., 2012; LEA et al., 2013) tenham relatado que frangos suplementados com prebióticos a base de MOS podem apresentar melhor desempenho zootécnico, estudos controversos demonstram que a utilização de MOS não influencia nestes parâmetros (SHASHIDHARA E DEVEGOWDA, 2003; MARTÍNEZ et al., 2010; MATHIS et al., 2012; MUNYAKA et al., 2012).

Estes resultados controversos podem ser atribuídos às diferentes dosagens, formas e teor de manose, as condições ambientais, tempo de exposição, os desafios e idade das aves. No presente estudo, aves suplementadas com o prebiótico a base de MOS e desafiadas com o sorovar *Enteritidis* apresentaram maior ganho de peso corporal durante o período de inoculação, entre 0 e 16 horas PI, quando comparadas a aves não suplementadas (TABELA 2), mas isto não foi observado na grupo desafiado com SM. Estes dados sugerem que o melhor ganho de peso pode estar relacionado com a maior porcentagem de isolamento SE, maior escore para a infiltração de linfócitos na mucosa do intestinal e o aumento significativo na expressão de IL12 no fígado de aves não-suplementadas e desafiadas com SE, o que não foi observado nas aves suplementadas e desafiadas com SM. No teste com SM, não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso corporal para os diferentes tratamentos as 0 e 16 horas PI (TABELA 2).

TABELA 2. Média e erro padrão do ganho de peso (GP) de frangos desafiados aos 8 dias com *Salmonella* *Enteritidis* e frangos desafiados aos 10 dias com *Salmonella* Minnesota, no período de 0 a 16 horas pós-inoculação (PI) nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	GP (g)
	0-16h PI
SE	17,62±8,63 ^b
SE+PREB	37,00±6,18 ^a
Valor de P	0,001
SM	16,62±5,40
SM+PREB	18,00±5,42
Valor de P	0,619

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa para o teste de Tukey (P<0.05).

Os resultados das análises microbiológicas de *Salmonella* Enteritidis demonstram que a suplementação com PREB atrasa a colonização microbiológica no fígado, onde sua presença não foi observada as 16 horas PI e uma quantidade muito pequena foi isolada no ceco (TABELAS 3 e 4). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram redução de *Salmonella* em frangos de corte suplementados com MOS (SPRING et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2002). MOS derivado da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* pode comportar-se como um sítio de ligação de alta afinidade para patógenos com fímbrias manose-específicas ou tipo I, estimulando o crescimento e/ou a atividade de bactérias benéficas e impedindo a colonização intestinal por microrganismos patogênicos (GIBSON E ROBERFROID, 1995; SPRING et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2002; THOMAS et al., 2004; BAURHOO et al., 2009).

TABELA 3. Porcentagem (%) de *Salmonella* sp. no fígado e ceco de frangos desafiados aos 8 dias com *Salmonella* Enteritidis e frangos desafiados aos 10 dias com *Salmonella* Minnesota, no período de 0 a 16 horas pós-inoculação (PI) nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	16h PI	
	Fígado % (+/total)	Ceco% (+/total)
SE	12,5% (1/8) ^a	100% (8/8) ^a
SE + PREB	0% (0/8) ^b	87,5% (7/8) ^b
Valor de P	0,001	0,001
SM	0% (0/8) ^b	100% (8/8) ^a
SM + PREB	12,5% (1/8) ^a	87,5% (7/8) ^b
Valor de P	0,001	0,001

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa para o teste de Qui-quadrado ($P < 0.05$).

No teste com SM, a suplementação com PREB foi capaz de reduzir a presença de *Salmonella* no ceco das aves as 16 horas PI, mas não nas amostras de fígado, nas quais o grupo suplementado apresentou 12,5% de positividade frente a 0% do grupo SM. Um estudo *in-vitro* (BOROWSKY et al., 2009) demonstrou que a aglutinação entre MOS e SM é muito fraca quando comparada com a aglutinação de SE, sugerindo que a redução no isolamento de SM no ceco não pode ser explicada pelo mesmo mecanismo de aglutinação referente a SE.

Além disso, estudo recente (PICKLER et al., 2014) mostrou que apenas baixos níveis (20%) de bactérias chegam ao fígado de frangos desafiados com SM às 48 horas PI. De acordo com estes autores, a SM pode adaptar-se muito bem no

intestino do hospedeiro, causando uma leve indução de resposta imunológica e uma passagem temporária pelo fígado. No presente estudo, a expressão de RNAm para IL10 e IL12 no fígado não foi significativamente diferente entre os tratamentos de aves desafiadas com SM. No entanto, no teste com SE, houve uma maior expressão do RNAm de IL12 no fígado de aves SE em relação ao grupo SE + PREB as 16 horas PI (FIGURA 1).

Frangos desafiados com o sorovar Minnesota apresentaram menores níveis de expressão gênica de RNAm para IL10 e IL12 no fígado e íleo quando comparados a frangos desafiados com o sorovar Enteritidis (variando de 1 a 5 vezes de expressão a 5 a 40 vezes mais expressão, respectivamente). O grupo desafiado com SE também apresentou altas taxas de SE no fígado em comparação com SM. Estudos anteriores relataram um elevado poder de penetração do sorovar Enteritidis, com conseqüente aumento da expressão de RNAm para IL12 em frangos desafiados com SE em comparação ao desafio com Heidelberg, Typhimurium e Infantis (BERNDT et al., 2007).

Estas alterações na expressão gênica de citocinas podem estar diretamente relacionadas as alterações histológicas observadas na mucosa do ceco (TABELA 4). Após o desafio com SE e SM, observou-se um aumento na resposta imune de mucosa, representada por maior infiltração linfocitária na lâmina própria e hiperplasia de células calciformes, que também contribuem para a alteração da estrutura e da altura das vilosidades intestinais (VAN IMMENSEEL et al., 2002; BORSOI et al., 2009). No entanto, em frangos desafiados com SM, estas alterações não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos após o desafio.

Estes resultados podem estar relacionados com a presença deste organismo no intestino, como também observado num estudo comparativo de diferentes sorovares (SETTA et al., 2012). O desencadeamento de resposta imune após a infecção, como uma tentativa de eliminar o patógeno, pode elevar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL12. No entanto, é também necessário aumentar a expressão de IL10 para modular a inflamação e desenvolver tolerância imunológica. Vários estudos têm sido realizados para avaliar as respostas de expressão gênica de citocinas contra *Salmonella* (ECKMANN E KAGNOFF, 2001; ROSENBERGER et al., 2001; VAN IMMENSEEL et al., 2002). Tal como em outros organismos, este microrganismo é capaz de alterar os níveis de expressão de genes de citocinas em frangos. No fígado de frangos SM e íleo de frangos SE não foram observadas

diferenças estatísticas significativas, possivelmente devido à pequena mudança na expressão da citocina e ao alto desvio padrão observado entre as amostras analisadas. Mais amostras são necessárias para entender melhor o comportamento dessas citocinas em aves desafiadas com SM.

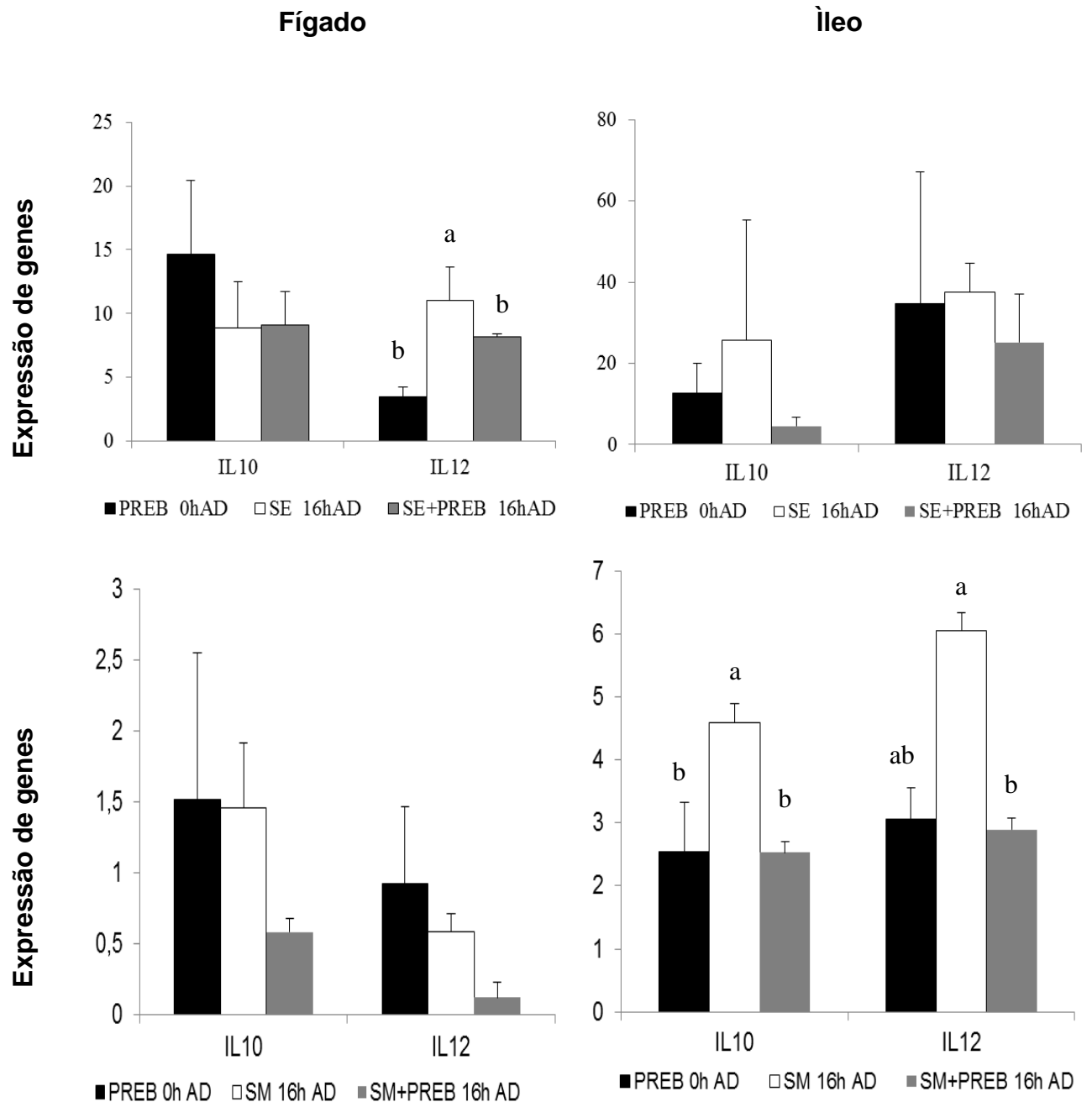


FIGURA 1. Relação dos níveis de expressão de IL10 e IL12 em fígado e íleo de frangos as 0 e 16 horas PI nos diferentes tratamentos. Barras com letras diferentes indicam diferença estatística para o teste de Tukey ($P < 0,05$).

O custo da resposta imunológica em frangos desafiados com sorovares de *Salmonella* bastante imunogênicos, como o sorovar Enteritidis, pode levar ao

aumento do metabolismo animal com um conseqüente aumento da produção de células imunes e proteínas como proteínas de fase aguda (KLASING, 2007), com conseqüente redução no desempenho animal.

TABELA 4. Escore de alterações microscópicas observadas na mucosa de íleo e ceco de frangos desafiados aos 8 dias com *Salmonella* Enteritidis e frangos desafiados aos 10 dias com *Salmonella* Minnesota, no período de 0 a 16 horas pós-inoculação (PI) nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Íleo		Ceco	
	0h PI	16h PI	0h PI	16h PI
SE	8,26±4,46 ^b	16,33±5,06	4,13±2,66	10,13±1,76 ^a
SE+PREB	13,47±5,87 ^a	17,40±5,79	5,67±3,15	6,27±2,37 ^b
Valor de P	0,036	0,595	0,161	0,001
SM	7,80±3,98 ^b	14,80±8,52	3,13±1,72	5,53±3,20
SM+PREB	10,47±6,11 ^a	11,26±6,02	2,00±1,02	7,40±4,14
Valor de P	0,020	0,108	0,200	0,178

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa para o teste de Tukey (P<0.05).

Nas análises histológicas de íleo e ceco (TABELA 4), no momento do desafio (0horas PI), frangos suplementados com PREB, em ambos os testes, apresentaram maior escore de infiltração linfocitária na lâmina própria e dilatação de vilos, sugerindo maior reação inflamatória quando comparado ao grupo não suplementado (FIGURA 2). Observou-se o desenvolvimento de resposta imune relacionada a presença do PREB no lúmen intestinal, mas isto não foi observado no ceco.

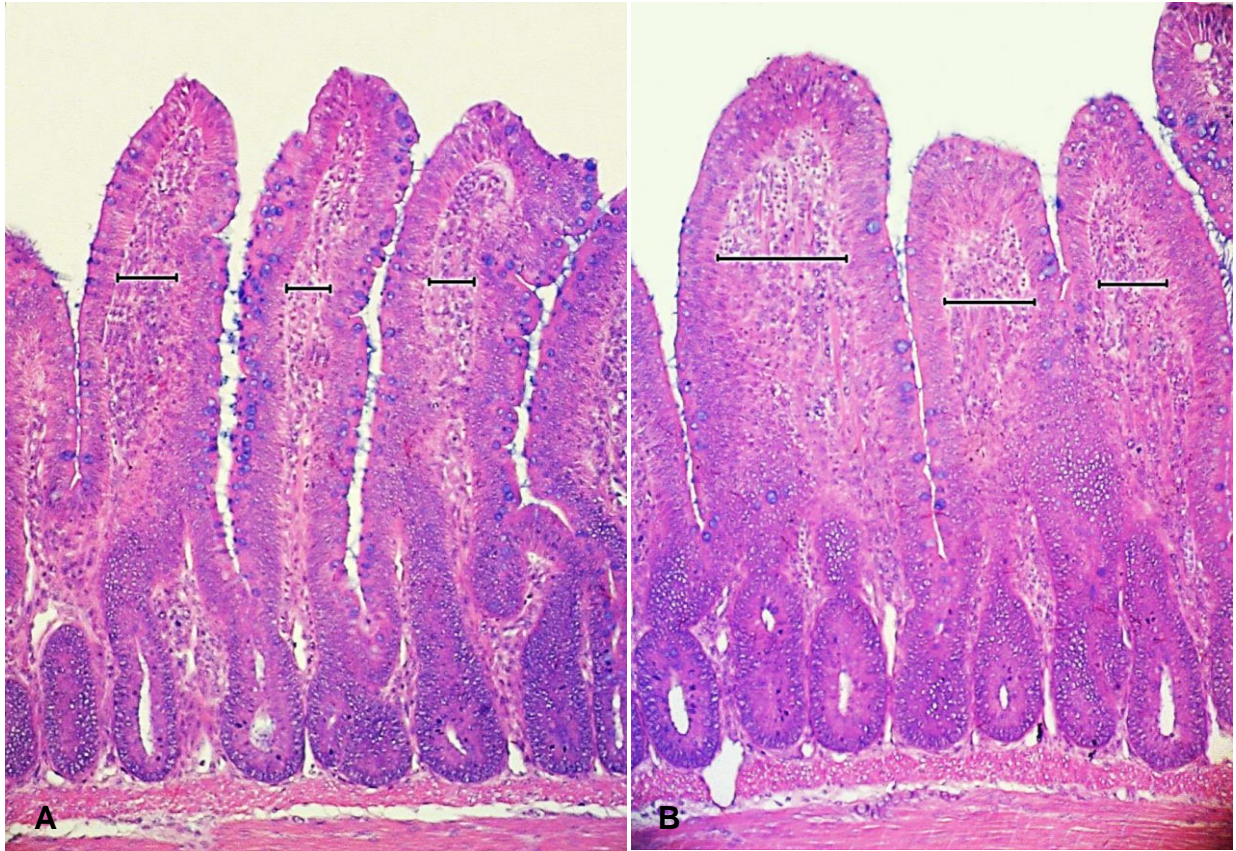


FIGURA 2. Fotomicrografia do íleo de frangos não suplementados (A) e suplementados com PREB (B) as 0 horas PI. Notar diferença em infiltração linfocitária na lâmina própria e dilatação de vilo. Hematoxilina e eosina associada com Alcian Blue, objetiva 10X.

As estruturas da parede celular de levedura são reconhecidas por células imunes como "padrões moleculares associados a patógenos", atuando como antígenos não específicos que são capazes de desencadear uma resposta imune (ABBAS, 2000). Estas observações estão de acordo com outros pesquisadores (GIBSON; ROBERFROID, 1995; MUNYAKA et al., 2012; LEA et al., 2013) que também demonstraram infiltração de células imunes na mucosa de frangos suplementados com prebióticos a base de MOS.

2.6 CONCLUSÕES E APLICAÇÕES

1. Em aves desafiadas com SE, a suplementação de PREB a base de MOS melhora o ganho de peso as 16 horas pós-inoculação quando comparado a frangos desafiados com SE e não suplementados, provavelmente devido a

redução na colonização por SE e a expressão de RNAm para IL12 no fígado. PREB a base de MOS não previne a colonização por SM no fígado as 16 horas após o desafio, contrariando o que foi observado para SE, e não afeta o ganho de peso.

2. O sorovar Enteritidis induz maior expressão de RNAm para IL12 quando comparado a frangos desafiados com SM.

REFERÊNCIAS

ABBAS A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. 2000. **Innate Immunity**, p.270-290. In: W. B. Saunders Company, Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, PA. 553p.

Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA.

ANVISA. 2007. Relatório anual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.

Applied Biosystems, Foster City, CA.

BAURHOO, B.; GOLDFLUS, F.; ZHAO, X. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.8(2), p.133-139, 2009.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella* enterica serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75(12), p.5993-6007, 2007.

BOROWSKY, L.; CORÇÃO, G.; CARDOSO, M. Mannanligosaccharide agglutination by *Salmonella* enterica strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.458-464, 2009.

BORSOI, A., SANTIN, E.; SANTOS, L.R.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v.88, p. 750-758, 2009.

BORZUK, M.; KUCUKYILMAZ, K.; ÇATLI, A.U.; CINAR, M.; BINTAS, E.; COVEN, F. Performance, egg quality, and immune response of laying hens fed diets supplemented with mannan-oligosaccharide or an essential oil mixture under moderate and hot environmental conditions. **Poultry Science**, v.91, p. 1379-1386, 2012.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; BYRD, J.A.; NISBET, D.J. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. **Journal of Animal Science**, v.86, E163-E172, 2008.

Cobb-Vantress Brasil Ltda., Guapiacu, São Paulo, Brazil.

ECKMANN, L. e KAGNOFF, M.F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.3, p.1191-1200, 2001.

FERNANDEZ, F.; HINTON, M.; GILS, B.V. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. **Avian Pathology**, v.31, p.49-58, 2002.

FOLEY, S.L.; NAYAK, R.; HANNING, I.B.; JOHNSON, T.J.; HAN, J.; RICKE, S.C. Population dynamics of *Salmonella* enterica serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77(13), p.4273-4279, 2011.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401–1012, 1995.

HOOGE, D.M. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide 1993-2003. **International Journal of Poultry Science**, v.3, p.163-174, 2004.

HOOGE, D.M.; CONNOLLY, A. Meta-analysis summary of broiler chicken trials with dietary Actigen® (2009-2001). **International Journal of Poultry Science**, v.10, p.819-824, 2011.

HUMPREY, B.D.; KLASING, K.C. The acute phase response alters cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A. v.142, p.485–494, 2005.

Invitrogen, Carlsbad, CA.

KLASING, K.C. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science**, v.48, p. 525-537, 2007.

LAHELLEC, C., e COLIN, P. Relationship between serotypes of *Salmonella* from hatcheries and rearing farms and those from processed poultry carcasses. **Brazilian Poultry Science**, v.26(2), p.79-186, 1985

LEA, H.; SPRING, P.; TAYLORD-PICKARD, J.; BURTON, E. A natural carbohydrate fraction Actigen® from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: effects on goblet cells, gut morphology and performance of broiler chickens. **Journal Applied of Animal Nutrition**, v.1, p.1-7, 2013.

MARTÍNEZ, B.F.; CONTRERAS, A.A.; GONZALEZ, E.A. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls in diets for two genetic strains of laying hens reared in floor and cages. **International Journal of Poultry Science**, v.9, p.105-108, 2010.

MATHIS, G.F.; LUMPKINS, B.; PIERCE, J.L.; HOOGE, D.M. Effects of dietary antibiotics, Actigen® yeast cell wall derivative, or both on broiler chicken live performance in a fifty-two day pen trial on built-up litter. **Journal of Poultry Science**, v.49, p. 313-318, 2012.

MESA, D., LOURENÇO, M.C.; WESTPHAL, P.; KRAIESKI, A.L.; SANTIN E. Modelo de protocolo experimental para induzir, classificar e avaliar as enterites inespecíficas em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34(10), p.929–936, 2014.

MUNYAKA, P. M.; ECHEVERRY, H.; YITBAREK, A.; CAMELO-JAIMES, G.; SHARIF, S.; GUENTER, W.; HOUSE, J.D.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C. Local and systemic innate immunity in broiler chickens supplemented with yeast-derived carbohydrates. **Poultry Science**, v.91, p.2164-2172, 2012.

MURMANN, L.; SANTOS, M.C.D.; LONGARAY, S.M.; BOTH, J.M.C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.529-534, 2008.

NRC. 1994. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

OLSEN, S.J., BISHOP, R.; BRENNER, F.W.; ROELS, T.H.; BEAN, N.; TAUXE, V.; SLUTSKER, L. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.753–761, 2001.

Oxoid Limited, Hampshire, UK

PICKLER, L., HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C.; MIGLINO, L.B.; LAGO, A.L.; BEIRÃO, C.B.B.; FISHER DA SILVA, A.V.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.27-36, 2012.

PICKLER, L.; MUNIZ, E.C.; KURITZA, L.N.; LOURENÇO, M.C.; SANTIN, E. Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Minnesota. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, p.1203, 2014.

RABSCH, H.B.M.; TSOLIS, R.M.; KINSLEY, R.A.; HINZ, K. Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, p.443-448, 2000.

ROSENBERGER, C.M.; POLLARD, A.J.; FINLAY, B.B. Gene array technology to determine host responses to *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.3, p.1353–1360, 2001.

SETTA, A. M.; BARROW, P.A.; KAISER, P.; JONES, M.A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella* enterica serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: Cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.35, p.397-410, 2012.

SCHMITTGEN, T.D., e LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, p.1101–1108, 2008.

SHASHIDHARA, R.G.; DEVEGOWDA, G. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. **Poultry Science**, v.82, p.1319-1325, 2003.

SMIRNOV, A., SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v.134, p.736-742, 2004.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.; NEWMAN, K. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, p.205-211, 2000.

THOMAS, W.E.; NILSSON, L.M.; FORERO, M.; SOKURENKO, E.V.; VOGEL, V. Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.53, p.1545-1557, 2004.

VAN HEMERT, S.; HOEKMAN, A.J.; SMITS, M.A.; REBEL, J.M.J. Early host gene expression responses to a *Salmonella* infection in the intestine of chickens with different genetic background examined with cDNA and oligonucleotide microarrays. **Comparative Biochemistry and Physiology**, D1, p.292-299, 2006.

VAN IMMERSEEL, F., DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. **Developmental & Comparative Immunology**, v.26, p.355-364, 2002.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES, D.P.; BACK A. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94(3), p.433-441, 2015.

Agradecimentos – Esta pesquisa foi parcialmente financiada por Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda., Araucária, PR, BR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por melhores ferramentas de controle das salmoneloses é uma constante na avicultura industrial devido a preocupação com saúde pública e os problemas relacionados a comercialização de produtos contaminados com este patógeno. Prebióticos a base de mananoligossacarídeos são importantes para a manutenção da saúde animal, principalmente na resposta imunológica e preparo prévio do animal para uma possível infecção. Seus efeitos dependem da cepa de *Salmonella* envolvida no processo de colonização, pois observou-se que o prebiótico foi eficiente em reduzir a excreção de *Salmonella* Enteritidis, mas não ocorreu o mesmo para *Salmonella* Minnesota. A *Salmonella* é um microrganismo de patogenicidade e epidemiologia complexas, o que torna improvável sua completa eliminação da cadeia avícola. Sendo assim, novas metodologias podem auxiliar no entendimento da interação do patógeno com o hospedeiro, possibilitando a melhor utilização de ferramentas de controle. Além de uma variedade de mais de 2.500 sorovares, as salmonelas apresentam particularidades individuais, que interferem diretamente em sua patogenicidade e na escolha da melhor forma de controle. No presente trabalho foram observadas diversas interações entre sorovares/cepas testadas e o hospedeiro, principalmente no que diz respeito a contagem microbiológica e alterações histológicas no ceco.

Frente a isso, recomenda-se constante estudo sobre os sorovares e cepas de *Salmonella* envolvidos em cada integração, região ou granja avícola industrial, além da avaliação molecular para pesquisa de genes de virulência e resistência.

REFERÊNCIAS

ABBAS A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. 2000. **Innate Immunity**, p.270-290. In: W. B. Saunders Company, Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, PA. 553p.

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal) Relatório Anual 2016. 136p. Disponível em <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>. Acessado em 01 de outubro de 2016.

Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA.

ANVISA. 2007. Relatório anual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.

ALALI, W.Q.; HOFACRE, C.L.; MATHIS, G.F.; FALTYS, G.; RICKE, S.C. e DOYLE, M.P. Effect of non-pharmaceutical compounds on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. **Food Control**, v.31, p. 125-128, 2013.

Applied Biosystems, Foster City, CA.

BARROW, P.A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathology**, v.20(1), p. 145-153, 1991.

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

BAURHOO, B.; GOLDFLUS, F.; ZHAO, X. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.8(2), p.133-139, 2009.

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

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75(12), p.5993-6007, 2007.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75, p.5993-6007, 2009.

BRENNER, F.W. 1998 Modified Kauffmann-White scheme. Center of Diseases Control and Prevention, Atlanta, GA.

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

BONI, H.F.K.; CARRIJO, A.S.; FASCINA, V.B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12(1), p.84-95, 2011.

BOROWSKY, L.; CORÇÃO, G.; CARDOSO, M. Mannanligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.458-464, 2009.

BORSOI, A., SANTIN, E.; SANTOS, L.R.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v.88, p. 750-758, 2009.

BORZUK, M.; KUCUKYILMAZ, K.; ÇATLI, A.U.; CINAR, M.; BINTAS, E.; COVEN, F. Performance, egg quality, and immune response of laying hens fed diets supplemented with mannan-oligosaccharide or an essential oil mixture under moderate and hot environmental conditions. **Poultry Science**, v.91, p. 1379-1386, 2012.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; BYRD, J.A.; NISBET, D.J. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. **Journal of Animal Science**, v.86, E163-E172, 2008.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014. Acessado em 14 de outubro de 2016.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Persons infected with the outbreak strains of *Salmonella* Enteritidis, Hadar, Indiana, Muenchen or Muenster, by state of residence, as of September 23, 2015. Available in <http://www.cdc.gov/salmonella/live-poultry-07-15/map.html>. Acessado em 05 de outubro de 2016.

CENTER, S.A. Pathophysiology of liver diseases: Normal and Abnormal function. In: GUILFORD, W.G.; CENTER, S.A.; STROMBECK, R.D.; WILLIAMS, D.A.; MEYER, D.J. *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1996. p.553 – 632.

Cobb-Vantress Brasil Ltda., Guapiacu, São Paulo, Brazil.

COSBY, D.E.; COX, N.A.; HARRISON, M.A.; WILSON, J.L.; BUHR, R.J.; FEDORKA-CRAY, P.J. Salmonella and antimicrobial resistance in broilers: A review. **Journal Applied of Poultry Research**, v.24, p.408-426, 2015.

DESMIT, M.; DUCATELLE, R; HAESEBROUCK., F. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.56, p.99-109, 1997.

ECKMANN, L. e KAGNOFF, M.F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.3, p.1191-1200, 2001.

FANELLI, M.J.; SADLER, W.W.; FRANTI, C.E.; BROWNELL, J.R. Localization of salmonellae within the intestinal tract of chickens. **Avian Diseases**, v.15, p. 366–375, 1971.

FASINA, Y.O.; HOERR, F.J.; MCKEE, S.R.; CONNER, D.E. Influence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection on intestinal goblet cells and villous morphology in broiler chicks. **Avian Diseases**, v.54, p.841 – 847, 2010.

FAO – WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization). Microbiological Risk Assessment Series 19. 2009. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: Meeting report.

FERNANDEZ, F.; HINTON, M.; GILS, B.V. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. **Avian Pathology**, v.31, p.49-58, 2002.

FOLEY, S.L.; NAYAK, R.; HANNING, I.B.; JOHNSON, T.J.; HAN, J.; RICKE, S.C. Population dynamics of *Salmonella* enterica serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77(13), p.4273-4279, 2011.

FORDER, R.E.A.; HOWARTH, G.S.; TIVEY, D.R.; HUGHES, R.J. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. **Poultry Science**, v.86, p.2396 – 2403, 2007.

FREITAS, J. B. Evolução epidemiológica de serovares prevalentes en la cadena productiva de aves y modelo de banco de cepas brasileiro. SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE SALMONELOSE AVIÁRIA. Rio de Janeiro-RJ, 28 a 30 de junho/2011.

GAST, R.K. e BENSON, S.T. The comparative virulence for chicks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 isolates and isolates of phage types commonly found in poultry in the United States. **Avian Diseases**, v. 39, p. 567 – 574, 1995.

GEBREYES, W.A.; DAVIES, P.R.; MORGAN MORROW, W.E.; FUNK, J.A.; ALTIER, C. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38(12), p.4633-4636, 2000.

GENOVESE, K.J.; HE, H.; SWAGGERTY, C.L.; KOGUT, M.H. The avian heterophil. **Developmental and Comparative Immunology**, v.41, p.334 – 340, 2013.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401–1012, 1995.

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

HOOGE, D.M. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide 1993-2003. **International Journal of Poultry Science**, v.3, p.163-174, 2004.

HOOGE, D.M.; CONNOLLY, A. Meta-analysis summary of broiler chicken trials with dietary Actigen® (2009-2001). **International Journal of Poultry Science**, v.10, p.819-824, 2011.

HUMPREY, B.D.; KLASING, K.C. The acute phase response alters cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A. v.142, p.485–494, 2005.

Invitrogen, Carlsbad, CA.

IMRE, A.; BUKOVINSZKI, A.; LOVELL, M.A.; LI, H.; ZHOU, X.; BARROW, P.A. Gene expression analysis of *Salmonella enterica* SPI in macrophages indicates differences between serovars that induce systemic disease from those normally causing enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 675 – 679, 2013.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; MIYAJI, S.O.; LIMA, E.A. Fisiopatologia do Sistema digestório e anexos. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANASE, M.A.F. Ed(s). *Doenças das Aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 2009. p.215 – 264.

KABIR, S.M.L. The role of probiotics in the poultry industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.3531 – 3546, 2009.

KAISER, P. Advances in avian immunology – prospects for disease control: a review. **Avian Pathology**, v.39(5), 309-324, 2010.

KLASING K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, n.8, p.1119-1125, 1998.

KLASING, K.C. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science**, v.48, p. 525-537, 2007.

KOGUT, M. H. e KLASING, K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. **Journal of Applied Poultry Research**, v.18, p.103–110, 2009.

KRAIESKI, A.L.; HAYASHI, R.M.; SANCHES, A.; ALMEIDA, G.C.; SANTIN, E. Effect of aflatoxin experimental ingestion and *Eimeria* vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. **Poultry Science**, DOI: 10.3382/ps/pew397, *in press*, 2016

LAHELLEC, C., e COLIN, P. Relationship between serotypes of *Salmonella* from hatcheries and rearing farms and those from processed poultry carcasses. **Brazilian Poultry Science**, v.26(2), p.79-186, 1985.

LEA, H.; SPRING, P.; TAYLORD-PICKARD, J.; BURTON, E. A natural carbohydrate fraction Actigen® from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: effects on goblet cells, gut morphology and performance of broiler chickens. **Journal Applied of Animal Nutrition**, v.1, p.1-7, 2013.

LEWIS, L.D.; MORRIS JR, M.L.; HAND, M.S. Gastrointestinal, Pancreatic and Hepatic Diseases. In: _____ *Small Animal Clinical Nutrition*. Kansas: Mark Morris Institute. 1994. p.1-40.

LOURENÇO, M.C.; KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; MUNIZ, E.; PICKLER, L.; SANTIN, E. Effects of *Bacillus subtilis* in the dynamics of infiltration of immunological

cells in the intestinal mucosa of chickens challenged with *Salmonella* Minnesota. **International Journal of Poultry Science**, v.11(10), p. 630 – 634, 2012.

LOURENÇO MC, KURITZA LN, HAYASHI RM, MIGLINO LB, DURAU JF, PICKLER L, SANTIN E. Effect of mannanoligosaccharides supplemented diet on intestinal mucosa T lymphocyte populations in chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Applied Poultry Research**, v.24(1), p.15-22, 2015.

LOURENÇO, M.C.; DE SOUZA, A.M.; HAYASHI, R.M.; DA SILVA, A.B.; SANTIN, E. Immune response of broiler chickens supplemented with prebiotic from *Sacharomyces cerevisiae* challenged with *Salmonella* enteritidis or Minnesota. **Journal of Applied Poultry Research**, v.25 (2), p. 165-172, 2016.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H.S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v.45, p. 713–721, 2012.

MARTÍNEZ, B.F.; CONTRERAS, A.A.; GONZALEZ, E.A. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls in diets for two genetic strains of laying hens reared in floor and cages. **International Journal of Poultry Science**, v.9, p.105-108, 2010.

MATHIS, G.F.; LUMPKINS, B.; PIERCE, J.L.; HOOGE, D.M. Effects of dietary antibiotics, Actigen® yeast cell wall derivative, or both on broiler chicken live performance in a fifty-two day pen trial on built-up litter. **Journal of Poultry Science**, v.49, p. 313-318, 2012.

MEDEIROS, M.A.; OLIVEIRA, D.C.; RODRIGUES D.P.; FREITAS, D.R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamena de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011

MERCHANT, L.A.; PACKER, R.A. *Bacteriologia e Virologia Veterinária*. Zaragoza: Acribia, v.3. 1980. p.299-322.

MESA, D., LOURENÇO, M.C.; WESTPHAL, P.; KRAIESKI, A.L.; SANTIN E. Modelo de protocolo experimental para induzir, classificar e avaliar as enterites inespecíficas em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34(10), p.929–936, 2014.

MOORE, V.A. On a pathogenic bacillus of the hog-cholera group associated with a fatal diseases in pigeons. **Dep. Agric. BAI Bull**, v.8, p.71-76, 1895.

MUNIZ, E.C.; PICKLER, L.; LOURENÇO, M.C.; WESTPHAL, P.; KURITZA, L.N.; SANTIN, E. Probióticos na ração para controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, 52-60, 2013.

MUNIZ, E.C.; PICKLER, L.; LOURENÇO, M.C.; KRAIESKI, A.L.; MESA, D.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Avaliação da resposta imunológica intestinal de frangos de corte desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35(3), p.241 – 248, 2015.

MUNYAKA, P. M.; ECHEVERRY, H.; YITBAREK, A.; CAMELO-JAIMES, G.; SHARIF, S.; GUENTER, W.; HOUSE, J.D.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C. Local and systemic innate immunity in broiler chickens supplemented with yeast-derived carbohydrates. **Poultry Science**, v.91, p.2164-2172, 2012.

MURMANN, L.; SANTOS, M.C.D.; LONGARAY, S.M.; BOTH, J.M.C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.529-534, 2008.

NRC. 1994. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

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

OLSEN, S.J., BISHOP, R.; BRENNER, F.W.; ROELS, T.H.; BEAN, N.; TAUXE, V.; SLUTSKER, L. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.753–761, 2001.

Oxoid Limited, Hampshire, UK

PANDINI, J.A.; PINTO, F.G.S.; MULLER, J.M.; WEBER, L.D.; DE MOURA, A.C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-6, 2015.

PARISH, C.R. e O'NEIL, E.R. Dependence of the adaptative immune response on innate immunity: some questions answered but new paradoxes emerge. **Immunology & Cell Biology**, v.75(6), p. 523 – 527, 1997.

PICKLER, L., HAYASHI, R. M. LOURENÇO, M. C. MIGLINO, L. B. LAGO, A. L. BEIRAO, C. B. B. FISHER DA SILVA, A. V. SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.27-36, 2012.

PICKLER, L; MUNIZ, E.C.; KURITZA, L.N.; LOURENÇO, M.C.; SANTIN, E. Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Minnesota. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, p.1203, 2014.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Formules antiigeniques des serovars de Salmonella. Paris: WHO. 1997. P.1-15.

RABSCH, H.B.M.; TSOLIS, R.M.; KINSLEY, R.A.; HINZ, K. Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, p.443-448, 2000.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.1259-1262, 2008.

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

RICHLIK, I; ELSHEIMER-MATULOVA, M.; KYROVA, K. Gene expression. In the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. **Veterinary Research**, v.45, p.119 – 132, 2014.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais** - 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 252p, 2011.

ROSENBERGER, C.M.; POLLARD, A.J.; FINLAY, B.B. Gene array technology to determine host responses to *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.3, p.1353–1360, 2001.

SCHMITTGEN, T.D., e LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, p.1101–1108, 2008.

SETTA, A. M.; BARROW, P.A.; KAISER, P.; JONES, M.A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: Cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.35, p.397-410, 2012.

SHASHIDHARA, R.G.; DEVEGOWDA, G. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. **Poultry Science**, v.82, p.1319-1325, 2003.

SMIRNOV, A.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v.134, p.736-742, 2004.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharide on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, n.2, p.205-211, 2000.

STERZENBACH, T.; CRAWFORD, R.W.; WINTER, S.E.; BAUMLER, A.J. *Salmonella* virulence mechanisms and their genetic basis. In :Barrow, PA, Methner, U. (Eds.), **Salmonella in Domestic Animals**. CABI Publishing, Wallingford, UK, 2013.

SVIHUS, B.; CHOCT, M.; CLASSEN, H.L. Function and nutritional roles of the avian caeca: a review. **World's Poultry Science Journal**, v.19, 2013.

SVIHUS, B. Function of the digestive system. **Journal of Applied Poultry Research**, v.23, p.1 – 9, 2014.

SWAGGERTY, C.L.; KOGUT, M.H.; FERRO, P.J.; ROTHWELL, L.; PEVZNER, I.Y.; KAISER, P. Differential cytokine mRNA expression in heterophils isolated from *Salmonella*-resistant and –susceptible chickens. **Immunology**, v.113, p. 139 – 148, 2004.

TELLEZ, G.; PIXLEY, C.; WOLFENDEN, R.E.; LAYTON, S.L.; HARGIS, B.M. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in Poultry. **Food Research International**, v.45, p.628 – 633, 2012.

THOMAS, W.E.; NILSSON, L.M.; FORERO, M.; SOKURENKO, E.V.; VOGEL, V. Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.53, p.1545-1557, 2004.

THOMPSON, K.L. e APPLGATE, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. **Poultry Science**, v.85(9), p.1535 – 1540, 2006.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and post-hatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v.82, p. 320 – 327, 2003.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; LEORI, G.; BERNARD, S.; CASADESÚS, J.; PLATT, D. J.; OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.125, n.2, p.229-255, 2000.

VAN HEMERT, S.; HOEKMAN, A.J.; SMITS, M.A.; REBEL, J.M.J. Early host gene expression responses to a *Salmonella* infection in the intestine of chickens with different genetic background examined with cDNA and oligonucleotide microarrays. **Comparative Biochemistry and Physiology**, D1, p.292-299, 2006.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the cecal lamina propria of chickens after neonatal infection with *Salmonella* Enteritidis strain. **Developmental and Comparative Immunology**, v.26, p.355-364, 2002.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES, D.P.; BACK A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94(3), p.433-441, 2015.

ANEXO A

© 2016 Poultry Science Association Inc.

Immune response of broiler chickens supplemented with prebiotic from *Sacharomyces cerevisiae* challenged with *Salmonella enteritidis* or Minnesota

M. C. Lourenço, A. M. de Souza, R. M. Hayashi, A. B. da Silva, and E. Santin¹

Laboratory of Microbiology and Avian Pathology, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Parana, Rua dos Funcionários, 1540, CEP 80035-050 Curitiba-PR, Brazil.

Primary Audience: Veterinarians, Nutritionists

SUMMARY

Salmonella enterica has more than 2,500 different serovars that have been described as causes of human infections, and *S. enterica* serovar Enteritidis is the most prevalent of these serovars. In some regions in Brazil, *S. enterica* serovar Minnesota was prevalent in 37.93% of broiler samples. This study evaluated the effect of a prebiotic (PREB) based on mannan oligosaccharide on the immune response of broilers challenged against *Salmonella* Enteritidis (SE) or Minnesota (SM). PREB supplementation increased the weight gain and reduced *Salmonella* recovered and mRNA gene expression of IL12 in livers of SE-challenged broilers, but did not prevent colonization by SM in the liver at 16 h after challenge. At the time of challenge, birds supplemented with PREB had higher lymphocyte scores in the lamina propria, villi edema, and dilation, suggesting an inflammatory reaction when compared to a non-supplemented group. PREB supplementation could prevent SE colonization in the livers of broilers 16 h after challenge; however, it would have no effect on SM challenged birds. The challenge with serovar Enteritidis induces higher IL12 mRNA expression levels than challenge with SM.

Key words: cytokines, IL10, IL12, immunity, intestinal mucosa, MOS

2016 J. Appl. Poultry Res. 25:165–172
<http://dx.doi.org/10.3382/japr.pfv094>

DESCRIPTION OF THE PROBLEM

Salmonella enterica has more than 2,500 different serovars that have been described as causes of human infections [1], and *S. enterica* serovar Enteritidis (SE) is the most prevalent of these serovars [2,3].

Other serovars also have been more prevalent in some regions of the world. A Brazilian study [4] found 20 different *Salmonella* serovars in samples from broilers, and the *S. enterica* serovar

Minnesota (SM) was prevalent in 37.93% of the samples.

Epidemiological studies [5,6] show switches among different serotypes in a population, which indicates that another serovar might occupy the ecological niche of a specific serovar. Therefore, considering the emergence of new serotypes and re-emergence of others [4,7,8] in certain areas, the control of salmonellosis depends on our knowledge of the serovar behavior regarding its prevalence and pathogenicity characteristics.

Biosecurity practices are the most important methods for preventing *Salmonella* infection in commercial flocks. In addition, the use of some

¹Corresponding author: santin@u/pr.br

feed additives, such as prebiotics, may help in this control. The prebiotic (PREB) based on mannan oligosaccharide (MOS), derived from the yeast cell wall, is effective for SE control by acting directly on agglutination of type 1 fimbriae, preventing it from connecting in the GIT cells [9]. However, an in vitro study [10] showed that MOS has little effect on SM agglutination, and no in vivo studies report that MOS has an effect on *Salmonella* Minnesota.

Prebiotic derived from yeast also has been described as an immune response modulator [11] that may have an indirect effect on this microorganism's control. The host defense cells can detect molecules, called pathogen-associated molecular patterns, as components of the yeast cell wall, glucans, and mannans [12]. They can trigger an immune response by increasing or decreasing the expression of some cytokines and chemokines that have important roles and different expression levels in the control of *Salmonella* spp. infections [13–15].

The aim of this study was to evaluate the PREB based on MOS on the immune response, histology of intestinal mucosa, and on the control of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and serovar Minnesota in broiler chickens experimentally challenged against these serovars.

MATERIALS AND METHODS

This experiment was approved by the Institutional Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Federal University of Parana (Protocol 013/2009).

Birds, Experimental Design, Diet, and Housing

A total of 160 one-day-old male Cobb [16] broilers were individually weighed and distributed into 2 different trials. Both trials were distributed in a randomized design with 2 treatments and 4 replicates of 10 birds each. The treatments were: Trial A with 1) SE - birds challenged with *Salmonella* Enteritidis and control diet without PREB and 2) SE + PREB - birds challenged with SE and fed with PREB (400g/t, Actigen, Alltech Inc., Araucária, PR, Brazil); and Trial B with 3) SM - birds challenged with *Salmonella* Minnesota and control diet and 4)

SM + PREB - birds challenged with SM and fed with PREB (400g/t, Actigen, Alltech Inc.).

The PREB (Actigen, Alltech Inc.) used was derived from *Sacharomyces cerevisiae* with at least 400 ppm of MOS as guarantee.

Chicks were housed in isolator rooms, with negative pressure, in litter and under thermal comfort conditions according to animal age. The wood shaving litter used in all treatments was submitted to 121 °C for 15 min to avoid contamination by *Salmonella* or other microorganisms from sources other than those used as challenge.

Diet formulas were corn and soymeal based [17] and contained no antibiotic growth promoters, anticoccidial, or any feed additives other than the object of the study. Chicks were offered feed and water ad libitum and were reared under continuous light.

Weighing and Sampling Collection

Each bird was individually weighed at the beginning of the experiment (d one) and at zero and 16 h after challenge (AC), at the time of necropsy (8 and 9 d for Trial A, and 10 and 11 d for Trial B). At zero and 16 h AC, 8 birds by treatment were euthanized and samples of the liver and cecum were collected aseptically to perform the counting procedure of *Salmonella*. In the same period, samples of the ileum (2 cm below the ileocecal junction) and cecum (final segment of the left cecum) were fixed in 10% buffered formalin for histological analysis. Samples of the liver and ileum were stored in RNAlater [18] for cytokines analysis.

Challenge

SE and SM inoculums were prepared according to modified methodology [19]. Strains of *Salmonella* Enteritidis and Minnesota from commercial broilers were identified and subsequently plated on Brilliant Green Agar [20] for quantification. Birds from Trial A were inoculated with one mL *Salmonella* Enteritidis oral solution containing 12.3×10^6 CFU / mL at 8 d of age, and birds from Trial B were inoculated with one mL oral solution containing *Salmonella* Minnesota 7.5×10^6 CFU / mL at 10 d of age.

Table 1. Cytokine primer sequences.^a

Gene	Primer sequence (5'-3')	Gene Bank Accession N ^o
<i>ch IL-10</i>	F:CGGGAGCTGAGGGTGAA	AJ621614
	R:GTGAAGAAGCGGTGACAGC	
<i>ch IL-12p40</i>	F:AGACTCCAATGGGCAAATGA	NM 213571
	R:CTCTTCGGCAAATGGACAGT	

^aThe listed oligonucleotides were used to analyze intestinal and liver gene expression via quantitative real-time PCR. F = forward; R = reverse.

Microbiology Analysis

Briefly, samples were diluted in 2% peptone water [20] at a ratio of 1:9. A one mL fraction of this solution was added to 9 mL 0.1% peptone water and so on until reaching the 10⁻³ dilution. Thereafter, 100 uL of each dilution was duplicated and plated in Brilliant Green Agar [20]. The plates were incubated at 35 °C for 24 h for subsequent counting of typical colonies. The initial solution of 2% peptone water was incubated at 35 °C for 24 h. From samples that had a null value in the quantitative analysis, 100 uL of this initial solution was added to 10 mL Rappaport-Vassiliadis broth and Tetrathionate [20] and incubated at 42 °C for 24 h to confirm negativity/positivity of *Salmonella*. The colony count results were expressed as the Procedures Colonies Count, according to Normative n°62 published on August 26, 2003 (Brazil - MAPA).

Histological Analysis

Samples were processed according to procedure [21] and analyzed for histological evaluations [22]. Evaluations included villi and vessels dilatation, villi fusion, lymphocytes infiltration and edema at the lamina propria, goblet cell hyperplasia and plasma cells at the epithelium, and apical necrosis.

RNA Isolation and RT-PCR

The total RNA extraction was performed using Trizol reagent [23] and quantified by spectrophotometry at 260 nm using the NanoDrop 2000 spectrophotometer. After verifying the RNA integrity in agarose gel, this material was submitted to treatment with DNase I [23]. The cDNA synthesis was accomplished using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit [23]. The quantification of the expres-

sion abundance of mRNA for cytokine genes using RT-PCR was performed according to published protocol [24] using the genes described in Table 1. The SYBR Green PCR Master Mix [25] kit was used, and the gene expression levels were analyzed in a thermocycler StepOnePlus [25] with a protocol of 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 58 °C, and 30 s at 72 °C. The results of real-time PCR were analyzed using the comparative 2- $\Delta\Delta$ CT method [26]. This method is based on reducing the values of Ct (threshold cycle or cycle threshold) in the control group compared to the group of interest. Each sample was analyzed in triplicate; the Ct value from each triplicate for the target gene was subtracted from the Ct value average of triplicates for constitutive genes before use in the statistical analysis.

Statistical Analysis

Data were evaluated using the statistical software Statistix 9 and analyzed by the Shapiro-Wilk normality test. Parametric data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for the means with a significant difference. Nonparametric data were submitted to the Kruskal-Wallis test at 5% probability. Because there is no quantitative data for *Salmonella*, the chi-square test was used for the presence/absence of *Salmonella*.

RESULTS AND DISCUSSION

While several studies [27–30] have reported that prebiotics based on MOS in broilers diets could lead to an increased performance, there are many studies reporting that MOS does not influence the broiler performance parameters [11, 31–33].

Table 2. Mean and standard error of body weight gain (BWG) of broilers challenged at 8 d with *Salmonella* Enteritidis and broilers challenged at 10 d with *Salmonella* Minnesota, at zero to 16 h after challenge (AC) in different treatments.

Treatments	BWG (g)
	0 to 16 h AC
SE ¹	17.62 ± 8.63 ^b
SE+PREB ²	37.00 ± 6.18 ^a
<i>P</i> -value	0.001
SM ³	16.62 ± 5.40
SM+PREB ⁴	18.00 ± 5.42
<i>P</i> -value	0.619

^{a,b}Different letters in the same column indicate a significant difference ($P < 0.05$) for the Tukey test.

¹Birds challenged with *Salmonella* Enteritidis and control diet without Prebiotic.

²Birds challenged with *Salmonella* Enteritidis and fed with PREB (400g/t, Actigen, Alltech Inc.).

³Birds challenged with *Salmonella* Minnesota and control diet.

⁴Birds challenged with *Salmonella* Minnesota and fed with PREB (400g/t, Actigen, Alltech Inc.).

These controversial results can be attributed to the different dosages, forms, and content of mannose, environmental conditions, exposure time, challenges, and age of the birds. In this present study, birds supplemented with the prebiotic based on MOS and challenged with serovar Enteritidis showed higher body weight gain in the inoculation period, between zero and 16 h AC, than challenge birds (Table 2), but this was not observed in the group challenged with SM. This suggested that the improvement in weight gain is related to the higher percentage of SE isolation, highest score for lymphocyte infiltration on intestinal mucosa, and significant increase in IL 12 expression on the livers of non-supplemented birds challenged with SE, which was not observed in birds supplemented with SM. In the trial with SM, no significant differences were observed in the body weight gain for different treatments at zero and 16 h AC (Table 2).

The microbiological results of *Salmonella* Enteritidis showed that PREB supplementation delayed microbial colonization in the liver, where its presence was not observed at 16 h AC in this organ, and very little *Salmonella* was isolated in the cecum (Tables 3 and 4). These re-

Table 3. Percentage (%) of *Salmonella* spp. in liver and cecum of broilers challenged at 8 d with *Salmonella* Enteritidis and broilers challenged at 10 d with *Salmonella* Minnesota, 16 h after challenge (AC) in the different treatments.

Treatments	16h AC	
	Liver % (+/total)	Cecum % (+/total)
SE ¹	12.5% (1/8) ^a	100% (8/8) ^a
SE+PREB ²	0% (0/8) ^b	87.5% (7/8) ^b
<i>P</i> -value	0.001	0.001
SM ³	0% (0/8) ^b	100% (8/8) ^a
SM+PREB ⁴	12.5% (1/8) ^a	87.5% (7/8) ^b
<i>P</i> -value	0.001	0.001

^{a,b}Different letters in the same column indicate a significant difference ($P < 0.05$) for the Chi-square.

¹Birds challenged with *Salmonella* Enteritidis and control diet without PREB.

²Birds challenged with *Salmonella* Enteritidis and fed with PREB (400g/t, Actigen, Alltech Inc.).

³Birds challenged with *Salmonella* Minnesota and control diet without PREB.

⁴Birds challenged with *Salmonella* Minnesota and fed with PREB (400g/t, Actigen, Alltech Inc.).

sults are in agreement with previous studies that demonstrate *Salmonella* reduction in broilers supplemented with MOS [9,34]. MOS derived from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* yeast can behave as a competitive binding site for Gram-negative bacteria mannose-specific type 1 fimbriae, stimulating the growth and/or activity of beneficial bacteria and hindering the intestinal colonization by pathogenic microorganisms [9,34–37].

In the SM trial, PREB supplementation was able to reduce *Salmonella* in the cecum of the birds at 16 h AC, which was not true for the liver, in which the supplemented group presented with 12.5% positivity versus 0% in the SM group. A study [10] showed that in vitro the SM-MOS agglutination is very weak compared to SE-MOS, suggesting that reduction on SM isolation on the cecum could not be explained by the same mechanism of agglutination presented for SE.

In addition, a recent study [38] showed that only low levels (20%) of the bacteria in SM challenged birds spread to the liver, at 48 h AC. According to these authors, the SM can adapt well to the gut host, causing a light induction of an immune response, and can provide temporary passage through the liver. In the present

Table 4. Score of microscopic alteration observed in the intestinal mucosa of ileum and cecum of broilers challenged at 8 d with *Salmonella* Enteritidis and broilers challenged at 10 d with *Salmonella* Minnesota, at zero and 16 h after challenge (AC) in the different treatments.

Treatments	Ileum		Cecum	
	0 h AC	16 h AC	0 h AC	16 h AC
SE ¹	8.26 ± 4.46 ^b	16.33 ± 5.06	4.13 ± 2.66	10.13 ± 1.76 ^a
SE+PREB ²	13.47 ± 5.87 ^a	17.40 ± 5.79	5.67 ± 3.15	6.27 ± 2.37 ^b
<i>P</i> -value	0.036	0.595	0.161	0.001
SM ³	7.80 ± 3.98 ^b	14.80 ± 8.52	3.13 ± 1.72	5.53 ± 3.20
SM+PREB ⁴	10.47 ± 6.11 ^a	11.26 ± 6.02	2.00 ± 1.02	7.40 ± 4.14
<i>P</i> -value	0.020	0.108	0.200	0.178

^{a,b}Different letters in the same column indicate a significant difference ($P < 0.05$) for the Tukey test.

¹Birds challenged with *Salmonella* Enteritidis and control diet without PREB.

²Birds challenged with *Salmonella* Enteritidis and fed with PREB (400g/t, Actigen, Alltech Inc.).

³Birds challenged with *Salmonella* Minnesota and control diet.

⁴Birds challenged with *Salmonella* Minnesota and fed with MOS (400g/t, Actigen, Alltech Inc.).

study, the expression of mRNA for IL10 and IL12 in the liver was not significantly different between treatments in the birds challenged with SM. However, in the SE trial, there was greater expression of mRNA IL12 in the liver of SE birds compared to the SE+PREB group at 16 h AC (Figure 1).

Birds challenged with serovar Minnesota had gene expression levels of mRNA for IL10 and IL12 in the liver and ileum that were lower than birds challenged with serovar Enteritidis (ranging from one to 5 expression times to 5 to 40 times more expression, respectively). The group challenged with SE also presented higher rates of SE in the liver compared to SM. Previous studies have reported a high penetration power of serovar Enteritidis with a consequent increased expression of IL12 in the SE challenged birds compared to Heidelberg, Typhimurium, and Infantis [14].

These changes in the cytokine expression can be directly related to the histological changes observed in the intestinal mucosa of the cecum. After oral challenge with SE or SM, there is an increase in the mucosal immune response, which is represented by higher lymphocyte infiltration in the lamina propria and goblet cell hyperplasia, which also contributes to the increase in potential changes related to the structure and height of the intestinal villi [39,40]. Nevertheless, in SM, these alterations are not significantly different between the treatments after challenge.

These results may be related to the presence of this organism in the gut, as also was observed in a comparative study of different serotypes [15]. There are immune reactions after infection in an attempt to eliminate the pathogen causing the infection by elevating pro-inflammatory cytokines, such as IL12. However, it is also necessary to increase IL10 to modulate the inflammation and develop immune tolerance. Several studies have been conducted to evaluate the responses of cytokines gene expression against *Salmonella* [40–42]. As in other organisms, this pathogen is capable of altering the gene expression levels of cytokines in chickens. In the SM liver and ileum SE ileum, no statistically significant differences were observed, which is possibly due to the low change in the cytokine's expression and high standard deviation observed among the analyzed samples. More samples are probably needed to better understand the behavior of these cytokines in birds challenged with SM.

The cost of the immune response of challenged birds with very immunogenic *Salmonella* serovars, such as Enteritidis, could lead to an increase in animal metabolism with a consequent increase in cell and protein production for acute phase proteins [43] and a subsequent decrease in animal performance.

In histological analyses of the ileum and cecum (Table 4), at the time of challenge (zero h AC), birds supplemented with PREB, in both trials, had higher lymphocyte scores in the

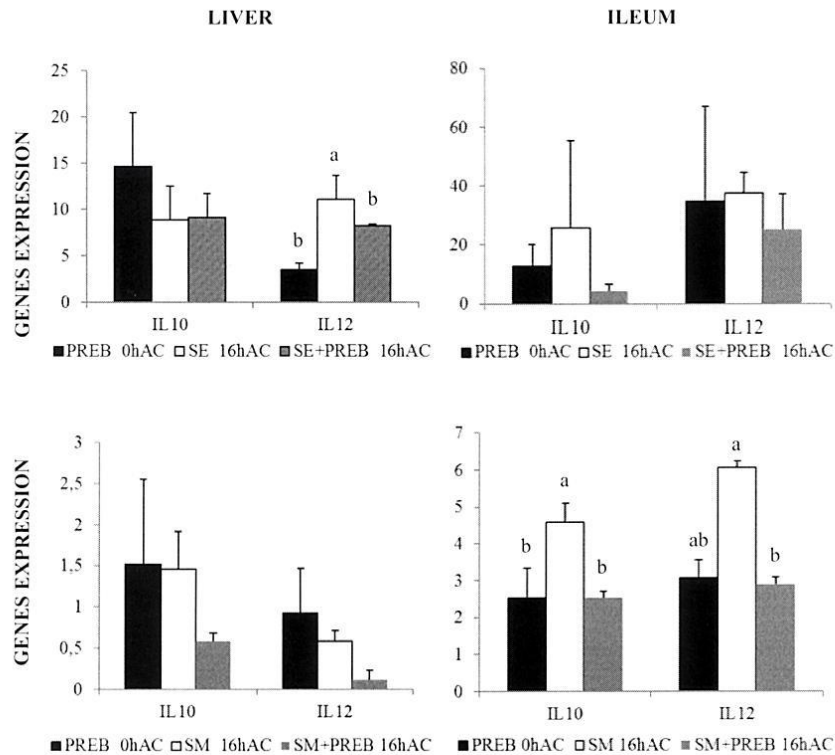


Figure 1. Relative IL10 and IL12 expression levels in the liver and ileum of broilers fed a diet supplemented with mannan oligosaccharides. PREB: birds supplemented with PREB (Actigen - 400g/t Alltech Inc.) at zero h after challenge (AC); SE: birds challenged with *Salmonella* Enteritidis at 8 d and control diet without PREB at 16 h AC; SE+PREB: SE plus 400g/t of PREB (Actigen - 400g/t Alltech Inc.), SM: challenged with *Salmonella* Minnesota at 10 d and control diet without PREB at 16 h AC; SM+PREB: SM plus 400g/t of PREB (Actigen - 400g/t Alltech Inc.). Bars with different letters differ significantly for the Tukey test ($P < 0.05$).

lamina propria and villi dilation, suggesting an inflammatory reaction compared to a non-supplemented group. There was an immune response related to the presence of PREB in the intestinal lumen, but it was not observed in the cecum. The yeast cell wall structure MOS is recognized by immune cells as a pathogen-associated molecular pattern, acting as a non-specific antigen that is capable of triggering an immune response [12]. This was according to other research [30,33,35] that also showed early infiltration of immune cells in the mucosa of birds fed with prebiotics based on MOS.

CONCLUSIONS AND APPLICATION

1. In birds challenged with SE, PREB based on MOS supplementation improves weight gain at 16 h AC compared to the group challenged with SE without PREB supplementation, probably because it reduced SE colonization and liver IL12 mRNA expression.
2. PREB based on MOS does not prevent colonization by SM in the liver at 16 h AC contrary to that observed for SE challenge and did not affect the weight gain of birds.

3. The serovar Enteritidis induces higher IL12 mRNA gene expression levels than SM challenged birds.

REFERENCES AND NOTES

- Murmann, L., M. C. D. Santos, S. M. Longaray, J. M. C. Both, and M. Cardoso. 2008. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 39:529–534.
- Olsen, S. J., R. Bishop, F. W. Brenner, T. H. Roels, N. Bean, R. V. Tauxe, and L. Slutsker. 2001. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987–1997. *J. Infect. Dis.* 183:753–761.
- ANVISA. 2007. Relatório anual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.
- Voss-Rech, D., C. S. L. Vaz, L. Alves, A. Coldebella, J. A. Leão, D. P. Rodrigues, and A. Back. 2015. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poult. Sci.* 94:433–441.
- Rabsch, H. B. M., R. M. Tsolis, R. A. Kinsley, and K. Hinz. 2000. Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. *Emer. Inf. Dis.* 6:443–448.
- Callaway, T. R., T. S. Edrington, R. C. Anderson, J. A. Byrd, and D. J. Nisbet. 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *J. Anim. Sci.* 86:E163–E172.
- Lahellec, C., and P. Colin. 1985. Relationship between serotypes of *Salmonella* from hatcheries and rearing farms and those from processed poultry carcasses. *Br. Poult. Sci.* 26:179–186.
- Foley, S. L., R. Nayak, I. B. Hanning, T. J. Johnson, J. Han, and S. C. Rieke. 2011. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:4273–4279.
- Spring, P., C. Wenk, K. Dawson, and K. Newman. 2000. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. *Poult. Sci.* 79:205–211.
- Borowsky, L., G. Corção, and M. Cardoso. 2009. Mannaoligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. *Braz. J. Microbiol.* 40:458–464.
- Shashidhara, R. G., and G. Devegowda. 2003. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. *Poult. Sci.* 82:1319–1325.
- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and J. S. Pober. 2000. Innate Immunity. Pages 270–290 in *Cellular and Molecular Immunology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 553p.
- Van Hemert, S., A. J. Hoekman, M. A. Smits, and J. M. J. Rebel. 2006. Early host gene expression responses to a *Salmonella* infection in the intestine of chickens with different genetic background examined with cDNA and oligonucleotide microarrays. *Comp. Biochem. Physiol. D1*:292–299.
- Berndt, A., A. Wilhelm, C. Jugert, J. Pieper, K. Sachse, and U. Methner. 2007. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. *Infect. Immun.* 75:5993–6007.
- Setta, A. M., P. A. Barrow, P. Kaiser, and M. A. Jones. 2012. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: Cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35:397–410.
- Cobb-Vantress Brasil Ltda., Guapiaçu, São Paulo, Brazil.
- NRC. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA.
- Pickler, L., R. M. Hayashi, M. C. Lourenço, L. B. Miglino, A. L. Lago, C. B. B. Beirão, A. V. Fisher da Silva, and E. Santin. 2012. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. *Pesq. Vet. Bras.* 32:27–36.
- Oxoid Limited, Hampshire, UK
- Smirnov, A., D. Sklan, and Z. Uni. 2004. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. *J. Nutr.* 134:736–742.
- Mesa, D., M. C. Lourenço, P. Westphal, A. Kraieski, and E. Santin. 2014. Modelo de protocolo experimental para induzir, classificar e avaliar as enterites inespecíficas em frangos de corte. *Pesq. Vet. Bras.* 34:929–936.
- Invitrogen, Carlsbad, CA.
- Humprey, B. D., and K. C. Klasing. 2005. The acute phase response alters cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comp. Bio. Physiol. - Part A.* 142:485–494.
- Applied Biosystems, Foster City, CA.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3:1101–1108.
- Hooge, D. M. 2004. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide 1993–2003. *Int. J. Poultry Sci.* 3:163–174.
- Hooge, D. M., and A. Connolly. 2011. Meta-analysis summary of broiler chicken trials with dietary Actigen® (2009–2001). *Int. J. Poultry Sci.* 10:819–824.
- Borzuk, M., K. Kuecukylmaz, A. U. Çatli, M. Cinar, E. Bintas, and F. Coven. 2012. Performance, egg quality, and immune response of laying hens fed diets supplemented with mannan-oligosaccharide or an essential oil mixture under moderate and hot environmental conditions. *Poult. Sci.* 91:1379–1386.
- Lea, H., P. Spring, J. Taylord-Pickard, and E. Burton. 2013. A natural carbohydrate fraction Actigen® from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: effects on goblet cells, gut morphology and performance of broiler chickens. *J. Appl. Anim. Nutr.* 1:1–7.
- Martínez, B. F., A. A. Contreras, and E. A. Gonzalez. 2010. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls in diets for two genetic strains of laying hens reared in floor and cages. *Int. J. Poultry Sci.* 9:105–108.
- Mathis, G. F., B. Lumpkins, J. L. Pierce, and D. M. Hooge. 2012. Effects of dietary antibiotics, Actigen® yeast cell wall derivative, or both on broiler chicken live performance in a fifty-two day pen trial on built-up litter. *J. Poultry Sci.* 49:313–318.

33. Munyaka, P. M., H. Echeverry, A. Yitbarek, G. Camelo-Jaimes, S. Sharif, W. Guenter, J. D. House, and J. C. Rodriguez-Lecompte. 2012. Local and systemic innate immunity in broiler chickens supplemented with yeast-derived carbohydrates. *Poult. Sci.* 91: 2164–2172.
34. Fernandez, F., M. Hinton, and B. V. Gils. 2002. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. *Avian Pathol.* 31:49–58.
35. Gibson, G. R., and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401–1012.
36. Thomas, W. E., L. M. Nilsson, M. Forero, E. V. Sokurenko, and V. Vogel. 2004. Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type I fimbriated *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 53:1545–1557.
37. Baurhoo, B., F. Goldflus, and X. Zhao. 2009. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. *Int. J. Poultry Sci.* 8:133–139.
38. Pickler, L., E. C. Muniz, L. N. Kuritza, M. C. Lourenço, and E. Santin. 2014. Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Minnesota. *Acta Sci. Vet.* 42: 1203.
39. Borsoi, A., E. Santin, L. R. Santos, C. T. P. Salle, H. L. S. Moraes, and V. P. Nascimento. 2009. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poult. Sci.* 88:750–758.
40. Van Immerseel, F., J. De Buck, I. De Smet, J. Mast, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2002. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. *Dev. Comp. Immunol.* 26:355–364.
41. Eckmann, L., and M. F. Kagnoff. 2001. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microbes Infect.* 3:1191–1200.
42. Rosenberger, C. M., A. J. Pollard, and B. B. Finlay. 2001. Gene array technology to determine host responses to *Salmonella*. *Microbes Infect.* 3:1353–1360.
43. Klasing, K. C. 2007. Nutrition and the immune system. *Br. Poultry Sci.* 48:525–537.

Acknowledgments

This research was supported in part by Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda., Araucária, PR, BR.

