

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Inoculação *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Enteritidis em pintos de corte para a avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de *Salmonella* Enteritidis.

Autora: Anderlise Borsoi

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

PORTO ALEGRE

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Inoculação *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Enteritidis em pintos de corte para a avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de *Salmonella* Enteritidis.

Autora: Anderlise Borsoi

**Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias
na área de Medicina Veterinária
Preventiva.**

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

PORTO ALEGRE

2009

B738i Borsoi, Anderlise

Inoculação *Salmonella heidelberg* e *Salmonella enteritidis* em pintos de corte para avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácidos e óleos essenciais no controle de *Salmonella enteritidis*./ Anderlise Borsoi. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

102 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. Vladimir Pinheiro do Nascimento, Orient.

1. Sanidade avícola 2. *Salmonella*: frangos de corte 3. *Salmonella enteritidis*: aves I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, Orient.
II. Título

CDD 619.4

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos às pessoas que colaboraram para que os trabalhos propostos para esta Tese fossem realizados. Agradeço a vocês,

Professores Doutores Tadeu e Hamilton pelo ensino e apoio, bolsistas Carol, Daniela, João e Fabrício pela colaboração e ao Mestre Sílvio, por ensinar-me a trabalhar com reação da polimerase em cadeia e pela amizade (Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, UFRGS);

Professora Dra. Elizabeth Santin, Maristela, Joelma e estagiários do Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia, UFPR, pela oportunidade, fundamental apoio e ensinamentos;

Professoras Doutoradas Luciana Ruschel, UPF e Maristela Flores, UFSM, pelas considerações na qualificação para o Doutorado;

Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues e Mestre Érica, Laboratório de Enterobactérias, FIOCRUZ, pelo apoio e oportunidade de aprendizado;

Dra. Nair K. Ito, laboratório SPAVE, pela interpretação das microscopias eletrônicas; Méd. Veterinário Anselmo Micheletti, Da Granja, Paraná, pelos pintinhos fornecidos; Mestre André Palmeira, pela amizade e apoio.

Em especial,

Professor Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento, meu orientador e amigo;
ao Mestre Giankleber Strumiello Diniz, quem contribui para minha formação profissional e para minha felicidade como pessoa;
minha família, meu pai Thiago, mãe Ana, irmãos Maiquel e Erivel, pelo amor;
Deus, pela saúde e proteção.

Muito Obrigada!

Inoculação *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Enteritidis em pintos de corte para a avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de *Salmonella* Enteritidis.

Anderlise Borsoi

Aprovada em 27 de janeiro de 2009.

APROVADO POR:

Professor Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Professor Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho
Membro da Comissão

Professora Dra. Maristela Lovato Flores
Membro da Comissão

Professor Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Membro da Comissão

Resumo

Destaca-se a *Salmonella* como um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos, devido ao fato de estar amplamente distribuído na natureza, possuir um grande número de reservatórios, apresentar sorotipos inespecíficos quanto aos hospedeiros e apresentar cepas multiresistentes aos antimicrobianos. *Salmonella* Enteritidis tornou-se um grande problema de saúde pública no Brasil, a partir da década de 80, quando foi associada a produtos avícolas. Desde 1962, a *Salmonella* Heidelberg tem sido isolada de aves e produtos derivados e aves no Brasil e tem reconhecida importância para saúde humana e em poedeiras comerciais na América do Norte. O presente trabalho teve por objetivo o estudo de diferentes cepas de *Salmonella* Heidelberg (SH) em comparação com *Salmonella* Enteritidis (SE) em pintinhos e frangos de corte no que diz respeito à capacidade de invasibilidade de órgãos, persistência de excreção fecal e alterações na morfometria intestinal. Para o estudo *in vivo*, 65 isolados de SH foram avaliados quanto à presença dos genes de virulência *invA*, *lpfA* e *agfA* e diferenciados por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Outro objetivo foi testar uma mistura de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de excreção fecal de SE. Duas amostras de SH não relacionadas pelo método de PFGE (SH23 e SH35) e uma cepa de SE padrão foram selecionadas para a inoculação das aves. As três cepas promoveram alteração na medida de vilosidades e criptas dos pintinhos, frente a grupo controle. A cepa SH35 promoveu maior reação inflamatória nos cecos. Ambas as cepas testadas foram capazes de atingir o fígado de pintinhos às 6 horas pós-inoculação. Tanto a SE como a SH demonstram persistência e intermitência de excreção fecal em frangos de corte até os 21 dias pós-inoculação. A mistura de ácidos e óleos essenciais foi eficaz na redução da excreção fecal de SE, porém somente com o uso contínuo da mistura na ração. As cepas apresentaram comportamentos diferentes quando inoculadas em frangos de corte e devido à persistência destas nos intestinos dos frangos, prejuízo para as aves podem ocorrer, enquanto a subsequente contaminação de carcaças, representa risco para a saúde humana.

Palavras-chave: *Salmonella* Heidelberg, vilos, criptas, pintos de corte, ácidos orgânicos.

ABSTRACT

Salmonella, one of the most important food borne pathogen due to the widely distribution in nature, large number of reservoirs, to show unspecific host serotypes and provide multiresistant strains to antibiotics. *Salmonella Enteritidis* became a big public health problem in Brasil, since 80's, when it was correlated with poultry products. Since 1962, *Salmonella Heidelberg* has been isolated from birds and poultry products in Brazil, with importance in human health and layers in North America. The present work aimed to the study of different strains of *Salmonella Heidelberg* (SH) and compared with *Salmonella Enteritidis* (SE) in chicks and broiler chickens with regard to the ability of invasibilidade of organs, persistence of fecal excretion and changes in intestinal morphometry. For the *in vivo* study, 65 isolates of SH were evaluated for the presence of virulence genes *invA*, *lpfA* and *agfA* and differentiated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Another objective was to test a organic acids and essential oils mixture for controlling SE fecal excretion. Two not related SH samples by the method of PFGE (SH23 and SH35) and a standard strain of SE were selected to the poultry inoculation. The three strains promoted changes in the measures of villi and crypts of the chicks intestine, when compared to the control group. The SH35 strain promoted greater inflammatory reaction in the caeca. Both strains tested were able to achieve the chicks liver at 6 hours post inoculation. Both strains, SE and SH, showed persistence and intermittence of fecal excretion in broiler chickens until the 21 days post-infection. The organic acids and essential oils mix was effective in reducing the SE fecal excretion, but only with the continuous use of the mix added to the feed. The strains showed different behavior when inoculated in broiler chickens, and because of the persistence of these strains in the chickens intestines, injury to birds may occur, while the subsequent carcasses contamination represents risk to human health.

Key words: Salmonella Heidelberg, villus, crypt, broiler chicks, organic acids.

SUMÁRIO

RESUMO _____	5
ABSTRACT _____	6
1 INTRODUÇÃO _____	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	11
2.1 <i>Salmonella</i> sp _____	11
2.2 <i>Salmonella</i> Heidelberg _____	12
2.3 Fatores de Virulência em <i>Salmonella</i> sp _____	14
2.3.1 Lipopolissacarídeo (LPS) _____	14
2.3.2 Plasmídeos _____	15
2.3.3 Flagelos _____	16
2.3.4 Fímbrias _____	16
2.3.5 Ilhas de Patogenicidade (IP) _____	17
2.4 Interação <i>Salmonella</i> Hospedeiro _____	19
2.4.1 Adesão e Infecção _____	19
2.4.2 Diarréia _____	20
2.4.3 Resposta Imunológica e Aves Carreadoras de <i>Salmonella</i> sp _____	20
2.5 <i>Salmonella</i> e Integridade Intestinal em Frangos de Corte _____	22
2.6 Controle de <i>Salmonella</i> em Frangos de Corte _____	24
3 RESUMOS E ARTIGOS _____	30
3.1 Resumo 1 - Protocolo para a contagem de <i>Salmonella</i> sp a partir de suabes de cloaca _____	30
3.2 Resumo 2 - Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of <i>Salmonella</i> Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electro- phoresis pattern to intestinal changes evaluation _____	32
3.3 Artigo 1 - Mixture of organic acids and essential oils as an alternative for controlling the fecal excretion of <i>Salmonella</i> in broiler chickens _____	34
3.4 Artigo 2 - Fecal excretion from broilers and morphometric analyses chicks caeca after experimental Infection of <i>Salmonella</i> Heidelberg and <i>Salmonella</i> Enteritidis _____	57

3.5 Artigo 3- Behavior of <i>Salmonella</i> Heidelberg and <i>Salmonella</i> Enteritidis strains inoculated in broiler chicks with the evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counting and fecal excretion parameters.	70
4 DISCUSSÃO	85
5 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXO A - Comprovante de aceite do Artigo 1 na Revista Poultry Science	100
ANEXO B - Comprovante de status de revisão do Artigo 2 submetido à Revista Poultry Science	104

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* destaca-se como um dos mais importantes patógeno veiculado por alimentos, devido ao fato de estar amplamente distribuído na natureza, possuir um grande número de reservatórios, apresentar sorotipos inespecíficos quanto aos hospedeiros e apresentar cepas multiresistentes aos antimicrobianos (BERSOT, 2006). Na avicultura, mesmo nas granjas mais tecnificadas, um dos problemas sanitários mais temidos é sem dúvida, o surgimento de uma salmonelose no plantel, seja pela infecção via *Salmonella* (*S.*) Gallinarum, *S.* Pullorum, *S.* Typhimurium ou *S.* Enteritidis, devido aos enormes riscos de sua transmissão por carne e ovos aos seres humanos (BERCHIERI, 2000). A proteção contra a entrada de novos sorotipos na pirâmide de produção deve ser a maior possível e na prática, se reconhece que o grau de proteção é melhor nas camadas superiores da pirâmide de produção das aves (NETO et al., 2005).

A *Salmonella* é um bacilo Gram negativo que se comporta como patógeno intracelular facultativo. Seu habitat é o trato gastrointestinal de animais e homens, não sendo apontada como microbiota normal. Nas diferentes espécies animais as *Salmonella* se encontram associadas a problemas entéricos, septicêmicos e aborto devido sua capacidade de invasão celular e sobrevivência dentro dos fagócitos (RODRIGUEZ; OCHOA, 2005).

Mais de 2500 sorovares de *Salmonella* foram identificados, mas somente cerca de 10% dos sorovares já foram isolados de aves e apenas uma pequena parcela destes, são comuns em lotes de aves. A distribuição dos sorovares de *Salmonella* de fontes avícolas é geograficamente variável e alterna com o passar dos anos, apesar de que alguns sorovares sejam detectados com alta incidência mundial. Sorovares prevalentes em humanos, como Enteritidis e Typhimurium, dentre outros, também são comuns na produção avícola (GAST, 2007).

Dentre os sorovares comumente encontrados na avicultura, o sorovar Heidelberg tem aparecido como o terceiro isolado mais freqüentemente no Canadá e o quarto nos Estados Unidos, em doenças transmitidas por alimentos (CHITTICK et al., 2006). No Brasil desde 1962, a *Salmonella* Heidelberg tem sido isolada de aves e produtos derivados (HOFER et al., 1997). A presença deste sorovar em carcaças e partes de frangos na região

Sul do Brasil foi reportada por Nascimento et al. (1996), Dickel (2004) e Borsoi et al. (2006).

Entre as *Salmonellas* que causam infecções em humanos, a *Salmonella* Heidelberg parece ser mais invasiva (causando doença mais severa) que os outros sorovares paratíficos. Estudos de resistência vêm sendo realizados devido à freqüente resistência a droga ceftiofur e redução da suscetibilidade aos antimicrobianos relacionados à ceftriaxona (cefalosporina de terceira geração), tais fatos podem limitar as opções de tratamento de gestantes e crianças que desenvolvem salmonelose extra-intestinal por *Salmonella* Heidelberg (PHAC, 2006).

A presença de *Salmonella* paratíficas em frangos de corte não deve ser reconhecida somente como barreira à exportação, por seu poder de provocar danos à saúde humana, mas também deve ser considerada por sua patogenicidade à saúde animal, principalmente ao se tratar de aves no início do ciclo de produção. Até os 21 dias de idade, o sistema imune do intestino das aves está imaturo e por esta razão agentes patogênicos como *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. e *E. coli* podem persistir no lúmen intestinal por longos períodos. Enteropatias pré e neonatais podem causar prejuízos ao sistema imune, danos à mucosa intestinal e baixos parâmetros zootécnicos nas aves adultas (ITO et al., 2007).

O presente trabalho teve por objetivo o estudo de diferentes cepas de *Salmonella* Heidelberg comparada a uma cepa de *Salmonella* Enteritidis em pintos e frangos de corte no que diz respeito à capacidade de invasibilidade de órgãos, persistência de excreção fecal e alterações na morfometria intestinal. Para o estudo *in vivo*, 65 isolados de *Salmonella* Heidelberg foram avaliados quanto à presença dos genes de virulência *invA*, *lpfA* e *agfA* e diferenciados por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Outro objetivo foi testar uma mistura de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de excreção fecal de *Salmonella* Enteritidis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella* sp.

Salmonella é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo e não formador de esporos, que se comporta como patógeno intracelular facultativo. Divide-se em duas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, devido suas características bioquímicas gerais. A espécie *enterica* divide-se em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* e *houtenae* (McCLELLAND et al., 2004). Aproximadamente 60% dos sorovares de *Salmonella* pertencem à subespécie *enterica* e têm como hospedeiros mamíferos e aves (LIBBY et al., 2004).

Segundo o esquema clássico de Kauffman-White, mais de 2500 sorovares de *Salmonella* estão classificados tendo por base seus antígenos H (flagelares), O (somático) e ocasionalmente, Vi (capsular), presente em alguns sorovares como Typhi e Dublin (HIRSH, 2003).

O isolamento de *Salmonella* a partir de várias fontes é requerido para o diagnóstico de doenças ou fontes de contaminação dos animais. Na maioria dos casos as amostras contêm um grande número de outras bactérias, o que torna difícil isolar colônias de *Salmonella* através do plaqueamento direto em ágar. Assim é comum o uso de caldos de pré-enriquecimento, caldos de enriquecimento seletivo e ágar seletivos para diferenciação das bactérias. Uma vez isolada colônia morfológicamente compatível, uma bateria de testes bioquímicos é usado para a confirmação de *Salmonella*. Os testes bioquímicos para *Salmonella* respondem com reação de indol negativo, Voges-Proskauer negativo, produção de urease negativa, produção de gás sulfídrico positivo e descarboxilação de lisina, dentre outros. A metodologia da reação da polimerase em cadeia (PCR), identificando genes específicos de *Salmonella*, também é utilizada para a identificação dos gêneros ou mesmo detecção do patógeno (LIBBY et al., 2004).

Isolados de *Salmonella* podem ser identificados ao nível de subrotipo através das técnicas de fagotipagem (uso de vírus ou “fagos”), eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), biotipagem (testes bioquímicos), resistência antimicrobiana e análise de perfil plasmidial. A técnica de fagotipagem tem alto valor na caracterização de cepas, porém está limitada a poucos sorovares para os quais o esquema de tipificação foi desenvolvido até o momento,

incluindo os sorovares Typhi, Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Schottmuelleri (LIBBY et al., 2004).

A doença causada por *Salmonella* é genericamente chamada de salmonelose (DOYLE, 1990). Alguns sorotipos estão associados com maior frequência ou mais adaptados a determinados hospedeiros. *Salmonella* Cholerasuis causa septicemia, pneumonia, e enterocolite em suínos; *Salmonella* Dublin causa enterite mucohemorrágica, septicemia, pneumonia e mortalidade em bezerros; *Salmonella* Abortusequi causa aborto em eqüinos; *Salmonella* Abortusovis causa aborto em ovinos; *Salmonella* Gallinarum causa tifo em galinhas, *Salmonella* Pullorum pulorose em galinhas e perus e *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium causam o paratifo. Sorotipos adaptados ao homem incluem Typhi causando febre tifóide e Paratyphi causando febre paratifóide. *Salmonella* paratíficas, como Enteritidis, Typhimurium, Hadar e Heidelberg, dentre outras, não são adaptadas a hospedeiros específicos, porém podem causar salmonelose em uma ampla variedade de animais e no homem (POPPE, 1999).

2.2 *Salmonella* Heidelberg

No Brasil desde 1962, a *Salmonella* Heidelberg tem sido isolada de aves e produtos derivados. Amostras de *Salmonella* isoladas de aves (portadoras e doentes) provenientes de diversas regiões do país, durante o período de 1962 a 1991, foram caracterizadas antigenicamente. Nas 2123 culturas analisadas foram reconhecidos 90 sorovares, distribuídos em 14 sorogrupos com predominância dos grupos O:9 (40,0%), O:4 (33,3%), O:7 (10,6%) e O: 3,10 (6,7%). A maior diversidade de sorovares foi reconhecida no sorogrupo O:7 com 22 tipos distintos, secundado por O:4, O:3,10 e O:9, constituídos de 19, 15 e 10 sorotipos, respectivamente. No computo geral, foi determinada a média de 10,8 sorovares isolados por ano. Os sorovares classificados como muito frequentes nos três decênios, representando 65 a 67%, dos isolamentos, foram *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Infantis* (HOFER et al., 1997).

A presença de *Salmonella* Heidelberg foi descrita por Nascimento et al. (1996) que citam a prevalência de *Salmonella* em carcaças e partes de frango em 15,1% de positividade em carcaças e 26,1% de positividade total nas amostras de partes (coxinha da asa 25,6%, peito sem ossos 25,6%, coxa com sobrecoxa 30,3% e dorso, 31,0%). Os

principais sorovares identificados foram *S. Enteritidis* (51%), *S. Hadar* (26%) e *S. Heidelberg* (11%).

Dickel (2004) avaliou o processo higiênico-sanitário de abate de frangos em três diferentes matadouros no Sul do Brasil. Dos lotes que chegaram ao abate 26,7% foram detectados positivos para *Salmonella* e as carcaças analisadas antes e depois do *chiller* apresentaram respectivamente 31,7% e 20% de positividade pelo método de microbiologia convencional. Os sorovares identificados na avaliação dos lotes de frangos e carcaças foram: *S. Heidelberg* (63,9%), *S. Enteritidis* (31,9%), *S. Worthington* (2,1%) e *S. Tennessee* (2,1%).

A presença de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* em carcaças de frangos resfriadas e suabes de arrasto foram descritos em outro estudo no Sul do Brasil (BORSOI et al., 2006). Tais sorovares tiveram a ocorrência de 32% e 9% em carcaças, respectivamente. Na avaliação dos suabes de arrasto, o sorovar *S. Enteritidis* esteve presente em 31% das amostras, porém o sorovar *S. Heidelberg* não foi identificado.

No Estado de Goiás a ocorrência de *Salmonella* em forros de caixa de transporte e em órgãos de pintos de corte de um dia foi estudada por meio de cultura bacteriológica convencional. Foi verificada a ocorrência de *Salmonella* em 55,6 % (10/18) dos lotes sendo 10 lotes positivos oriundos de caixa de transporte e um lote de órgãos de pinto de um dia. A frequência de isolamento de *Salmonella* nos forros de caixas foi de 11,1%, e nos órgãos de pintos de corte de um dia, 3%, sendo encontrados os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*, o primeiro mais freqüente (92,3%) (ROCHA et al., 2003).

A *Salmonella* é o agente bacteriano de doenças causadas por alimentos em humanos mais comuns nos Estados Unidos. Dentre os sorovares, a *S. Heidelberg* é o quarto sorovar mais comumente reportado em doenças em humanos. Estudos de casos realizados em vários lugares dos Estados Unidos com *S. Heidelberg* identificaram que o consumo de ovos preparados fora dos domicílios é um significativo fator de risco para doenças. Poucos casos de doenças em humanos associadas ao consumo de carne de frango foram reportados nos Estados Unidos (CHITTICK et al., 2006).

A contaminação interna de ovos obtidos de poedeiras contaminadas com *S. Enteritidis* tem sido um ponto de preocupação proeminente na área de saúde pública a nível internacional desde a década de 80. Durante este período grandes recursos financeiros foram direcionados, nos Estados Unidos, para o controle e detecção deste

sorovar em lotes de poedeiras comerciais. Recentemente os centros de controle e prevenção de enfermidades reportaram que há uma associação significativa entre ovos. alimentos que contém ovos e a infecção de *S. Heidelberg* em humanos (GAST et al.,2004). A partir destes dados, Gast e colaboradores (2004, 2005a, 2005b, 2007) desenvolveram uma série de pesquisas para melhor conhecimento da interação sorovar Heidelberg e poedeiras. Colonização do trato reprodutivo após infecção experimental, penetração em ovos *in vitro*, relação entre a duração da excreção fecal e a produção de ovos contaminados; e colonização de diferentes regiões do trato reprodutivo e produção de ovos contaminados com *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* foram objetos dos estudos.

No Canadá a *S. Heidelberg* é um agente que está sob vista da importância em saúde pública. A *S. Heidelberg* alterna com *S. Enteritidis* a posição de segundo ou terceiro lugar como prevalência de sorovar isolados em humanos (DEMEZUK et al., 2003). A Agência de Saúde Pública do Canadá (PHAC) publicou um estudo sobre a resistência ao antimicrobiano ceftiofur em *S. Heidelberg* isoladas em incubatórios. Este trabalho foi apresentado como apelo à conscientização no uso de drogas antimicrobianas em veterinária a fim conter o desenvolvimento de resistência à cefalosporinas nas cepas que atingem e causam doenças em humanos (PAHC, 2006).

2.3 Fatores de Virulência em *Salmonella* sp.

A *Salmonella* está entre as bactérias mais extensivamente estudadas em termos de sua fisiologia, genética, estrutura celular e desenvolvimento, além de ser um dos patógenos bacterianos que causam gastroenterite mais bem caracterizado. Estudos realizados sobre a base genética da virulência de *Salmonella* promoveram significantes avanços no entendimento da interação patógeno – hospedeiros (DARWIN; MILLER, 1999).

2.3.1 Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS está situado na parede das bactérias Gram negativas e é composto por uma cadeia lateral de polissacarídeo (antígeno O), ligada a uma região do *core* (oligosacarídeo) que por sua vez, está ligado a uma molécula lipídica (lipídeo A) (GALVANI et al., 2005). LPS interage com o sistema imune, induzindo inflamação, choque séptico, febre e morte. A resposta inflamatória induzida pelo LPS é mediada primeiramente pela interação com macrófagos (FREUDENBERG et al., 2001).

Salmonella com LPS incompleto (mutantes rugosas) são sensíveis a ação do sistema complemento, são mortas eficientemente por fagócitos do hospedeiro e são mais sensíveis a sais biliares e detergentes (YETHON et al., 2000).

2.3.2 Plasmídeos

Os plasmídeos, em *Salmonella*, controlam importantes propriedades médicas incluindo fatores de virulência, resistência a metais pesados, antibióticos e fagos assim como a utilização de fontes de carbono. A maioria dos sorovares de *Salmonella enterica* subspécie *enterica* não possuem qualquer plasmídeo. Sorovares como *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Hadar*, *S. Infantis* e a maioria dos sorovares são usualmente livres de plasmídeos. Mesmo a assertiva sendo verdadeira, quando são observadas todas as *Salmonella enterica* subspécie *enterica*, isso não é válido para, por exemplo, os sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Dublin* e *S. Abortus-ovis*, freqüentemente associados às infecções em humanos e animais de criação, os quais possuem plasmídeos específicos. A presença dos genes *spvRABCD* (*Salmonella Plasmid Virulence*) é comum a todos os plasmídeos. A região *spv* abriga cinco genes, *spvRABCD*, organizados em um *regulon* conservado entre os sorovares. A síntese e localização de proteínas codificadas pelos quatro genes estruturais (*spvABCD*) têm sido estudadas com o uso de anticorpos específicos. *SpvA* (28kDa) é encontrado exclusivamente na membrana externa. Surpreendentemente, em estudo conduzido, mutações no *spvA* não reduziram a virulência de *Salmonella* Dublin em ratos infectados por via intra - peritoneal. *SpvB* (66 kDa) é encontrado em duas frações, membrana interna e citoplasma, sendo esta a maior proporção. *SpvB* é absolutamente essencial para virulência. *SpvC* (28 k Da) é detectado somente no citoplasma, enquanto *SpvD* (25 kDa) é exportado da célula. Mutações nos genes *SpvC* e *SpvD* causam defeitos na virulência em *Salmonella*. O gene *spvR*, tem expressão auto-regulada e este é essencial para a expressão do operon *spvABCD* (ROTGER; CASADESÚS, 1999). Este operon (*spvABCD*) possivelmente tenha a habilidade de aumentar a severidade da enterite e persistência extra-intestinal das *Salmonella* (OLIVEIRA et al., 2003). Libby et al. (2000) pesquisaram o papel de genes contidos no plasmídeo *spv* e demonstraram sua influência positiva em apoptose de macrófagos humanos. Ainda neste estudo, sugeriram que tais genes facilitam a adaptação da *Salmonella* nas localizações extra-intestinais. De acordo com o sorovar, o plasmídeo

pode possuir outros genes associados à virulência, como *rck* (*resistance complement killing*) que determina o aumento da resistência ao sistema complemento, resistência sérica e adesão à linha de células epiteliais; *pef* (*plasmid encoded fimbriae*) envolvido na formação de fímbria, *srgA* (*SidA-regulated gene*) que atua no metabolismo da dissulfito-oxireductase ou ainda, *mig-5* (*macrophage-inducibile gene*) relacionado com o metabolismo da anidrase carbônica (RYCHLIK et al., 2006).

2.3.3 Flagelos

A grande maioria das *Salmonella* possui cerca de 5 a 10 flagelos, aparentemente randomicamente posicionados, que conferem motilidade às bactérias. As *Salmonella* são classificadas por identificação sorológica a partir de antígenos flagelares, ou seja, fórmulas antigênicas. Os genes responsáveis pelo antígeno somático “O” para *Salmonella* estão localizados no *rfb cluster*. Fase 1 e fase 2 do antígeno flagelar “H”, são alternativamente expressas pelos genes *fliC* e *fljB* respectivamente. A variação de fase é regulada por um mecanismo de recombinação controlado pelo *hin* gene. O gene *hin* e o operon *fljAB* sofrem uma inversão a cada 106 divisões celulares, provocando a supressão da expressão do operon. O operon *fljAB* contém o gene *fljA* que codifica uma proteína que reprime a expressão do gene *fliC*, deste modo, quando o operon *fljAB* não é expresso, o gene *fliC* expressa a fase 1 flagelar (ECHEITA et al., 2002). A variação de fase flagelar, apresentada pela maioria das *Salmonella*, parece estar relacionada à fuga do sistema de defesa do hospedeiro (ASTEN; DIJK, 2005). O papel do flagelo na virulência não é claro e em diferentes espécies apresenta distintas funções. Em ratos os flagelos não estão envolvidos com a patogenicidade de *Salmonella* Typhimurium, porém em bezerros, os flagelos contribuíram para invasão intestinal, recrutamento de polimorfonucleados e secreção de fluídos nos animais infectados (LIBBY et al., 2004).

2.3.4 Fímbrias

As fímbrias, também chamadas de *pilli*, são filamentos protéicos produzidos na superfície estrutural da bactéria, compostas de arranjos helicoidais idênticos e possuem subunidades protéicas chamadas fibrinas. Em *Salmonella* já foram identificados 20 operons fimbriais, além do operon da fímbria tipo IV. A fixação à célula do hospedeiro é essencial para a patogenicidade da bactéria, sendo este evento mediado principalmente

pelas fimbrias (CLOUTHIER et al., 1993). Na prevalência dos *operons* fimbriais *Salmonella* - específicos, está incluído o *lpf* (*long polar fimbriae*), que regula a expressão de fimbria polar; *pef* (*plasmid encoded fimbriae*) fimbria codificada por plasmídeo, *sef* (*Salmonella encoded fimbriae*) limitado a poucos sorovares (FOLKESSON et al., 1999). O *sef operon*, localizado em uma pequena Ilha de Patogenicidade, contém quatro genes estruturais (*sefABCD*). Este *operon* é requerido para translocação e biogênese da fimbria SEF14, que está restrita ao sorovar *S. Enteritidis* e outros sorovares do grupo D. O gene *sefA* codifica uma única fimbria e é a maior subunidade; *sefB* e *sefC* codificam proteínas. O gene *sefD* codifica adesinas e é a maior subunidade na codificação da fimbria SEF18. Outro *operon* envolvido na codificação de fimbrias é o *agf* (*aggregative fimbriae*), o qual codifica a fimbria SEF17 ou Tafi (*thin aggregative fimbriae*) que é essencial para formação da matriz extracelular, a qual esta envolvida em agregação multicelular (agregação bacteriana), formação de biofilme, resistência ambiental, aderência e invasão em células eucarióticas e também exerce papel pró – inflamatório (GIBSON, et al., 2007). A fimbria polar (*lpf - long polar fimbriae*) é mais longa do que as outras fimbrias elaboradas e polarmente localizada na célula bacteriana. O gene *lpfA* codifica a maior subunidade da fimbria, sendo que os genes fimbriais *lpf* completos parecem estar presentes somente em algumas sorovares de *Salmonella* subespécie *entericas* e *S. bongori*. Provavelmente a fimbria polar esteja envolvida no tropismo pelas placas de Peyer's em intestinos de ratos (BAÜMLER et al., 1998). O papel dos *operons* fimbriais na virulência de infecção por *Salmonella* em suínos, bovinos ou frangos não está completamente estabelecida, porém devido ao grande número de *operons* fimbriais pode ser sugerido que a bactéria apresenta diferentes mecanismos de aderência quando em diferentes hospedeiros (LIBBY et al., 2004).

2.3.5 Ilhas de Patogenicidade (IP)

As IPs constituem-se por um grupo de genes envolvidos em codificar fatores específicos de virulência. Até o presente, cinco IPs foram descritas em *Salmonella* e estas foram adquiridas durante a evolução da patogenicidade da bactéria (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001), porém a aquisição de IPs por um organismo, não garante a transformação do mesmo em um patógeno. A IP-1 encontra-se presente em *Salmonella bongori* e todas as variedades de *Salmonella enterica* e os *operons* *Inv* (*invasibility*) e *Hil*

(*hiper invasibility*) estão presentes nesta ilha, em meio a outros genes e proteínas. A IP-1 codifica determinantes que mediam a invasão de célula não fagocíticas dos hospedeiros, apoptose de macrófagos *in vitro* e ativação de fatores de transcrição e é requerida para invasão intestinal, mas não para a infecção sistêmica (HENSEL, 2000; MARCUS et al., 2000). A expressão da IP-1 é regulada por diversos sinais e elementos que são: reguladores locais (InvF, HilA, HilC e HilD), sistemas de regulação global (SirA e PhoPQ), fatores de ativação do ambiente do lúmen intestinal (baixos níveis de oxigênio, alta osmolaridade, fase inicial de crescimento logarítmico da bactéria e síntese protéica bacteriana) e fatores de repressão (alto nível de oxigênio e fase estacionária do crescimento bacteriano) (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001). A IP-2 está dividida em dois segmentos. A porção menor (14,5 kb) contém um grupo de cinco genes *ttr*, envolvidos na redução do tetratoato e sete ORFs (*operon reading frame*) com função ainda desconhecida. A porção maior (25,3 kb) alberga importantes genes de virulência que podem ser dividido do seguinte modo: *ssa* (*secretion system apparatus*), *ssr/spiR* (*secretion system regulator*), *ssc* (*secretion system chaperone*) e *sse* (*secretion system effector*) (OCHOA; RODRIGUEZ, 2005). A IP-2 é essencial para a infecção sistêmica e sobrevivência da bactéria dentro dos macrófagos (HENSEL, 2000) e como a IP-1, também regulada por diversos sinais e elementos que são: reguladores locais (SsrAB), sistemas de regulação global (PhoPQ e OmpR/EnvZ), fatores de ativação ambiental dentro da célula do hospedeiro (não disponibilidade de fosfato, baixo nível de magnésio ou cálcio, final da fase logarítmica de crescimento bacteriano à fase estacionária) e fatores ambientais de repressão (alto nível de fosfato e altos níveis de magnésio ou cálcio) (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001). As IP-1 e 2 possuem o SSTT (sistema de secreção tipo 3) que é usado por vários patógenos bacterianos para entregar fatores de virulência dentro da célula do hospedeiro. Este sistema de secreção consiste em muitos componentes, incluindo mais de vinte proteínas. A função de cada SSTT é requerida para diferentes formas de interação com a célula do hospedeiro em diferentes estágios da patogênese da *Salmonella* (MARCUS et al., 2000). A IP-3 também é necessária para a sobrevivência intracelular de *Salmonella* em macrófagos, provendo produtos essenciais para o crescimento da bactéria em condições limitadas de magnésio. Alberga o *operon mgtCB* que codifica a proteína MgtC (*intramacrophage survival protein*). A IP-4 codifica um suposto sistema de secreção tipo 1 que faz parte da regulação da secreção de toxinas e

provavelmente participe na adaptação de *Salmonella* ao ambiente intracelular de macrófagos. Finalmente, a IP-5 codifica proteínas efetoras envolvidas na secreção fluída e reação inflamatória na mucosa intestinal (OCHOA; RODRIGUEZ, 2005).

2.4 Interação *Salmonella* – Hospedeiro

2.4.1 Adesão e Infecção

A ingestão de *Salmonella* é a via mais comum de infecção do hospedeiro. Ao chegarem ao intestino, as bactérias necessitam aderir-se as células intestinais para sua sobrevivência. As adesinas do patógeno têm uma estrutura que permite reconhecer moléculas presentes nas células do hospedeiro, chamadas de receptores, com uma estereoquímica (disposição espacial das moléculas) específica. Esta união determina aos hospedeiros a localização em diferentes órgãos da bactéria, além disso, as adesinas têm a capacidade de ativar linfócitos B e neutrófilos que resultam numa grande variedade de respostas biológicas incluindo proliferação celular e secreção de citocinas. A *Salmonella* expressa uma ampla variedade de fímbrias com diferentes especificidades de união, além de outras adesinas comum à outras Gram negativas, flagelo e lipopolissacarídeo. O receptor do hospedeiro que a adesina reconhece determina a especificidade do tecido por esta adesina e a colonização ou persistência bacteriana (OCHOA; RODRIGUEZ, 2005).

A *Salmonella* inicia seu ciclo de infecção invadindo o hospedeiro através do tecido linfóide, incluindo Placas de Peyer tonsilas cecais das aves. Adere-se apicalmente às células epiteliais do íleo e às células M (célula sem microvilosidades, porém com microdobras e sem muco recobrimo-a). As ondulações das células alvo fazem com que as *Salmonella* sejam internalizadas, dentro de um vacúolo (SCV - *Salmonella-containing vacuole*) que se move rumo à base da célula e a morfologia do enterócito é restabelecida. Várias proteínas efetoras secretadas pelo SSTT da IP-1 desempenham papel na entrada da *Salmonella* nas células epiteliais não fagocíticas. A invasão das células M ou de enterócitos estimula uma forte reação inflamatória caracterizada pela abundância de PMNs. As reações adversas à infiltração de PMNs são a morte celular e comprometimento dos folículos associados ao epitélio, promovendo nova oportunidade para a bactéria invadir o tecido submucoso. A transcitose, através da célula M nas Placas de Peyer, promove o acesso aos folículos da lâmina própria, onde as *Salmonella*

encontram fagócitos do hospedeiro. A maioria das *Salmonella* tem a habilidade de sobreviver e replicar dentro de macrófagos, promovendo colonização extra-intestinal de diversos órgãos (HIRSH, 2003).

2.4.2 Diarréia

Os mecanismos da produção de diarréia por *Salmonella* não estão bem esclarecidos. Para Hirsh (2003) no momento da adesão e formação de ondulação na membrana, ocorre a ativação da fosfolipase C e fosforilação das proteínas dos canais de íons cloreto e das proteínas de transporte iônico associadas à membrana, envolvidas na absorção do cloreto de sódio, resultando em diarréia. Em outro momento, ocorre diarréia secundária à reação inflamatória por ativação da proteína cinase C ou como consequência de uma proteína com efeito semelhante ao enterotóxico. Ochoa e Rodriguez (2005) descrevem que a *Salmonella* induz a migração de PMNs assim promovendo liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL8 (*interleukin*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), IFN γ (*interferon*), TNF α (*tumor necrosis factor*), GCP2 (*granulocyte chemotactic protein-2*) e GRO- α . GRO- β e GRO- γ (*growth-related oncogene*) que recrutam células fagocíticas e estas estão envolvidas no processo diarréico, também citam um quimioatrativo conhecido como PEEC (*pathogen elicited epithelial chemoattractant*). Libby e colegas (2004) citam três itens como fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da diarréia: a) incremento na secreção de fluídos pelas células epiteliais através das proteínas efetoras da IP-1 que afetam o metabolismo do inositol-fosfato, acumulando fluído no intestino infectado por *Salmonella*; b) a resposta inflamatória produz prostaglandinas, leucotrienos, histamina e intermediários do oxigênio reativo, ocorrendo hiper secreção de cloro seguida de osmose de água; c) fluído rico em proteínas é perdido dos tecidos intestinais, incluindo fluído perdido pelos vasos sanguíneos por efeito do LPS, d) perda de células epiteliais representando perda de superfície de absorção.

2.4.3 Resposta Imunológica e Aves Carreadoras de *Salmonella*

A colonização de *Salmonella* em aves é estabelecida nos cecos, que representam o reservatório de infecção de *Salmonella* em aves. O nível e a duração da colonização bacteriana estão sob controle genético da ave hospedeira, contudo os complexos grupos

de genes envolvidos foram parcialmente caracterizados até o momento e estes estão estreitamente relacionados com a idade da ave, via de inoculação e fenótipo observado. O mecanismo de estado da ave portadora ou carreadora ainda não está esclarecido (DOUCHET-SUCHAUX et al., 1995).

Fagócitos são os maiores produtores e células alvo das citocinas inflamatórias, assim como, promovem a eliminação direta das bactérias invasoras e são importantes células na resposta à infecção de *Salmonella* no tecido intestinal dos frangos. Nas aves o gene *SLC11A1* codifica a proteína NRAMP1 (*natural resistance-associated macrophage proteins* – 1), proteína de membrana presente exclusivamente em fagócitos profissionais e fundamental na resistência contra *Salmonella*, conforme Portillo (2001). O gene *SLC11A1* foi correlacionado com o grau de resistência do animal à infecção sistêmica por *Salmonella* e ao estado de carreador em aves adultas (BEAUMONT et al., 2003).

No neonato, a proteção da mucosa intestinal depende da barreira celular (macrófagos, células *natural killers* (NK) e heterófilos) barreira química, barreira física e da presença das células de Paneth localizadas nas criptas, que secretam lisosimas, defensinas α e β e fosfolipase A2 secretória, que lisam bactérias fungos e vírus envelopados (ITO et al., 2007). Heterófilos estão presentes em grande número no sangue periférico e as células de Paneth estão presentes e funcionais nas aves recém eclodidas, porém exibem incremento em sua função a partir dos quatro dias pós-eclosão. Por outro lado, macrófagos aparecem completamente funcionais ao primeiro dia de vida, a julgar pela capacidade de fagocitose de bactérias opsonizadas e não opsonizadas (BEAL et al., 2004). Devido a tais fatores, infecções em aves jovens por *Salmonella* podem levar a persistência da bactéria na excreção fecal e indução de ave carreadora (VAN IMMERSSEEL et al., 2004).

Quanto ao estado de carreador é sugerido que o mecanismo de resistência cecal ao estado de portador é diferente entre aves jovens e adultas. Uma das explicações a favor da resistência associada à idade é o nível de maturação GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), o qual está imaturo até os 21 dias de idade (SADEYEN et al., 2006). Neste sentido, foi observada por Beal e colegas (2004), a diminuição da duração de excreção fecal (*clearance*) com o aumento idade das aves, também explicado pelo nível de maturação do sistema imune.

Berthelot-Hérault et al. (2003) estudaram a influência da imunidade humoral no estado de aves carreadoras de *Salmonella*, concluindo que a resposta humoral sistêmica e

a resposta imune local parecem estar relacionadas na colonização cecal, onde a resposta do anticorpo IgA intestinal contribui parcialmente para a eliminação tardia de *Salmonella* do intestino. Diferentemente do exposto por Desmidt e colegas (1998a), os quais sugerem maior eficiência da resposta imune local no intestino para o *clearance* intestinal de *Salmonella*, frente à resposta sistêmica.

A resposta humoral foi associada com o decréscimo do número de *Salmonella* encontradas no baço de duas linhagens de aves inoculadas, com o mesmo desafio e à mesma idade. Ainda neste estudo foi demonstrado que existiu relação inversa entre a colonização de cecos e colonização sistêmica nestes animais. O alto nível de colonização cecal foi associado à redução da atividade fagocítica e resposta linfoproliferativa nestas aves. Os dados sugeriram que os mecanismos de controle de infecção sistêmica são diferentes dos mecanismos de controle da colonização cecal (SADEYEN et al., 2004).

2.5 *Salmonella* e Homeostase Intestinal em Frangos

Homeostase intestinal pode ser definida como a habilidade do intestino defender-se e prevenir-se da colonização de agentes patogênicos (THOMPSON; APPLGATE; 2006), ou ainda, como equilíbrio dinâmico entre a mucosa intestinal e o conteúdo luminal e preservação das características estruturais e funcionais da mucosa dentro dos padrões esperados para o tipo, espécie e linhagem de ave, para uma determinada fase de seu ciclo de vida (ITO et al., 2007).

Na eclosão o trato gastrointestinal (TGI) das aves está anatomicamente completo, porém sua capacidade funcional de digestão está imatura. O TGI sofre processo de maturação que envolve adaptações morfológicas e fisiológicas. O intestino delgado aumenta em peso mais rapidamente que a musculatura corporal (MAIORKA et al., 2000), alcançando máximo desenvolvimento relativo do quarto ao oitavo dia de vida, em frangos (NOY; SKLAN, 1998).

O número e a composição da microflora intestinal em aves variam consideravelmente ao longo do TGI. O ceco é conhecido como o segmento de maior colonização de microrganismos, estando presente um grande número de bactérias Gram positivas e negativas. O processo de aderência das bactérias no intestino é realizado através de fímbrias. Considerando-se que os enterócitos no intestino delgado apresentam seu glicocálix composto por polissacarídeos, a colonização das bactérias nos diferentes

segmentos parece estar na dependência da fímbria de uma bactéria com o glicocálix do enterócito (MAIORKA, 2004).

A absorção de eletrólitos e de água ocorre no ápice da vilosidade do jejuno, do íleo e do ceco, enquanto que na cripta de Lieberkühn, a secreção de cloretos e de potássio é feita por canais específicos, que se abrem respectivamente, sob modulação do AMP cíclico (AMPc – adenosina monofosfato cíclico) e cálcio e pelo aumento do AMPc intracelular. Até os 21 dias de idade o sistema imune do intestino ou GALT está imaturo e toda proteção local é feita pela imunidade inata e pelos anticorpos maternos que podem impedir ou controlar a translocação ou a disseminação extra-intestinal de bactérias e vírus. A imunidade humoral no intestino (secreção de IgA no lúmen, aporte de IgY e IgM na lâmina própria e na muscular da mucosa) é esclarecido somente após os 21 dias de idade, mesmo quando a vacinação é feita no neonato ou na primeira semana de idade. Por esta razão, *Salmonella sp*, *Campylobacter sp* e *Escherichia coli*, que são patógenos de importância na saúde humana, persistem no lúmen intestinal por um período tão longo quanto oito a nove semanas de vida da ave (ITO et al., 2007).

O ceco é conhecido como reservatório de *Salmonella*, como anteriormente citado, porém o íleo tem interesse particular por sua proximidade ao ceco, albergando grande população microbiota e também como porção do intestino freqüentemente colonizada por *Salmonella* (THOMPSON; APPLGATE; 2006).

As projeções da mucosa intestinal denominada vilosidades, são compostas por três tipos de células funcionalmente distintas: enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas. Os enterócitos são células que respondem pela digestão final do alimento e pelo transporte trans-epitelial dos nutrientes para o lúmen. Estas células apresentam um processo de maturação que ocorre durante o processo de migração da cripta (base) para o ápice do vilo. As células caliciformes são secretoras de glicoproteínas, que têm a função de proteger o epitélio intestinal contra ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta. As células enteroendócrinas, por sua vez, são produtoras de hormônios peptídicos (gastrina, secretina e colecistoquinina) e monoaminas biogênicas que participam na regulação da digestão, absorção e utilização dos nutrientes (MAIORKA, 2004)..

De acordo com Yamauchi; Isshiki (1991), quanto maior o número de células, maior o tamanho da vilosidade e conseqüentemente, maior a área de absorção de nutrientes. Em

aves, as divisões mitóticas nas criptas correspondem a 55% da proliferação celular no intestino, na região média das vilosidades a 32% e na região apical a 8%. Para a relação vilosidade/cripta intestinal, o desejável é quando as vilosidades se apresentam altas e as criptas rasas (NABBURS, 1995). A morfologia intestinal pode variar influenciada pelas características da dieta, estresse calórico e agentes patogênicos, dentre outros fatores (ALVARENGA et al., 2004). Quanto às criptas, de acordo com Hancock (1990) a profundidade da cripta é um indicativo do nível de hiperplasia das células epiteliais, sendo que a redução da profundidade indica um menor nível de agressão à morfologia da parede intestinal. O aumento da proliferação celular nas criptas determina o aparecimento de enterócitos imaturos, que apresentam baixa capacidade absorptiva, bem como reduzida atividade das enzimas (BUTTS, et al., 1987). Em relação às vilosidades, foi demonstrado que o uso de agentes tróficos adicionados à alimentação causa estimulação do desenvolvimento da mucosa intestinal, acelerando o processo mitótico na região vilosidade-cripta e provocando em consequência, aumento no número de células e tamanho da vilosidade. Entre os agentes tróficos aparecem alguns aminoácidos, ácidos graxos de cadeia curta e prebióticos (MAIORKA, 2004).

Desmidt et al.(1998b) analisaram a localização de *Salmonella* no ceco de frangos, utilizando a técnica de imunohistoquímica e observaram que as *Salmonella* estavam presente em grande número nas criptas, porém não aderidas às células epiteliais e que a invasão intestinal ocorreu no ápice da vilosidade. A ligação da *Salmonella* nas vilosidades é feita em receptores específicos que estão presentes em enterócitos maduros, mas não em enterócitos não diferenciados.

A manutenção fisiológica da integridade do epitélio intestinal e estruturas anexas de suporte têm custo para ave, estimado em 20% da energia bruta consumida pelo animal (McBRIDE; KELLY, 1990). Quando ocorrem lesões na mucosa, além da redução de substrato digerido e absorvido, há também o custo de energia para a renovação do tecido, sendo que esta energia poderia ser utilizada para o desenvolvimento de outros tecidos ou células do corpo, como massa muscular e células do sistema imune, por exemplo.

2.6 Controle de *Salmonella* em Frango de Corte

O controle de *Salmonella* é complexo, pois inúmeras são as fontes de contaminação em um sistema de produção de frangos, incluindo granja de matrizes, incubatório,

alimento, roedores, insetos, aves silvestres, transporte, meio ambiente da criação dos frangos, processo de abate e meio ambiente da planta de abate. Todas as fontes de *Salmonella* são potencialmente importantes, contudo, o incubatório parece ter menos importância do que os fatores envolvidos no ambiente de crescimento para o produto final (BAILEY et al. 2001).

Corry et al., (2002) e Bailey et al. (2001) relatam que os sorovares de *Salmonella* diagnosticados no incubatório e em pintos de um dia foram encontrados em carcaças, porém em baixa frequência. Diferentemente, Byrd et al.(1999) encontraram em seus estudos forte relação entre os sorovares encontrados no incubatório e carcaças. No mesmo contexto, Limawongpranee et al. (1999) citam que os sorovares encontrados em incubatório também são encontrados em amostras de campo e podem ser recuperados em carcaças após o processo de abate.

O estresse causado durante o transporte ao abatedouro aumenta a contaminação de *Salmonella* das aves antes do abate. Pesquisas de *Salmonella* nas caixas de transporte de frangos demonstram que os sorovares identificados a campo e sorovares isolados das caixas de transporte são frequentemente encontrados nas análises de carcaças após o processamento no matadouro (SHACKELFORD, 1988; BAILEY, 1988; BAILEY et al., 2001; CORRY et al., 2002, ROY et al., 2002).

Para estratégias de controle de *Salmonella* em frangos de corte serem efetivas, alguns pontos devem ser conhecidos, como o conhecimento da localização destas bactérias, frequência de aparecimento, sorovares presentes e possíveis fontes de infecção. Deste modo a monitoria torna-se uma ferramenta importante para a avaliação do *status* dos plantéis (Back et al., 2006).

Resultados laboratoriais de pesquisa de *Salmonella* respondem somente a questões definidas (como a presença ou ausência de um determinado sorovar de *Salmonella* em um tipo particular da amostra) e têm valor limitado para a previsão e resolução de problemas emergentes que envolvem, por exemplo, novos reservatórios. O tipo de amostra selecionada e tipo de ensaio são elementos críticos para determinar a utilidade dos resultados obtidos por meio dos testes (bacteriologia, sorologia ou análise de material genético). O número de amostras necessárias para estabelecer confiança e validar os resultados está diretamente relacionado ao tamanho do lote e inversamente relacionado à prevalência da infecção (AHO, 1992).

Como muitos sorovares de *Salmonella* têm algum nível de invasibilidade, uma variedade de tecidos internos (incluindo o fígado, o baço, ovário, oviduto, testículos, saco gema, coração, sangue do coração, rim, vesícula, pâncreas, líquido sinovial e olhos) são potencialmente úteis para a detecção de aves infectadas. Múltiplos órgãos (processados individualmente ou em *pool*) são normalmente coletados a partir de cada ave para maximizar a probabilidade de detecção (GAST et al., 1990).

Suabes cloacais ou amostra de fezes são materiais testados para a detecção de *Salmonella*, porém a intermitência de excreção fecal da bactéria por aves infectadas limita a confiabilidade das amostras selecionadas (VAN IMMERSSEEL et al., 2004). A excreção fecal de *Salmonella* pelas aves também pode ser indiretamente detectada testando amostras do ambiente de criação, sendo esta estratégia útil para o acompanhamento da entrada de *Salmonella* carregadas por vetores, trabalhadores, equipamentos e outras fontes. Deste modo, Kingston et al. (1981) sugeriram que a partir de suabes de arrasto, coletados do chão dos galpões de frangos, é possível detectar a presença de *Salmonella* com alta sensibilidade.

Por vários dias após a eclosão as aves são altamente sensíveis à infecção por *Salmonella*, mesmo em exposição a doses muito baixas, porém elas tornam-se mais resistentes durante as primeiras semanas de vida. Esta transição é principalmente devido à aquisição gradual, pelos pintos, de uma microflora intestinal completa a partir do meio ambiente. A capacidade das bactérias da flora normal do trato gastrointestinal dos frangos inibirem a colonização por patógenos entéricos, tal como *Salmonella*, tem sido estudada e aplicada para desenvolver tratamentos para controle do trato gastrointestinal. Tais tratamentos geralmente envolvem a administração de culturas bacterianas definidas ou indefinidas, visando diminuir a colonização gastrointestinal por organismos como a *Salmonella*. O mecanismo pelo qual estas culturas exercem um efeito protetor contra patógenos é muitas vezes caracterizado globalmente como exclusão competitiva (EC). Manipulações não microbianas da bioquímica gastrointestinal foram igualmente trabalhadas para conseguir modular colonização intestinal bacteriana. Quanto às *Salmonellas* tíficas, não é conhecido se existem variações entre os sorovares ou cepas na suscetibilidade à exclusão competitiva pela manipulação da flora ou bioquímica intestinal (GAST, 2007). Aditivos medicamentosos alimentares para o controle de *Salmonella*

incluem antimicrobianos de uso profilático e curativo, ácidos orgânicos, óleos essenciais, prebióticos, probióticos e simbióticos (VAN IMMENSEEL et al., 2003).

Com as proibições de uso de certos antimicrobianos na criação de frangos, os ácidos orgânicos e óleos essenciais de plantas tiveram pesquisas mais intensas nos últimos anos. Ácidos orgânicos são considerados todos os ácidos orgânicos carboxílicos, incluindo ácidos graxos e amino ácidos, com a estrutura geral R-COOH. Nem todos os ácidos têm ação antimicrobiana sobre a flora intestinal (DIBNER; BUTTIN, 2002). Os ácidos mais estudados no controle de *Salmonella* e no desempenho zootécnico das aves são os ácidos orgânicos de cadeia curta, com 1 a 7 carbonos (*short-chain fatty acids* -SCFA), representados pelos ácidos fórmico, acético, propiônico e butírico; e os triglicerídios de cadeia média, com 6 a 12 carbonos (*medium-chain fatty acids* - MCFA), representados pelos ácidos capríco, caprílico e cáprico (VAN IMMENSEEL et al., 2004). Quando os ácidos estão na forma não dissociada (não – ionizados) podem atravessar a membrana semipermeável de microrganismos por difusão passiva e atingir o citoplasma. Em contato com pH mais alcalino do meio intracelular, o ácido se dissocia liberando íons hidrogênio e reduzindo o pH interno das bactérias. Esta queda de pH provoca desnaturação de enzimas citoplasmáticas, interferindo nos sistemas de transporte de energia e desacoplando bombas de ATP (adenosina trifosfato), ocasionando a morte da célula bacteriana (GAUTHIER, 2005). Os genes *hilA* (hiper invasibilidade) e *invF* (invasibilidade) da IP-1 das *Salmonella* são responsáveis pela invasão da bactéria na célula do hospedeiro. Foi demonstrado que os ácidos de cadeia curta e de cadeia média foram capazes de inibir a expressão desses genes *in vitro* (LAWHON et al., 2002; VAN IMMENSEEL et al., 2003, 2004).

Assim como os ácidos orgânicos, os óleos essenciais têm sido usados como promotores de crescimento e antimicrobianos. Os óleos constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos (óleo cítrico), alcoóis simples (linalol), aldeídos (cinamaldeído), cetonas (óleo de cânfora), fenóis (timol, eugenol e carvacrol), ésteres (óleo de lavanda) dentre outros, em diferentes concentrações, nos quais um composto farmacologicamente ativo é majoritário (SANTURIO et al., 2007). Quanto ao modo de ação dos óleos é difícil generalizar, pois varia com suas propriedades e também é relativo à sensibilidade das bactérias, sendo que o consenso aponta para sua ação sobre a

membrana das células bacterianas, alteração do gradiente de íons e da bomba de ATP. Uma proposta quanto à ação dos óleos é que estes, atuam sinergicamente com os ácidos orgânicos, aumentando a permeabilidade da membrana das bactérias para a entrada dos ácidos. (GAUTHIER, 2005).

Dentre as medidas preventivas adotadas para evitar a contaminação de lotes por *Salmonella* está o uso de vacinas. As vacinas contra *Salmonella* foram inicialmente utilizadas para controle dos quadros de pulorose (*S. Pullorum*) e tifo aviário (*S. Gallinarum*), com vacinas vivas feitas a partir de uma cepa rugosa de *Salmonella Gallinarum*, de baixa patogenicidade. Somente o uso desta ferramenta não foi suficiente para controlar os quadros clínicos. A eliminação de lotes positivos e adoção de medidas de vazão sanitário adequado e desinfecção também foram necessárias. Com o controle destas *Salmonella* começaram a ter importância as *Salmonella* paratíficas. Em virtude do fato de que o uso de medidas de biossegurança e tratamentos com antimicrobianos não serem suficientes para controlar as *Salmonella* paratíficas, houve a necessidade de outras medidas de controle e o desenvolvimento de vacinas teve mais atenção (CARDOSO; ROCHA, 2006).

A contribuição da resposta humoral e da resposta mediada por células na proteção de frangos contra a infecção de *Salmonella*, não está completamente esclarecida. A vacinação de aves com vacinas vivas atenuadas ou com vacinas inativadas (mortas) tem histórico de aplicação para redução da suscetibilidade das aves à infecção por *Salmonella*. Ambas as vacinas demonstram habilidade de promover proteção, contudo, não são capazes de prevenir completamente as aves da infecção, especialmente em situações de alto desafio (ROLAND et al., 2004). Uma limitação das vacinas mortas é a incapacidade de promover eficiente imunidade celular, talvez isso ocorra devido aos efeitos adversos sobre os antígenos durante os processos de inativação. Proteção de alta eficácia e longa duração é atribuída à vacina viva de *Salmonella*, possivelmente como resultado de uma maior persistência na apresentação de antígenos ao sistema imune do hospedeiro (BABU et al, 2004). Bacterinas apresentam o inconveniente de limitar a proteção cruzada suscitada pelo hospedeiro, porém o uso de bacterinas com múltiplas cepas corresponderá a um amplo espectro de proteção (OKAMURA et al., 2007).

Devido ao fato da eficácia protetora das vacinas ser mais confiável quando o sorovar infectante dos lotes é o mesmo sorovar contido na vacina, esta estratégia é de valor

questionável na prevenção da emergência de novos problemas associados à sorovares de aparecimento inconstante. A vacinação pode ser mais valiosa quando como de programa de redução de riscos, especialmente quando aplicada à lotes de aves muito suscetíveis ou lotes expostos à várias fontes de contaminação, quando evidências epidemiológicas direcionam a preocupação à um sorovar de *Salmonella* específico (GAST, 2007).

Para Gast (2007), sete características comuns entre os programas atuais de controle de *Salmonella* devem ser adotadas: 1) aquisição de pintos de matrizes comprovadamente livres de *Salmonella*; 2) desinfecção dos ovos e incubação em condições rigorosas de higiene; 3) rigorosa limpeza dos galpões de aves entre cada lote; 4) implantação e documentação do controle de pragas com monitoria periódica; 5) aplicação de rígidas normas de biossegurança, com restrição de pessoas e equipamentos dentro do galpão e entre galpões; 6) peletização da ração e exclusão de proteínas de origem animal da formulação, 7) tratamento adequado da água e pureza microbiológica.

3. RESUMOS E ARTIGOS

3.1 Resumo 1

Protocolo para contagem de *Salmonella* a partir de suabes de cloaca.

PROTÓCOLO PARA CONTAGEM DE *Salmonella* A PARTIR DE SUABES DE CLOACA.

*A Borsoi¹, HS Moraes¹, CTP Salle¹, CC Hiller¹, JPB Guahyba¹, VP Nascimento¹

¹ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) - FAVET/UFRGS – Lab. Central - Porto Alegre (RS)

Introdução

A presença de *Salmonella* na indústria de alimentos está ligada à imagem de qualidade da empresa e de seus produtos (3), sendo todas as fontes de contaminação de *Salmonella* potencialmente importantes. Deste modo, não só a detecção do agente, mas a determinação da extensão da contaminação em aves e em seus produtos constitui-se uma ferramenta útil para a avaliação da pressão de infecção deste patógeno. Apresenta-se neste trabalho, o teste de dois protocolos distintos para a contagem de *Salmonella* a partir de suabes de cloaca.

Material e Métodos

Trinta pintinhos de matrizes não vacinadas contra salmonelas, linhagem Ross, foram inoculados individualmente por via oral, ao primeiro dia de vida, com 1 ml de inóculo de *Salmonella* Enteritidis ATCC 1980 (SE) na dose de 10^8 UFC (unidades Formadoras de Colônias)/ml. Nos dias um a cinco pós-inoculação, foram coletados suabes de cloaca de cada ave e colocados em tubos de ensaio. No Protocolo "A" testado incubou-se os suabes em água peptonada 2% (AP), *overnight* a 37°C. As diluições da cultura de AP foram realizadas em caldo Tetratonato (TT) até 10^{-5} e novamente incubado *overnight* a 37°C. O plaqueamento com bastão de vidro de 100µl do TT incubado foi realizado em duplicata de placas com ágar Verde-Brilhante com Novobiocina (BGN). No Protocolo "B" os suabes em AP 2% foram incubados por uma hora a 37°C, as diluições até 10^{-5} foram realizadas em AP 0,1% e o plaqueamento com bastão de vidro de 100µl foi realizado em duplicata de placas com ágar Verde-Brilhante com Novobiocina (BGN) (1). Todas as amostras passaram por isolamento com enriquecimento seletivo paralelamente. A contagem direta das colônias nas placas seguiu o Anexo IV da Instrução Normativa Nº 62 (2). Uma colônia característica de cada placa foi selecionada para testes bioquímicos e biologia molecular para confirmação do gênero.

Resultados e Discussão

No presente teste, somente o protocolo "B" mostrou-se eficiente para a contagem de salmonelas. A partir do protocolo "A" não foi possível a identificação das colônias isoladamente para a contagem. Os dois protocolos foram apresentados na pesquisa de *Salmonella* Hadar (1) e mostraram-se eficientes para recuperação e contagem das mesmas, diferente do apresentado no presente trabalho. Na utilização do TT no protocolo "A", a dificuldade de leitura das placas residu no acúmulo de meio TT na placa e formação de uma "nuvem" sobre a superfície do Agar (Figura 1).



Figura 1. Placa com TT após incubação. Mancha escura central: colônias de salmonelas. Protocolo "A".

Historicamente, a enumeração de microrganismos tem sido feita através de dois processos principais: procedimentos quantitativos, como contagem direta em placas com o auxílio de microscópio eletrônico ou, semi-quantitativos com metodologias *standard*, como a contagem direta em placa, onde a enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC) é realizada a partir do ágar de cultura; ou metodologia para contagem por múltiplos tubos, estimando o número mais provável (NMP). Contagem direta de microrganismos tem sido considerada mais acurada, porém o tempo gasto para realização é longo. Procedimentos semi-quantitativos geralmente usam a enumeração de microrganismos viáveis, porém a margem de erro associada à estimativa numérica é ampla (4). A fim de minimizar os erros quanto à estimativa de UFCs, sendo este um fator limitante à escolha da metodologia, a contagem neste trabalho foi realizada a partir da metodologia descrita no Anexo IV da Instrução normativa Nº 62 (M), a qual descreve a utilização de uma duplicata de placas para cada diluição e os cálculos para cada situação apresentada. O número de colônias admitidas para a contagem das placas foi de 0 a 200 UFC. Outro fator limitante na execução das metodologias de contagem é o tempo gasto com os procedimentos, como já citado (4). O protocolo "B" testado mostrou-se eficiente para a contagem das salmonelas e menos laborioso que o protocolo "A", sendo que em vinte e quatro horas foi possível estabelecer contagem nas amostras. Após este estudo o protocolo "B" foi aplicado a 500 amostras de suabes cloacais de aves inoculadas e positivas para salmonelas, com idade entre um e 35 dias de idade. Nesta etapa, o ágar utilizado foi xilose lisina desoxicolato (XLD) (Figura 2). O número mínimo de células detectados com este protocolo foi de 10 UFC/ml.

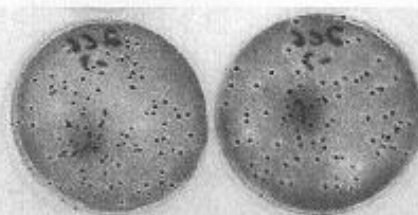


Figura 2. Placas de XLD, protocolo "B". Colônias de SE isoladas com centro negro.

Conclusões

O protocolo "B" mostrou-se eficiente para a contagem de salmonelas a partir de suabes de cloaca, com resultados de possíveis em vinte e quatro horas.

Bibliografia

- (1) Desmidt et al. 1998. *Veterinary Microbiology*, v.60, p.259-269.
- (2) MAPA. IN SAD Nº62 de 26 de agosto de 2003.
- (3) Siva, E.M. 2005. *Anais. Conferência APINCO*, v.2, p.229-237.
- (4) Whittmore, A.D. 1993. *Poultry Science*, v. 72, p. 2353-57.

3.2 Resumo 2

Excreção fecal de *Salmonella* Enteritidis e Heidelberg inoculadas em pintos de corte e avaliadas por de suabes de cloaca.

EXCREÇÃO FECAL DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS E HEIDELBERG INOCULADAS EM PINTINHOS DE CORTE E AVALIADA POR SUABES DE CLOACA.

*A Borsoi¹, E Santin², GS Diniz³, VP Nascimento¹

¹ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) - FAVET/UFRGS – Lab. Central - Porto Alegre (RS)

² Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia – Departamento de Veterinária – UFPR

³ Laboratório de Parasitologia – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - UEL

Introdução

A frequência e duração da colonização intestinal em lotes de aves são influenciadas pela idade, linhagem genética, estado imune das aves e pela dose de *Salmonella* à qual foram expostas (2). Nas pesquisas sobre excreção fecal de salmonelas, o diagnóstico através de suabe de cloaca é o método de eleição em aves desde o primeiro dia de vida. No Brasil este método é recomendado pelo Ministério da Agricultura para monitoramento de plantéis de matrizes (3). O presente trabalho iniciou estudos com o sorovar Heidelberg (SH) (reconhecida importância em poedeiras comerciais (2)) e sorovar Enteritidis (SE) na avaliação do comportamento da excreção fecal em pintinhos de corte.

Material e Métodos

Quatro grupos de sete aves foram designados para inoculação das doses 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 UFC (Unidade Formadora de Colônia)/ml de SH (SH 35 CDPA) e outros dois grupos de 7 aves para inoculação de 10^5 e 10^6 UFC/ml de SE ATCC 1980. Pintinhos livre de salmonelas de 1 dia de idade, identificados com anel numerado na asa, linhagem Ross, receberam o inóculo por via oral, individualmente. Suabes de cloaca foram coletados aos nos dias 1 a 5 pós-inoculação (pi) e processados conforme metodologia oficial para pesquisa de *Salmonella* (3). Outro grupo de 15 pintinhos identificados individualmente foi inoculado com 10^5 UFC/ml de SH e os suabes de cloaca foram coletados, individualmente, nos dias 18 a 21 pi, a cada 12 horas e o exame bacteriológico realizado conforme metodologia oficial (3). A confirmação das colônias suspeitas foi realizada por bioquímica e caracterização do gênero por biologia molecular no laboratório CDPA. Os experimentos in vivo foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia, UFPR.

Resultados e Discussão

Não foi possível a detecção de SH por suabe de cloacas nas aves inoculadas com doses 10^2 , 10^3 , 10^4 UFC/ml nos dias 1 a pi. Nas doses de 10^5 e 10^6 UFC/ml de SH foi possível a detecção por suabes de cloaca nos dias 1 a 5 pi. Para SE, os grupos com inoculação de 10^5 e 10^6 UFC/ml, não apresentaram excreção nos dias 1 e 2 pi, somente apresentaram positividade nos suabes de cloacas nos dias 3 a 5 pi (Tabela 1).

Tabela 1. Excreção de *S. Heidelberg* e *S. Enteritidis*.

<i>Salmonella</i> e dose UFC/ml	Dias pós-inoculação				
	1	2	3	4	5
<i>S. Heidelberg</i> 10^2	N	N	N	N	N
<i>S. Heidelberg</i> 10^3	N	N	N	N	N
<i>S. Heidelberg</i> 10^4	N	N	N	N	N
<i>S. Heidelberg</i> 10^5	P	P	P	P	P
<i>S. Heidelberg</i> 10^6	P	P	P	P	P
<i>S. Enteritidis</i> 10^5	N	P	P	P	P
<i>S. Enteritidis</i> 10^6	N	P	P	P	P

N: isolamento negativo; P: isolamento positivo.

Diferenças na excreção fecal podem ser influenciadas por fatores citados anteriormente, como a imunidade individual das aves e dentre os diferentes sorovares, a capacidade de adesão ao epitélio intestinal também é variável, uma vez que esta adesão parece envolver uma interação de elementos da superfície da bactéria (incluindo flagelos, fimbrias e lipopolissacarídeos) receptores da mucosa (2). Diferentes sorovares possuem distintas características de virulência, patogenicidade. Cepas de mesmo sorovar também podem apresentar variações devido ao número de passagens no hospedeiro e a pressão fenotípica e genotípica exercida.

Em todas as coletas de suabes de cloaca realizadas nas aves a cada 12 horas, dos 18 aos 21 dias pi, foi demonstrado que o número de aves positivas para SH variou ao longo das coletas e pelo menos em um dos momentos todas apresentaram excreção. O comportamento individual de excreção também variou num período de 12 horas (Figura 1).

Ave	dia 18pi	dia 19pi	dia 19pi	dia 20pi	dia 20pi	dia 21pi
21						
23						
26						
40						
30						
36						
25						
29						
24						
32						
28						
35						
22						
33						
37						

Figura 1. Quadro representando a intermitência na excreção de SH. Com excreção: cinza claro; Sem excreção: cinza escuro.

A intermitência de excreção de salmonelas foi citada como fato limitante na eficiência do suabe de cloaca para diagnóstico (1).

Conclusões

O momento de excreção de *Salmonella* em pintinhos mostrou diferenças entre os sorovares pesquisados. A intermitência de excreção do sorovar Heidelberg foi demonstrada em frangos de corte.

Bibliografia

- Andrade et al. 2007. Ciên. Anim. Bras., v.8, p. 757-765.
- Gast et al. 2005. Avian Disease, v.49, p.382-386.
- Brasil, 2003. Diário Oficial da União. 2003.

3.3 Artigo 1

Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation.

INOCULATION OF NEWLY HATCHED BROILER CHICKS WITH TWO BRAZILIAN ISOLATES OF *Salmonella* Heidelberg STRAINS WITH DIFFERENT VIRULENCE GENE PROFILE, ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS PATTERN TO INTESTINAL CHANGES EVALUATION.

A. Borsoi^{*1}, E. Santin[†], L. R. Santos[#], C. T. P. Salle^{*}, H. L. S. Moraes^{*} and V. P. Nascimento^{*}

^{*}Centre for Diagnostics and Research in Avian Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 8824, Agronomia - 91546-000 Porto Alegre, RS, Brazil;

[†]Laboratory of Microbiology and Avian Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná. Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba, PR, Brazil. Postal code: 80035-050.

[#]Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo. Campus I, Km 171 - BR 285, São José, Passo Fundo, RS, Brazil. Postal code: 99001-970;

Scientific Section:

*anderliseb@yahoo.com.br

ABSTRACT *Salmonella* Heidelberg is one of the three most frequently isolated serovars from human *Salmonella* cases in Canada, and the fourth most commonly reported *Salmonella* serovar in human foodborne disease cases in the United States. Since 1962, *Salmonella* Heidelberg has been isolated and reported in poultry and poultry products in Brazil. The poultry industry has focused efforts on reducing *Salmonellae* incidence in live production in an effort to reduce *Salmonella* in the processing plant. A better understanding of the initial infection in chicks could provide approaches to control *Salmonella* contamination. The objective of the present study was to evaluate two *Salmonella* Heidelberg strains that differed in the presence of virulence genes *invA*, *agfA* and *lpfA*, antimicrobial resistance profiles, and epidemiologic profiles on aspects of pathogenicity and intestinal morphology. Newly hatched broiler chicks were inoculated with two strains (SH23 and SH35) of *Salmonella* Heidelberg and cecal morphometry, histopathology, electron microscopy, and bacterial counts in the liver and cecum were assessed. The SH23 and SH35 strains resulted in different changes in villi height and crypt depth, and inflammatory cell infiltration in the cecum. The SH35 group had higher liver and cecum bacterial cell counts when compared to SH23 strains.

Keywords: *Salmonella* Heidelberg, broiler chicks, villi, crypt

INTRODUCTION

Salmonella enterica serovar Heidelberg is one of the top three serovars most frequently isolated from human *Salmonella* cases in Canada and the fourth most commonly *Salmonella* serovar reported in human foodborne disease cases in the United States. In human cases, eggs and poultry were identified as the major sources of this serovar. *Salmonella* Heidelberg appears to be more invasive in humans than other non-typhoidal serovars (Chittick *et al.* 2006; PHAC, 2006).

Salmonella Heidelberg has been isolated and reported from poultry and poultry products since 1962 in Brazil (Hofer *et al.* 1997). A study conducted in Southern Brazil in 1996 determined the prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses and parts of 15.1% and 26.1%, respectively. The Heidelberg serovar was isolated from 11% of the samples (Nascimento *et al.* 1996). In three different slaughterhouses in Southern Brazil, carcasses analyzed before and after chilling showed positive rates for *Salmonella* of 31.7% and 20%, respectively. In these carcasses, 63.9% of the *Salmonella* were identified as Heidelberg serovar (Dickel, 2004). Another study also conducted in the South of Brazil analyzed one hundred and eighty refrigerated carcasses, with 32% positive for Enteritidis and 9% for Heidelberg (Borsoi *et al.* 2006).

Due to carcass contamination, the poultry industry has focused on reducing the *Salmonellae* incidence in live production, in an effort to further reduce *Salmonella* in the processing plant. In live production, paratyphoid *Salmonellae* can cause clinical disease, which results in economic losses (Barrow, 1993). Bacterial enteritis in newly hatched chicks caused by *Salmonellae* can result in intestinal damage which is one of the principal factors that affects the development of the intestinal mucosa and this can result in reduced growth, reduced weight gain, poor feed conversion rates, and delayed maturation of the innate immune system (Ito *et al.* 2007). The objective of the present study was to evaluate the aspects of pathogenicity and intestinal morphology of two *Salmonella* Heidelberg strains that differed in virulence genes *invA*, *agfA* and *lpfA*, antimicrobial resistance profiles and epidemiologic profiles.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

The sixty five strains of *Salmonella* Heidelberg used in the genotyping assays in this study were isolated between 1995 and 2004 in Southern and Southeastern Brazil (Table 1). All strains were antigenically identified (Kaufmann-White system) by the Institute Oswaldo Cruz (FIOCRUZ- Rio de Janeiro- Brazil). *Salmonella* Enteritidis ATCC 1980 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as positive and negative PCR controls, respectively.

Antimicrobial susceptibility test

The antimicrobial susceptibility test was performed by the disk diffusion method on Müller-Hinton agar (Merck, Germany), described by Bauer *et al.* (1966). The antimicrobial agents used were amoxicillin (30µg), ampicillin (32µg), ceftiofur (8µg), ciprofloxacin (5µg), sulfadiazine (25µg), doxycycline (30µg), streptomycin (64µg), gentamicin (10µg), norfloxacin (10µg) and tetracycline (16µg) (Cecon, São Paulo, Brazil).

DNA extraction with thermal treatment

Bacterial strains were retrieved from frozen stock cultures and grown overnight at 37°C in brain heart infusion (BHI) broth (Difco, USA). One milliliter of bacterial culture was centrifuged at 12.000 x g for 2 min (5415C Microcentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany) and the supernatant was discarded. The pellet was suspended in 800µL of sterile distilled water and the resulting mixture was centrifuged at 12.000 x g for 2 min. The pellet was again suspended in 200µL of sterile distilled water. The sample was placed on a thermal block (Multi-Block Heater, Baxter, USA) at 95°C for 10 min. The mixture was centrifuged as described above and the supernatant was used as a template for PCR (Adapted from Guo *et al.* 2000).

Primers

The sets of primer pairs used in the PCR assay were: *invA* (284pb) F (forward) 5'gtgaaattatcgccacgttcgggcaa3' R (reverse) 5'tcatcgaccgtcaaaggaacc3' and *sefA* (488pb) F 5'gatactgctgaacgtagaagg3' R 5'gcgtaaatacaggatctgc agtagc3'(Oliveira *et al.* 2002), *lpfA* (250pb) F 5'ctttcgtgctgaatctggt 3' R 5'cagtgttaacagaaaccagt3'(Bäumler and Hefron, 1995), *agfA* (350pb) F 5'tccacaatggggcgggcg3' R 5'cctgacgcaccattacgctg3'(Collinson *et al.* 1992). Primers were obtained from Invitrogen Custom Primers, São Paulo, Brazil. Access numbers for the sequence data are respectively: M90846, L11008, U18599, and U43280.

PCR assay

PCR amplifications were performed in a final volume of 25 μL with 2 μL or 5 μL DNA template. For duplex detection of *invA* and *sefA*, the PCR reaction contained 5 μL of DNA template, 12.5 μL of reaction buffer mix 10X (10 mM Tris-HCl pH 9.0; 50 mM KCl), 2.0 μL of dNTP mix (250 mM) and 3.0mM of MgCl_2 , 1.75U of *taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 0.05 μL of each primer (20 pmol). The cycling program was set in a Perkin Elmer Gen Amp PCR System 2400 thermocycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA). Samples were denatured at 94 °C for 5 min. Thirty-five cycles of amplification were run for 1 s at 94 °C, 1 s at 55 °C, and 21 s at 74 °C, with the final extension at 72°C for 7 min. Electrophoresis through 1.2% agarose gel (with the addition of 20% of ethidium bromide) was performed on ten microliter aliquots of the reaction mixtures, with a 100pb DNA ladder (Cenbiot, Brazil), as a molecular weight marker. Fragments were trans-illuminated with UV light. For the *lpfA* gene, 2 μL of DNA template, 2,5 μL reaction buffer 10X (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl), 2,0 μL of dNTP mix (250 mM) and 2,0mM of MgCl_2 , 1U of *taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 1.0 μL of each primer (20 pmol). The assay was run under the same conditions as described above. For the *agfA* PCR, the annealing temperature was 58°C, and all the other assay conditions were exactly the same as for the *lpfA*.

PFGE assay

PFGE was performed according to the US PulseNet protocol (CDC, 2000). Chromosomal DNA was digested with 30 U of *Xba*I (Amersham Bioscience, USA), according to the instructions of the manufacturer. Restriction DNA fragments were separated using the CHEF DRIII (Bio-Rad, Hercules, CA). Electrophoresis was conducted for 18 hours (initial switch time: 2.20s; final switch time: 54.2s) at 6V/cm and 13°C in 0,5X TBE buffer. PFGE profiles were visually compared and strains grouped by genetic profiles. Gels were stained with 1 mg of ethidium bromide ml^{-1} , trans-illuminated with UV light and the images were digitally captured using a KODAK EDAS120 system (Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.). Profile correlations were evaluated with Restriction fragment migration profiles and compared by using the Bionumerics program (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Chicks

For the *in vivo* assays, 168 newly hatched commercial Ross chicks were used, obtained from a Brazilian Poultry Company. All chicks were *Salmonella* free, hatched from breeders unvaccinated against *Salmonellae* and were housed in battery cages. Water and feed free

from antibiotics and animal protein were offered *ad libitum* and the environmental temperature was set to provide physiological comfort.

Bacteria preparation to inoculation

Two strains of *Salmonella* Heidelberg (SH 23 and SH35) were selected among the 65 strains previously analyzed by PCR and PFGE (Table 1). The two samples were isolated from broiler carcasses in Southern Brazil, in 1996 and 1995, respectively. The organisms were retrieved from frozen cultures and cultured overnight at 37°C in Brain Heart Infusion broth (BHI; Merck, Germany). The culture was then streaked on Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD, Difco, UK) and incubated at 37°C for 24 hours. Five colony forming unit (CFU) was selected and transferred to BHI broth and incubated at 37°C for 24 hours. The CFU were determined by ten-fold dilutions in Buffered Peptone Water 0.1% (BPW, Oxoid, UK) and streaked on XLD agar. The 10⁸ CFU/mL suspension was selected for inoculation.

Experimental design with birds

One hundred and sixty-eight broiler chicks were divided in three groups identified as Control, SH23 and SH35. Two groups were inoculated orally with 1mL containing 10⁸ CFU/mL of SH23 and SH35, respectively, while the control group was inoculated with a saline solution. Eight chicks per group were killed by cervical dislocation at 6, 12, 18, 24, 36, 48 and 72 hours post-inoculation (pi). At necropsy, the cecum and the liver were collected for bacteriological counting of *Salmonella*. Cecum samples were collected three centimeters from the colon for histological evaluation by scanning electron microscopy. The trial was conducted with the approval and according to the recommendations of the Ethics committee of the School of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Brazil.

Bacterial isolation

Two organ pools (one pool containing liver samples and another containing cecum samples) from four birds per group were homogenized in BPW 2% (ten times the volume of organs the weight). BPW cultures were diluted ten-fold in BPW 0.1% up to 10⁻³ and then streaked in duplicate on XLD agar plates, incubated for 24 hours at 37°C and then submitted to CFU counting (adapted from Desmidt et al. 1998). All the organs samples were also incubated for 16-18 hours at 37°C. 100µL from each BPW were inoculated in 10mL of Rappaport Vassiliadis (RV) (Merck, Germany) and maintained at 42°C for 24 hours. The RV samples were streaked on XLD (24 hours at 37°C). The *Salmonella* CFU were counted and the results expressed according to the Plate Count Proceedings recommended by the Normative

Instruction N°6 from the Brazilian Ministry of Livestock and Food Supply (MAPA, 2003). One typical colony per plate was biochemically and antigenically screened to confirm *Salmonella* identification.

Histological examination, Intestinal morphology and Electron microscopy

Cecum samples were fixed in a 4% phosphate-buffered formaldehyde solution, paraffin-embedded, and 5µm sections were stained with hematoxylin and eosin (HE). The samples were analyzed for the presence of inflammatory cell infiltration and for intestinal morphology. Microscopic fields with presence of inflammatory cell infiltration were quantified with an Olympus BX41 microscope with a magnification 40X (Olympus America INC., NY, USA).

Villus height and crypt depth were measured in the cecum samples processed for histological examination. Villus height was measured from the tip of the villus to the valley between individual villi, and crypt depth measurements were taken from the valley between individual villi to the baso-lateral membrane. Fifty villi and 50 crypts were measured per group at each sampling date, with a total of 350 villi and crypts measured per group (Thompson and Applegate, 2006). The morphometric study was carried out using an image-analyzing system (Motic Images Plus 2.0-Motic China Group Co.2006), coupled to a microscope (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA).

The cecal sections were submitted to scanning electron microscopy analysis. These sections were processed as described by Maiorka et al. (2003).

Statistical analysis

Data were submitted to variance analysis using StatView SAS software (1992-98-SAS Institute Inc. USA), and the means were compared by using the Tukey's t test at a 5% significance level ($P < 0.05$).

RESULTS

Samples of Salmonella Heidelberg and PCR, PFGE and antimicrobial resistance profiles

Sixty five *Salmonella* Heidelberg samples were submitted to PCR and PFGE assays to identify the differences between these strains. Figure 1 shows four PFGE patterns from these samples. Among the patterns, A1 and A3 had one additional band when compared to A2 and A4 patterns, and among the four patterns, each one had at least one different band size. The two strains selected for inoculation belonged to the A1 and A4 patterns. Table 1 shows the profiles of the genes (*invA*, *agfA* and *lpfA*) and the antimicrobial resistance patterns of these

samples. In the present work only 5 isolates (SH 15, 23, 28, 35 and 64) out of 65 isolates tested were resistant to ceftiofur, found in samples taken from the carcasses, cloacal swabs, and drag swabs. According to the PCR results, 3 samples expressed the *invA* and *lpfA* genes and 62 samples expressed the *invA*, *agfA* and *lpfA* genes. The strains SH23 and SH35 were different, according to the PFGE patterns and gene profiles. The *agfA* gene was present in sample SH35, but absent in the sample SH23. All SH samples were negative for the *sefA* gene, and the *Salmonella* Enteritidis used as a control was positive.

***Salmonella* Heidelberg quantification in tissues and intestinal villi height and crypt depth**
Quantification of *Salmonella* per gram of cecum and liver; villus height, crypt depth, and villus height to crypt depth ratio were analyzed in seven occasions during the 72 hours post-inoculation period for two different *Salmonella* Heidelberg strains (SH23 and SH35), selected by molecular assays. The control group was not infected by *Salmonella*. From 6 hours post-infection on, both strains were present in cecum and liver samples.

The SH35 strain resulted in higher counts (CFU/g) at 12 hours post-infection in the cecum, and at 36 hours post-infection in the liver (Table 2), when compared to the SH23 strain. The overall count of CFU per gram of tissue in these seven periods was higher for the SH35 strain in the cecum and the liver than for the SH23 strain (cecum means for SH23 and SH35 were 3.11 and 3.35 \log_{10} and liver means were 1.13 and 1.26 \log_{10} , respectively).

The cecal villi height and crypt depth are presented in Tables 3 and 4 in chicks challenged with SH 23 and SH 35. The effects of these challenges on villus height are present in Table 3. At 6 h post inoculation the villus height was significantly decreased in the SH35 challenged birds compared to the control group, and the SH23 challenged birds were intermediate. At 12 h post inoculation there was no significant difference between the villus heights of the challenged birds compared to the control. At 18 h post inoculation the SH23 challenged birds had significantly decreased villus height compared to the controls and the SH35 challenged birds. At 24 h post challenge the villus height was significantly higher from the control group in both SH23 and SH35 challenged birds, and the SH35 challenged birds had villus heights that were significantly higher than the SH23 challenged birds. Again, at 36 h post challenge the SH23 and SH35 villi were higher than the control group, however, at this time period the SH23 challenged birds had the highest villus height compared to both the control and the SH35 challenged birds. At 48 and 72 h post challenge

the villus height was significantly higher in the SH35 challenged birds compared to both the controls and the SH23 challenged birds.

The effect of these treatments on the ratio of villus height to crypt depth is presented in Table 4. There was no significant effect in the challenged birds compared to the control birds on the villus height to crypt depth ratio at 6, 12, or 72 h post challenge. At 18 h post challenge the villus height to crypt depth ratio was significantly decreased in the SH23 challenged birds compared to both the control and SH35 challenged birds. At 24 h post challenge the villus height to crypt depth ratio was significantly higher in both the SH23 and SH35 challenged birds compared to the control values, but not significantly different from each other. At 36 h post challenge the SH23 challenged birds had a significantly higher villus height to crypt depth ratio compared to both the control and SH35 challenged birds. At 48 h post challenge the SH35 challenged birds had a significantly higher villus to crypt depth ratio compared to both the control and SH23 challenged birds.

Histopathological analyses and scanning electron microscopy

From the cecum preparations for histopathology used to measure morphometric data, 280 microscopy fields per group (40 fields were analyzed each time from 6 h to 72 h post inoculation in each group) were analyzed and those with inflammatory cell infiltration were quantified (Table 5). The number of fields with inflammatory cell infiltration of the basal lamina of the cecum was higher in birds inoculated with SH35 when compared to SH23-inoculated birds and control group when analyzed 6h to 72 hours post-inoculation (Table 5). Figure 2 show the histopathological microscopy observation of the cecum of 72 hours old control group chicks (A) and 72 hours old *S. Heidelberg* 35 group infected chicks (B), exemplifying inflammatory cells infiltration in the lamina propria. The Figure 3 depicts the scanning electron microscopic image of the intestinal mucosa of non-infected birds (A), and of birds infected with *Salmonella Heidelberg* 35 (B), showing areas of cellular extrusion.

DISCUSSION

In the present work, the 5 SH resistant strains to ceftiofur were obtained from a variety of samples sites that include carcass, drag swabs, and cecal swabs demonstrates that its use in broiler production may cause resistance in salmonellae present on the carcass with consequent risks to consumers. According to Shea (2004) ceftiofur resistance among *Salmonella Heidelberg* isolates is highly correlated with resistance to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, and cefoxitin (A2C-AMP resistance pattern). It is also associated with

reduced susceptibility (intermediate resistance) to ceftriaxone, another third generation cephalosporin used exclusively in humans, being the drug of choice for the treatment of extra-intestinal salmonellosis in children and pregnant women. Hence, patients with extra-intestinal infection caused by *Salmonella* Heidelberg strains with intermediate resistance to ceftriaxone are at risk of ceftriaxone therapy failure (PHAC, 2006).

Despite the different sources, regions and years of isolation of the 65 *Salmonella* Heidelberg (SH) strains in the present study, only four PFGE patterns were generated with XbaI enzyme. The NotI enzyme was also tested (data not shown) in these samples, but it was ineffective for differentiating these strains. The four types obtained were indistinguishable according to the categories of genetic and epidemiologic relatedness described by Tenover et al. (1995). In SH isolated from outbreaks in Canada, XbaI was used and also generate different PFGE patterns for this serovar (Demczuk et al. 2003). Amavisit et al. (2001) analyzed 28 SH samples from equines using the enzymes XbaI and BlnI, and were able to generate 6 and 5 digestion patterns, respectively. The selected genes are fimbrial, and they play an important role in bacterial pathogenicity, as they promote bacterial attachment to intestinal epithelial cells (Van der Velden et al. 1998). InvA is required for *Salmonella* to enter the host's body via the gut epithelium and the lpfA gene encodes the major subunit of the long polar fimbriae, which mediate adhesion to the cells of the Peyer's patches in a mouse model. (Darwin and Miller, 1999; Ginocchio and Galan, 1995). Thin aggregative fimbriae (Tafi) were identified in *Salmonella* Enteritidis, while its operon was termed agf, and the agfA gene encodes the major subunit. Tafi is essential for the synthesis of extracellular matrix, which is involved in multicellular aggregation, pellicle formation, biofilm formation, and environmental persistence. Tafi also has pathogenesis-related properties, in that it binds fibronectin, is pro-inflammatory, and enhances adherence and invasion of eukaryotic cells (Gibson et al. 2007). The PCR tests in this study show two different profiles for the selected virulence genes, and this was helpful to differentiate the two strains for challenge.

Disease and mortality caused by *Salmonella* Heidelberg in broiler chicks were studied by Roy et al. (2001), who used four isolates from different sources, and reported different lesion patterns caused by each strain. No molecular techniques were used to assess the strains, and the intestinal integrity was not evaluated. Our study focused on intestinal changes that were caused by challenge with *Salmonella* Heidelberg due the fact that infections of the intestinal mucosa with enteric pathogens is one of the principal factors that can affect the development

of the intestinal mucosa of the newborn, this can reduce growth, reduce weight gain, increase feed conversion, and delay the maturation of the innate immune system (Ito et al. 2007).

In the present study, the oral inoculation of broiler chicks with two *Salmonella* Heidelberg strains (SH23 and SH35) resulted in colonization of the cecum and translocation to the liver starting at 6 hours post-inoculation (pi). This also occurred with *Salmonella* Hadar, described by Desmidt et al (1998), where the cell count in the cecum was low after 3 h post-inoculation, but present in the liver from 6 h post-inoculation. Also in the present work, the strain SH23 resulted in lower cell counts in the liver and cecum, when compared to the SH35 strain (Table 2) and it may reflect the differences the virulence genes profile and PFGE pattern. The present study was not able to correlate the infection level in the cecum with the one in the liver, probably because *Salmonella* colonization of the cecum and liver is mediated by different virulence systems. The *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) system enables these bacteria to invade non-phagocytic cells, and is necessary for adhesion and triggering invasion and penetration of the gastrointestinal epithelium, while the SPI2 system is required for systemic spread and the colonization of host organs (Hensel, 2000; Marcus et al. 2000; Hansel-Wester and Hensel, 2001; Portillo, 2001; Wigley et al. 2002).

All three groups in this work, showed a gradual increase in villus height (VH) during the first 72 hours of life, in agreement with the estimated turnover time for intestinal cells, ranging from 90 to 96 hours (Maiorka, 2004).

According to Nabuurs (1995), under optimal circumstances, intestinal villi should be high and crypts should be shallow, resulting in a high villus height to crypt depth (VH:CD) ratio. Reductions in VH and CD can occur due to intestinal pathogen challenge and also are seen after feed withdrawal (Thompson and Applegate, 2006), and when some feed additives are fed during growout (Hancock et al. 1990; Friesen et al. 1993; Pelicano et al. 2007). Such changes were attributed to reduced cell migration and proliferation rates, along with increased rates of cell loss and programmed cell death, or apoptosis (Ferraris and Carey, 2000).

In the present study the SH23 or SH35 groups had the same VH or higher VH than the control group. The high VH:CD ratio was found in both of SH treatments, except at 18 h pi, when the VH:CD ratio to control group was high than the SH23 group, but did not differ from SH35 group.

These high VH and VH:CD values caused by SH infection may be explained by the high numbers of immature cells in the crypt due to the fast turnover rate. This fact also was observed by Dowling (1992) when intestinal pathogens action was studied. Intestinal hyperplasia occurred, resulting in higher villi height due to the increased production of cells both in the villus and in the crypt.

The strain SH35 resulted in the highest VH value in 24 h, 48 h and 72 h pi. These high VH values may have occurred not only because of increased number of absorptive cells, but also due to the infiltration by inflammatory cells induced by this strain as shown in the histological analyses (Table 5 and Figure 3).

The *agfA* gene presented in the SH35 could have contributed to the infiltration by inflammatory cells, as it has inflammatory properties, which could probably be confirmed comparing an *agfA* gene deletion strain against the original strain.

In the present study, the *Salmonella* Heidelberg isolates from different sources in Brazil showed different virulence genes profile, antimicrobial resistance and PFGE patterns. The strains SH23 and SH35 resulted in different effects on the gut when chicks were inoculated; also both strains had different cell counts in the cecum and liver. The intestinal changes resulting from *Salmonella* Heidelberg infection in chicks affect the normal intestinal physiology and may cause damage to the chick's health and performance.

REFERENCES

- Amavisit, P., Markham, P.F., Lightfoot, D., Whithear, K.G. and G.F, Browning. 2001. Molecular epidemiology of *Salmonella* Heidelberg in a equine hospital. *Vet. Microbiol.* 80:85-98.
- Barrow, P.A. 1993. *Salmonella* control – past, present and future. *Avian Pathol.* 22:651-669.
- Bauer A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J. C. and M. Turk. 1966. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45:493-496.
- Bäumler, A.J. and Heffron, F. 1995. Identification and sequence analyses of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.* 177:2087-2097.
- Borsoi, A., Moraes, H.S, Salle, C.T.P., Bettiol, G. and V.P. Nascimento. 2006. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frango resfriadas e swabs de arrasto. *Rev. Bras. Cien. Avic.,* 8:229-229.
- CDC- Centers for disease control. 2000. One-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). In PulseNet: The national molecular subtyping network for foodborne disease surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control. Section, 5(11), 1-14.
- Chittick, P., Sulka, A., Tauxe, R.V. and A.M. Fry. 2006. A summary of National Reports of foodborn outbreaks of salmonella Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. *J. Food Protec.* 69:5:1150-1153.
- Collinson, S.K., Emody, L., Trust, T.J. and W.W. Kay. 1992. Thin aggregative fimbriae from diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174:4490-4495.
- Darwin, K.H. and V.L. Miller. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* 405-428.
- Demezuk, W., Soule, G., Clark, C., Ackermann, H-W., Easy, R., Khakria, R., Rodgers, F. and R. Ahmaed. 2003. Phage-based typing scheme for *Salmonella* enteric Serovar Heidelberg, a causative agent of food poisonings in Canada. *J. Clin. Microbiol.* 4279-4284.
- Desmidt, M; Ducatelle, R. and F. Haesebrouck. 1998. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* Hadar in chickens. *Vet. Microbiol.* 60:259-269.
- Dickel, E.L. 2004. Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate. Tese de Doutorado, UFRGS, Faculdade de Veterinária, 137p.
- Dowling, R.H. 1992. Cellular and molecular basis of intestinal and pancreatic adaptation. *Scan. J. Gastroenterol.* 27: 64-67.

- Ferraris, R.P. and H.V. Carey. 2000. Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Ann. Rev. Nutr.* 20:195-219.
- Friesen, K.G., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., Blecha, F., Reddy, D.N., Reddy, P.G. and L.J. Kats. 1993. *J. Anim. Sci.* 71:2089-2098.
- Gibson, D.L., White, Rajote, A.P. and W.W. Kay. 2007. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiol.* 153:1131-140.
- Ginocchio, C.C. and J.E. Gálan. 1995. Functional Conservation among Members of the *Salmonella* Typhimurium InvA family of proteins. *Infect. Immun.* 729-732.
- Guo, X., Chen, J., Beuchat, L.R. and R.E. Brackett. 2000. PCR detection of *Salmonella* enteric serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from H1A. *App. Environm. Microbiol.* 5248-5252.
- Hancock, J.D., Peo, E.R.Jr., Lewis, A.J. and P.A. Moxley. 1990. Effects of ethanol extraction and heat treatment of soybean flakes on function and morphology of pig intestine. *J. Anim. Sci.* 68:3244-3251.
- Hansen-Wester, I. and M. Hensel. 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbiol. Infect.* 3:549-559.
- Hensel, M. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36:5:1015-1023.
- Hofer, E., Filho, S.J.S. and E.M.F. Reis. 1997. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 55-62.
- Ito, N.M.K., Miyaji, C.L and S.M. Okabayashi. 2007. Saúde intestinal em frangos de corte. Circular Técnica Aviagem do Brasil. URL<http://www.agroceresross.com.br/images/noticias/384CircularTecnicaAviagen_200711.pdf> Accessed May 2008.
- Maiorka, A. 2004. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. *Anais do V Simpósio Brasil Sul de Avicultura*. Chapecó Santa Catarina, Brasil, 26-41.
- Maiorka, A., Santin, E., Dahlke, F., Boleli, I.C., Furlan, R.L. and M. Macari. 2003. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. *J. Appl. Poult. Res.* 12:483-492.
- MAPA (Ministério da Agricultura , Abastecimento e Pecuária). (2003). Diário Oficial da União. Instrução Normativa, SDA Nº 62, de 26 de agosto de 2003.
- Marcus, S.L., Brunel, J.H., Pfeifer, C.G. and B.B. Finlay. 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microb. Infect.* 2:145-156.

- Nabuurs, M.J. 1995. Microbiological, structural and functional changes of the small intestine of pigs at weaning. *Pig News Inform.* 16:3:93-97.
- Nascimento, V.P., Santos, L.R. and M.O.Cardoso. 1996. Qualidade microbiológica dos produtos avícolas. II Simpósio Goiano de Avicultura da Associação Goiana de Avicultura e Escola de Veterinária de UFG, 13-17.
- Oliveira, S.D., Santos, L.R., Schuch, D.M.T., Silva, A.B., Salle, C.T.P. and C.W. Canal. 2002. Detection and identification of *Salmonella* from poultry related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87:25-35.
- Pelicano, E.R.L., Souza, P.A., Souza, H.B.A., Figueiredo, D.F. and C.M.C. Amaral. 2007. Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broilers fed different additives. *Braz. J. Poult.Sci.* 9:3:173-180.
- PHAC (Public Health Agency of Canada). 2006. *Salmonella* Heidelberg - Ceftiofur-related resistance in human and retail chicken isolates. URL<[http:// www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/pdf/heidelberg_e.pdf](http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/pdf/heidelberg_e.pdf)>. Accessed Jan. 2008.
- Portillo, F.G. 2001. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Micr. Infect.* 1305-1311.
- Roy, P., Dhillon, A.S., Shivaprasad, H.L., Schaberg, D.M., Bandli, D. and S. Johnson. 2001. Pathogenicity of different serogroups of avian *Salmonellae* in specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.*45:922-937
- Shea, K.M. 2004. Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics. *Pediatrics*, 114:862-868.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. and B. Swanminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed Field Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 2233-2239.
- Thompson, K.L. and T.J. Applegate. 2006. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broiler. *Poult. Sci.* 85:1535-1540.
- Van der Velden, A.W.M., Bäumlér, A.J., Tsois, R.M. and F. Hefron. 1998. Multiple fimbrial adhesions are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice. *Infect Immun.* 66:2803-2808.
- Wigley, P., Hulme, S.D., Bumstead, N. and P.A. Barrow. 2002. In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the *SAL1* locus. *Micr. Infect.*4:1111-1120

TABLES

Table 1. Sixty-five *Salmonella* Heidelberg (SH) samples and the sources, isolation year, antimicrobial profile, PFGE patterns and gene profile.

Sample (SH)	Source	Isolation Year	PFGE Pattern	Antimicrobial Profile	Gene Profile
1	Cloacal swab	2003	A1	DOX	<i>invA, agfA, lpfA</i>
2	Broiler carcass	2003	A1	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
3	Broiler carcass	2003	A1	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
4	Cloacal swab	2003	A1	DOX	<i>invA, agfA, lpfA</i>
11	Broiler carcass	2003	A1	DOX	<i>invA, agfA, lpfA</i>
15	Broiler carcass	1995	A1	CEF, DOX, STR	<i>invA, agfA, lpfA</i>
16	Broiler carcass	1995	A1	TET	<i>invA, agfA, lpfA</i>
17	Broiler carcass	1995	A1	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
19	Broiler carcass	1995	A1	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
21	Broiler carcass	1995	A1	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
27	Cloacal swab	2005	A1	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
28	Cloacal swab	2005	A1	CEF, DOX	<i>invA, agfA, lpfA</i>
31	Broiler carcass	1995	A1	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
32	Broiler carcass	1995	A1	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
33	Broiler carcass	1995	A1	EST	<i>invA, agfA, lpfA</i>
34	Broiler carcass	1995	A1	DOX, STR, TET	<i>invA, agfA, lpfA</i>
65	Broiler carcass	2006	A1	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
23	Broiler carcass	1996	A1	CEF	<i>invA, lpfA</i>
6	Broiler carcass	2003	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
7	Broiler carcass	2003	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
8	Broiler carcass	2003	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
9	Broiler carcass	2003	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
10	Broiler carcass	2003	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
12	Broiler carcass	2003	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
13	Broiler carcass	2003	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
14	Broiler carcass	2003	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
18	Broiler carcass	1995	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
20	Broiler carcass	1995	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
22	Broiler carcass	1995	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
24	Broiler carcass	1995	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
25	Broiler carcass	2004	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
26	Broiler carcass	2004	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
29	Broiler carcass	1995	A2	DOX	<i>invA, agfA, lpfA</i>
36	Broiler carcass	1995	A2	AMO, STR	<i>invA, agfA, lpfA</i>
37	Broiler carcass	1995	A2	-	<i>invA, lpfA</i>
38	Cloacal swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
39	Cloacal swab	2006	A2	AMO, AMP	<i>invA, agfA, lpfA</i>
40	Drag swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
41	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, lpfA</i>
42	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
43	Drag swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
44	Cloacal swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
45	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
47	Cloacal swab	2006	A2	AMO, AMP, CEF	<i>invA, agfA, lpfA</i>
48	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
49	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
50	Cloacal swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
51	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
52	Drag swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
53	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
54	Broiler carcass	2006	A2	TET	<i>invA, agfA, lpfA</i>
55	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
56	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
57	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
58	Cloacal swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
59	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
60	Cloacal swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
61	Broiler carcass	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
62	Cloacal swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
63	Cloacal swab	2006	A2	-	<i>invA, agfA, lpfA</i>
64	Drag swab	2006	A2	CEF	<i>invA, agfA, lpfA</i>
46	Drag swab	2006	A3	AMP, CEF	<i>invA, agfA, lpfA</i>
5	Broiler carcass	2003	A3	DOX	<i>invA, agfA, lpfA</i>
30	Broiler carcass	1995	A4	DOX	<i>invA, agfA, lpfA</i>
35	Broiler carcass	1995	A4	CEF, DOX	<i>invA, agfA, lpfA</i>

Dox: doxycycline, STR: streptomycin, TET: tetracycline CEF: ceftiofur AMO: amoxicillin AMP: ampicillin -: no resistance found.

Table 2. Number of *Salmonella* (*S*) Heidelberg (23 and 35) per gram of caeca and liver tissue. Original count transformed into log₁₀. Data are means for eight animals collected in each period.

Period post - inoculation	Control	<i>S</i> .Heidelberg 23	<i>S</i> .Heidelberg 35	Control liver	<i>S</i> .Heidelberg 23	<i>S</i> .Heidelberg 35
	caeca	caeca	caeca		liver	liver
	CFU/g	CFU/g log ₁₀	CFU/g log ₁₀	CFU/g	CFU/g log ₁₀	CFU/g log ₁₀
0h	-	-	-	-	-	-
6h	-	2.80 ± 2.98	3.11 ± 2.32	-	0.69 ± 0.00	2.69 ± 2.81
12h	-	3.12 ± 0.02 ^{b*}	4.70 ± 0.03 ^a	-	0.69 ± 0.00	0.69 ± 0.00
18h	-	2.65 ± 2.76	2.72 ± 2.85	-	2.38 ± 2.39	1.04 ± 0.49
24h	-	2.19 ± 2.12	2.38 ± 2.39	-	1.04 ± 0.49	0.69 ± 0.00
36h	-	3.85 ± 0.19	2.32 ± 2.29	-	0.69 ± 0.00 ^b	1.00 ± 0.00 ^a
48h	-	2.58 ± 2.24	3.96 ± 0.70	-	1.67 ± 1.38	1.45 ± 1.06
72h	-	4.48 ± 0.23	4.37 ± 0.36	-	0.69 ± 0.00	1.08 ± 0.55

CFU/g: Colony Forming Units per gram. *Different letters in the same line, differ by Tukey test with 95% level of confidence (p<0.05)

Table 3. Cecal villi height (μm) in different periods post-inoculation (pi) of two strains of *Salmonella* (S) Heidelberg (23 and 35) in chicks with 0 to 3 days old.

Period post - inoculation	Control Villi height	S.Heidelberg 23 Villi height	S.Heidelberg 35 Villi height
6h	209.44 \pm 52.64 ^{a*}	197.27 \pm 27.69 ^{ab}	192.98 \pm 43.24 ^b
12h	206.50 \pm 45.18 ^{ab}	199.65 \pm 52.52 ^b	222.64 \pm 41.76 ^a
18h	220.00 \pm 57.64 ^a	181.11 \pm 61.96 ^b	225.60 \pm 57.83 ^a
24h	192.01 \pm 36.45 ^c	231.29 \pm 37.49 ^b	247.05 \pm 41.85 ^a
36h	212.17 \pm 40.78 ^c	275.88 \pm 48.55 ^a	248.37 \pm 39.00 ^b
48h	251.66 \pm 84.12 ^b	229.16 \pm 70.70 ^b	290.00 \pm 62.49 ^a
72h	329.48 \pm 45.35 ^b	313.05 \pm 44.71 ^b	346.71 \pm 43.49 ^a

* Different letters in the same line, differ by Tukey test with 95% level of confidence ($p < 0.05$)

Table 4. Cecal villus height : crypt depth ratio (μm) in different periods post-inoculation (pi) of two strains of *Salmonella* (*S*) Heidelberg (23 and 35) in chicks with 0 to 3 days old.

Period post – inoculation	Control Villus:crypt	<i>S</i> .Heidelberg 23 Villus:crypt	<i>S</i> .Heidelberg 35 Villus:crypt
6h	5.21 \pm 2.28	5.07 \pm 1.83	5.09 \pm 1.56
12h	6.59 \pm 9.44	4.65 \pm 1.43	5.21 \pm 1.87
18h	5.37 \pm 1.72 ^{a*}	4.31 \pm 2.30 ^b	5.21 \pm 1.70 ^a
24h	4.53 \pm 1.12 ^b	5.75 \pm 1.91 ^a	6.03 \pm 1.67 ^a
36h	4.55 \pm 1.33 ^b	7.57 \pm 4.65 ^a	5.68 \pm 1.58 ^b
48h	5.75 \pm 2.10 ^b	5.63 \pm 2.10 ^b	6.96 \pm 2.49 ^a
72h	7.62 \pm 2.36	6.70 \pm 2.82	7.14 \pm 2.20

* Different letters in the same line. differ by Tukey test with 95% level of confidence ($p < 0.05$)

Table 5 Microscopic fields with inflammatory cell infiltration from histopathological analyses in the cecum from 6 h to 72 h post-infection. Chicks inoculated with 10^8 CFU/mL of *Salmonella* (S) Heidelberg and control group without inoculation. (40 fields were observed each time from 6 h to 72 h post inoculation to each group).

Group	Fields* with inflammatory cell infiltration in the cecum (%)
Controle	52/280 (18.5) ^c
S. Heidelberg 23	138/280 (49.3) ^b
S. Heidelberg 35	167/280 (59.6) ^a

*Different letters in the column mean difference with T test. Microscopic quarters analyzed in 40X. Olympus BX41 microscope. Olympus America INC. NY. USA.

FIGURES



Figure 1. Dendrogram of *Salmonella* Heidelberg (SH) with four patterns generated by PFGE using the restriction enzyme *Xba*I.

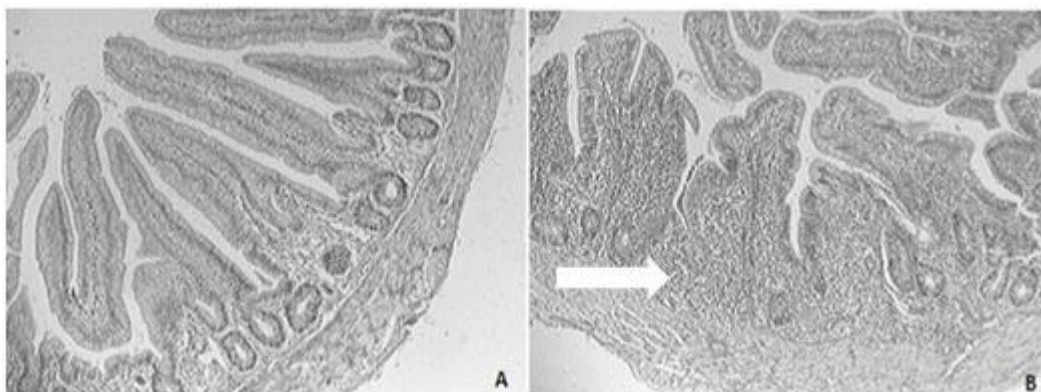


Figure 2. A: Histopathological microscopy of the cecum of 72 hours old control group chicks (HE 40X). B: Histopathological microscopy of the cecum of 72 hours old *S. Heidelberg* 35 group infected chicks (HE 40X), presenting inflammatory cells infiltration in the lamina propria (arrow).

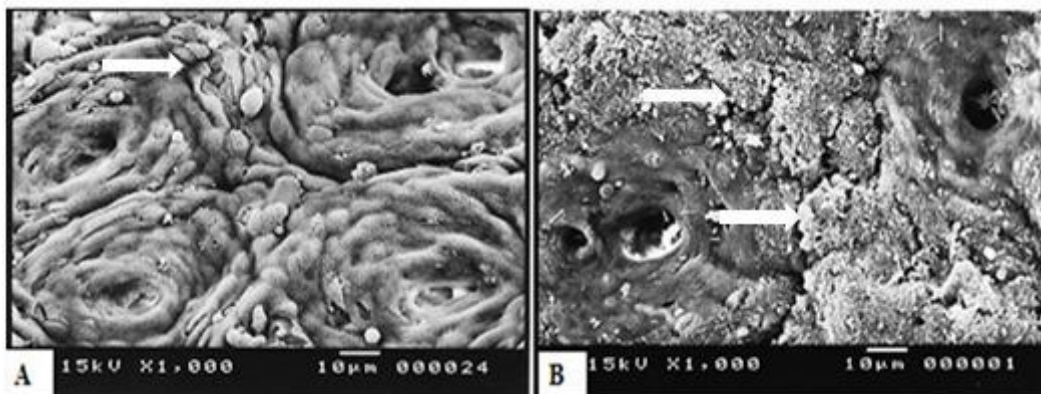


Figure 3. A: Scanning photomicroscopy of the cecum of 3 days old control group chicks (X1000) (arrow) presenting surface with very few areas of cellular extrusion. B: Scanning photomicroscopy of the cecum of 3 days old *S. Heidelberg* 35 group chicks infected (X1000), showing surface with large areas of cellular extrusion (arrows).

3.4 Artigo 2

Mixture of organic acids and essential oils as an alternative for controlling the fecal excretion of *Salmonella* in broiler chickens.

Mixture of Organic Acids and Essential Oils as an Alternative for Controlling the Fecal Excretion of *Salmonella* in Broiler Chickens

A. Borsoi^{*1}, E. Santin[†], L. R. Santos[#], G.S. Diniz[§], C. T. P. Salle^{*}, H. L. S. Moraes^{*} and V. P. Nascimento^{*}

^{*}Centre for Diagnostics and Research in Avian Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 8824, Agronomia - 91546-000 Porto Alegre, RS, Brazil;

[†]Laboratory of Microbiology and Avian Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná. Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba, PR, Brazil. Postal code: 80035-050.

[#]Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo. Campus I, Km 171 - BR 285, São José, Passo Fundo, RS, Brazil. Postal code: 99001-970;

[§]Laboratory of Parasitary Disease, Londrina State University. Mail box 6001, Londrina, Paraná, Brazil. Postal code 86051-970.

Scientific Section: Products

¹ anderliseb@yahoo.com.br

ABSTRACT Avian salmonellosis, when not caused by *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum*, is named paratyphoid infection, and may be caused by different *Salmonella* serovars. This disease has an important economic impact as it may affect animal performance and cause morbidity and mortality in younger birds. In addition, paratyphoid salmonellosis may result in foodborne disease in humans, due to its ability to colonize the alimentary tract of chickens, resulting in carcass contamination. Regarding the control of *Salmonella*, it is possible to decrease its fecal excretion and the contamination of chicken carcasses and eggs by adding organic acids to the feed or drinking water at appropriate times. The aim of this study was to test a mixture of organic acids and essential oils in broilers orally challenged with *Salmonella* Enteritidis, and to verify its efficiency in reducing the fecal excretion of *Salmonella*. Sixty male Ross broilers were individually placed in four groups. One group (T1), free of organic acids and essential oils, was used as *Salmonella* control. Another group (T2) was orally inoculated at 1 day-old with 10^5 CFU/mL of *Salmonella* Enteritidis (SE) as a positive SE control. Two groups (T3 and T4) were orally inoculated at 1 day-old with 10^5 CFU/mL of SE and their feed was separately treated with 0.5 and 1% of organic acids and essential oils, respectively. To assess the fecal excretion of SE, cloacal swabs were collected from all birds at 2, 6, 13 and 20 days after inoculation. The T3 and T4 groups showed a reduction in fecal excretion of SE at 6 and 20 days after inoculation

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, organic acids, broiler chicks.

INTRODUCTION

The incidence of food poisoning caused by *Salmonella* spp. has been increasing around the world despite technological advances in food production and the adoption of better hygiene measures. Foods of animal origin, such as chicken meat, eggs and derivatives, continue to be the major cause of poisoning. Contaminated chickens become intestinal carriers, eliminating the microorganism through their feces for long periods of time. Contaminated chickens thus end up introducing the bacteria into slaughterhouses (Andreatti Filho et al., 2000). Avian salmonellosis, when not caused by *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum*, is named paratyphoid infection, and may be caused by different *Salmonella* serovars. This disease has an important economic impact as it may affect animal performance and cause morbidity and mortality in younger birds. In addition, paratyphoid salmonellosis may result in foodborne disease in humans, due to its ability to colonize the alimentary tract of chickens, resulting in carcass contamination (Oliveira et al. 2000). Regarding the control of *Salmonella*, it is possible to decrease its fecal excretion and the contamination of chicken carcasses and eggs by adding organic acids to the feed or drinking water at appropriate times. The basic principle behind the mode of action of organic acids on bacteria is that undissociated (nonionized) organic acids can penetrate the bacterial cell wall and disrupt the normal physiology of certain types of “pH-sensitive” bacteria (which cannot tolerate large internal and external pH variations). Among these bacteria one finds *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp (Gauthier, 2005; Van Immerseel et al., 2006). The relative efficiency of various organic acids varies according to their source, as a result of their different pK potential, and all acids are more effective at a low pH. It is often accepted that organic acids potentiate the action of others acids. Organic acids and essential oils can be combined because there appears to be a synergistic interaction between them. Some authors even suggest that essential oils act by damaging the bacterial cell membrane, thus facilitating the penetration of organic acids into the bacterial cytoplasm (Le Ny, 2005).

The aim of this study was to test a mixture of organic acids and essential oils in broilers orally challenged with *Salmonella* Enteritidis and to verify its efficiency in reducing the fecal excretion of *Salmonella*.

MATERIALS AND METHODS

Chicks

Sixty one-day-old male *Salmonella*-free Ross chicks, hatched from breeders unvaccinated against *Salmonellae*, were housed in four battery cages. The birds received food and water *ad libitum* and the room temperature was adjusted to keep them comfortably housed.

Bacteria

Salmonella Enteritidis ATCC 1980 (SE) was kindly provided by Dr. Paul Barrow (AFRC Institute for Animal Health, Berkshire, UK). The strain was retrieved from freeze-dried cultures and cultured overnight on brain heart infusion broth (BHI; Merck) at 37°C. The culture was then streaked onto xylose lysine deoxycholate agar (XLD, Difco) and incubated at 37°C for 24 hours. One colony was selected and transferred to BHI broth and incubated at 37°C for 2 hours. The colony forming units (CFU) were determined by tenfold dilutions in buffered peptone water 0.1% (BPW, Oxoid) and streaked onto XLD agar. The suspension with 10⁵ CFU was selected for inoculation.

Feed with Addition of the Mixture of Organic Acids and Essential Oils

All feeds consisted of corn, soybean meal and soybean oil. The components of this formulation are shown in Table 1. Both T3 and T4 groups were fed the mixture of organic acids and essential oils (butyric, propionic, lactic and formic acids; and thymol, carvacrol, citrol, cinnamon and clove oils) with 500 g/ton and 1,000g/ton, respectively, in order to replace starch at the levels of 0.5 and 1% in the feed.

Experimental Design

The study had a completely randomized design with four treatments and 15 replicates (each bird was a replicate). The T1 group (inoculated at 1 day-old with 10⁵ CFU/mL of SE), which was free of organic acids and essential oils was used as control for *Salmonella* excretion. The T2 group was orally inoculated at 1 day-old with 10⁵ CFU/mL of SE and was used as an untreated positive SE control. The two other groups (T3 and T4) were orally inoculated at 1 day-old with 10⁵ CFU/mL of SE and their feed was separately treated with 0.5 and 1% of organic acids and essential oils, respectively. On post-inoculation day 17, organic acids and essential oils were withdrawn from the feeding regimen of the T3 and T4 groups. All birds were identified by a wing-web banded metal ring with an individual number. Before inoculation, cloacal swabs were collected from all birds for bacteriological examination in order to check for the absence of *Salmonella*. To assess the fecal excretion of SE, cloacal

swabs were collected from all birds on post-inoculation days 2, 6, 13 and 20. The experiment was approved by the Research Ethics Committee of the School of Veterinary Medicine of Universidade Federal do Paraná, Brazil.

Bacterial Isolation and Identification

The cloacal swabs were directly inoculated onto XLD agar and were pre-enriched at 37°C for 1 hour in 2 mL of BPW 2%. BPW cultures were diluted tenfold in BPW 0.1% to 10^{-3} and then plated in duplicate XLD agar (adapted from Desmidt. et al., 1998). The *Salmonella* colonies were counted and the results were expressed according to the Plate Count Proceedings stated by Normative Instruction no. 6 published on August 26, 2003 by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA, 2003). One *Salmonella* typical colony per plate was confirmed as biochemically and antigenically as SE.

Statistical Analysis

The colony count data were transformed into log base 10 and were analyzed by ANOVA, and those with statistical differences were submitted to the Tukey's test at the 0.05% level using Statview for Windows 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS

No difference was observed between the treatment groups on post-inoculation day 6. However, the fecal excretion of SE was lower in both groups fed organic acids and essential oils at 2 days and at 13 to 20 days, respectively (Table 2, Figures 1 and 2). There was a significant difference across the T2, T3 and T4 treatment groups, but no difference between the T3 and T4 dose groups, indicating the absence of a dose-dependent effect.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Organic acids associated with specific antimicrobial activity are short-chain acids, with one to seven carbons, and are either simple monocarboxylic acids such as formic, acetic, propionic and butyric acids, or carboxylic acids bearing a hydroxyl group (usually on the α carbon), such as lactic, malic, tartaric and citric acids (Dibner and Buttin, 2002). The acid changes the microbial populations in accordance with its antimicrobial activity. The mode of action of organic acids on bacteria in pigs and poultry involves the entry of these acids into the bacterial cell in an undissociated form, causing bacterial membrane disruption and inhibition of essential metabolic reactions. The stress on intracellular pH homeostasis causes accumulation of toxic anions and the bacteria cannot tolerate large internal and external pH

variations. Differently from organic acids, it is difficult to make generalizations about the mode of action of essential oils on bacteria, because each essential oil has different properties and because sensitivity differs across microorganisms. There is a consensus that the mode of action of essential oils on bacteria is related to the impairment of enzyme systems, mainly those involved in energy production and in the synthesis of structural components. Some of the essential oils utilized include cinnamaldehyde, thymol, carvacrol, eugenol, thyme, bay leaf and clove bud. Organic acids and essential oils can be used in combination, and it has been suggested that they damage the bacterial cell membrane, thus facilitating the penetration of organic acids (Gauthier, 2005). In the present study, the mixture of organic acids and essential oils was used in two doses from the first day after hatching. The cloacal swabs on post-inoculation day 2 showed that the control group was negative for *Salmonella* excretion and that the T3 and T4 groups were shedding SE (Table 2). Some explanations for the SE shedding in these groups may reside firstly in the ability of *Salmonella* to sense the environmental conditions and some specific conditions that are required to promote adhesion and invasion; secondly, it could be due the capacity of organic acids to specifically alter the expression of the *HilA* gene (Lawahon, et al., 2002; Van Immerseel et al., 2003; Van Immerseel et al., 2004). By doing that, organic acids and essential oils may have changed the environmental conditions (oxygen tension or osmolarity, for example) or may even have affected the expression of some genes that are necessary for adhesion and invasiveness due to the fact that the feed was given shortly after the chicks had been inoculated. All the birds were inoculated with the same bacterial suspension and at the same time. In the T2 group, the fecal excretion of *Salmonella* increased from post-inoculation day 6 to the end of the trial (Figure 1). On the other hand, on post-inoculation day 13, the T3 and T4 groups yielded SE-negative swab samples. At day 20, however, the T3 and T4 groups were shedding SE again, and this could be caused by the fact that the feeding regimen was changed and organic acids and essential oils were removed from the formulation after post-inoculation day 17 in the T3 and T4 groups. This observation was also found in a trial with broilers given acidified drinking water in the preslaughter period in order to reduce *Salmonella* in the crop. When the water intake was reduced during the preslaughter feed withdrawal, a consequent decrease in acid intake increased the number of viable SE in the crop (Avila, et al., 2003). Oliveira et al. (2000) showed that organic acids added to the feed were not able to prevent infection of birds with *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Infantis* and *S. Typhimurium* serovars, but Berchieri Jr.

and Barrow (1996) observed a remarkable reduction in mortality caused by *Salmonella gallinarum*, which affected the rate of infection between infected and uninfected birds. The results of the use of organic acids and/or essential oils for *Salmonella* control may depend upon the *Salmonella* serovar used as a challenge organism (Oliveira et al., 2000; Santurio et al., 2007). Bacteriological examination of cloacal swabs and litter samples could be negative while the animals can carry *Salmonella* in their tissues and excrete it intermittently under certain stress conditions (Duchet-Suchaux et al., 1997). These facts suggest that organic acids and essential oils should be used constantly in contaminated birds and that their withdrawal from the feed can cause the birds to return shedding the bacterium. The present study was able to show that organic acids and essential oils were useful in controlling the fecal shedding of *Salmonella* Enteritidis by infected chicks and that this procedure can be important as a part of a *Salmonella* control program.

REFERENCES

- Avila, L. A. F., Nascimento, V. P., Canal, C. W., Salle, C. T. P. and H. L. S. Moraes. 2003. Effect of acidified drinking water on the recovery of *Salmonella* Enteritidis from broiler crops. *Braz. J. Poult. Sci.* 5:183-188.
- Andreatti Filho, R. L., Silva, E. N., Ribeiro, A. R., Kondo, N and P. R. Curi. 2000. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. *Braz. J. Microbiol.* 31:107-112.
- Berchieri Jr, A. and P. A. Barrow. 1996. Reduction in incidence of experimental fowl typhoid by incorporation of a commercial formic acid preparation into poultry feed. *Poult. Sci.* 75:339-441.
- Desmidt, M., Ducatelle, R. and F. Haesebrouck. 1998. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* Hadar in chickens. *Vet. Microbiol.* 60:259-269.
- Dibner, J. J. and P. Buttin. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *J. App. Poult. Res.* 11:453-463.
- Duchet-Suchaux, M., Lechopier, P., Marly, J., Bernardete, P., Delaunay, R. and P. Pardon. 1997. Differences in frequency, level and duration of cecal carriage between four outbreed chicken lines infected orally with *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis.* 41:559-567.
- Gauthier, R. 2005. Organic acids and essential oils, a realistic alternative to antibiotic growth promoters in poultry. URL < <http://www.jefo.ca/pdf/avicola/AnaisAveExpo-R.Gauthier.pdf>>.

Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M. and Altier, C. 2002. Intestinal short fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.* 46:1451-1464.

Le Ny, P. 2005. Organic acids in poultry production. Mode of action and application. URL<<http://www.jefo.ca/pdf/avicola/AnaisAveExpo-P.Le%20Ny.pdf>>.

MAPA (Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária). 2003. Diário Oficial da União. Instrução Normativa, SDA Nº 62, de 26 de agosto de 2003.

Oliveira, G. H., Berchieri Jr, A. and P. A. Barrow. 2000. Prevention of *Salmonella* infection contact using intestinal flora of adult birds and/or a mixture of organic acids. *Braz. J. Microbiol.* 31:116-120.

Santurio, J. M., Santurio, D. F., Pozzatti, P., Moraes, C., Franchin, P. R. and S. H. Alves. 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* entérica de origem avícola. *Cienc. Rural*, 37:803-808.

Van Immerseel, F., Cawerts, K., Devriese, L. A., Haesebrouck, F. and R. Ducatelle. 2002. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *World's Poult. Sci. J.* 58:501-509.

Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Velge, P., Bottreau, E., Fievez, V., Haesebrouck, F. and R. Ducatelle. 2003. Invasion of *Salmonella* Enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *Int. J. Food Microbiol.* 85: 237-248.

Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Bohez, L., Pasmans, F., Volf, J.; Sevcik, M., Rychlik, I.; Haesebrouck, F. and R. Ducatelle. 2004. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through hilA suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *App. Env. Microbiol.* 3582-3587.

TABLES

Table 1. Feed formulation compounds and nutritional levels.

Ingredients		Nutritional Levels*			
Macro Ingredients	Kg	Ingredient	%	Digestible Ingredient	%
Corn 8,0%	512.18	Crude Protein	22.99	Tryptophan	0.25
Soybean meal 45%	417.00	Ether Extract	6.05	Lysine	1.17
Vegetable Fat	35.00	Calcium	0.90	Met. + Cyst.	0.86
CaCO ₃ 38%	10.00	Sodium	0.20	Threonine	0.80
Dicalcium Phosphate	17.50	Potassium	0.93	Arginine	1.51
NaCl	4.70	Chlorine	0.33	Leucine	1.83
DL - Methionine 99%	2.12	Available		Isoleucine	0.93
Vitamin Mineral Premix	1.50	Phosphorus	0.45	Histidine	0.57
				Phenylalanine	1.05

Metabolizable Energy Kcal/kg (kilocalories per kilogram): 3,002.11

Mineral – Selenium: 0.18mg; Iodine: 0.70mg; Iron: 48 mg; Copper: 10mg; Magnesium: 78 mg; Zinc: 55mg

Vitamin – A: 14,000 IU; D3: 2,500 IU; E: 25mg; K3: 3.0mg; B1: 2.0mg; B6: 5.0mg; B2: 4.0mg; B12: 25mcg; Nicotinic acid: 35mg; Folic acid: 1.0mg; Pantothenic acid: 12mg; Biotin: 100mg; Antioxidant: 125mg.

*Levels of Warranty – per kg of feed; kg: kilogram; mg: milligram; IU: international unit.

Table 2. *Salmonella* excretion by broiler chicks aged 1 to 20 days old. T2: SE excretion control, free of organic acids and essential oils; T3: 0.05% organic and essential oils, and T4: 1% organic and essential oils, respectively. Results expressed in Log₁₀.

Groups	2 pid (CFU/g)	6 pid (CFU/g)	13 pid (CFU/g)	20 pid (CFU/g)
T1	-	-	-	-
T2	0.000 ± 0.000 ^{b*}	0.679 ± 1.408	1.789 ± 1.250 ^a	2.919 ± 0.507 ^a
T3	0.047 ± 0.180	0.103 ± 0.399	0.000 ± 0.000 ^b	0.968 ± 1.445 ^b
T4	0.558 ± 1.210 ^a	0.661 ± 0.661	0.000 ± 0.000 ^b	0.758 ± 1.306 ^b
P values	0.036	0.311	0.000	0.0001

*different letters on the same column mean statistical significance in Tukey test with 95% confidence interval; pid: post-inoculation day. T1: negative control; T2: *Salmonella* Enteritidis (SE) excretion control, free of organic acids and essential oils; T3: 0.5% of organic acids and essential oils added to the feed and T4: 1% organic acids and essential oils added to the feed. CFU/g: colony forming units per gram of feces.

FIGURES

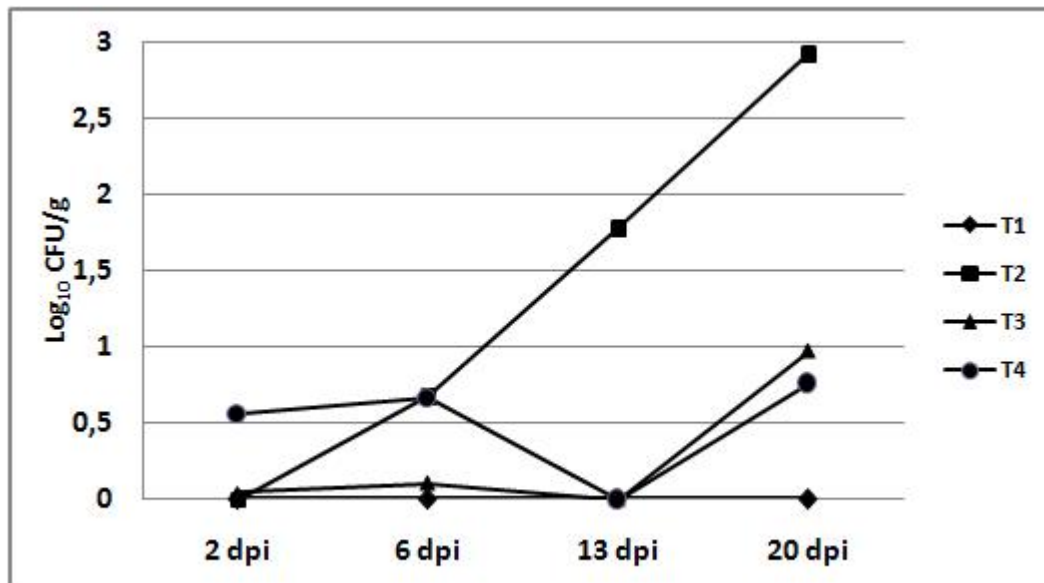


Figure 1. *Salmonella* Enteritidis (SE) excretion performance of broiler chicks from one to 20 days post-inoculation. T1: negative control; T2: SE excretion control, organic acids and essential oils free; T3: 0,5% organic acids and essential oils added in the ration and T4: 1% organic acids and essential oils added in the ration. CFU/g: colony forming units per gram of feces.

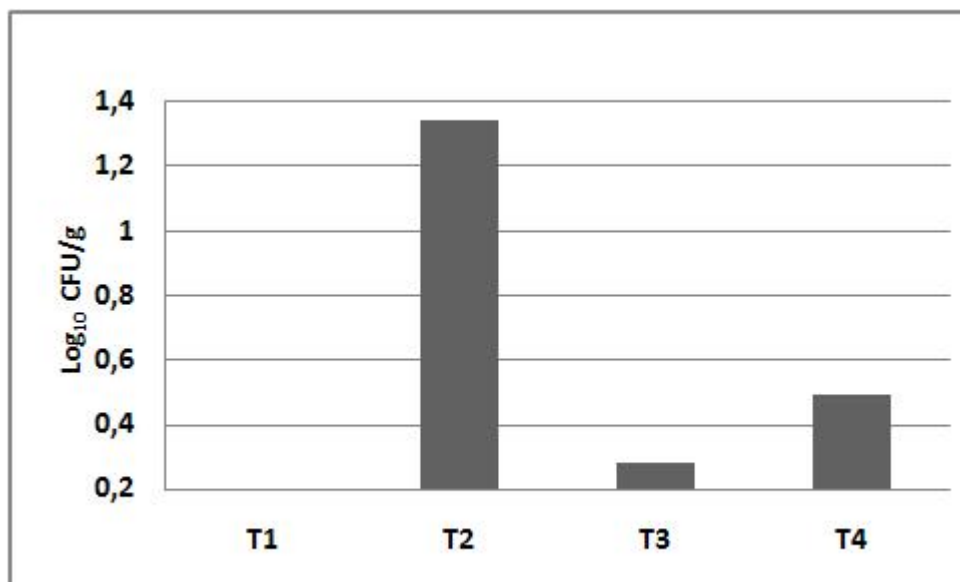


Figure 2. Average of *Salmonella* Enteritidis (SE) fecal shedding for 20 days. T1: negative control; T2: SE excretion control, organic acids and essential oils free; T3: 0,5% organic acids and essential oils added in the ration and T4: 1% organic acids and essential oils added in the ration. CFU/g: colony forming units per gram of feces.

3.5 Artigo 3

Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains inoculated in broiler chicks with the evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counting and fecal excretion parameters.

Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains inoculated in broiler chicks with the evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counting and fecal excretion parameters.

Comportamento das cepas de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Enteritidis inoculadas em pintos de corte através da avaliação dos parâmetros de morfologia cecal, contagem bacteriana no fígado e cecos e excreção fecal.

Anderlise Borsoi^{a*}, Elizabeth Santin^b, Hamilton Luiz de Souza Moraes^a, Luciana Ruschel do Santos^c, Carlos Tadeu Pippi Salle^a, Vladimir Pinheiro do Nascimento^a

^aCentre for Diagnostics and Research in Avian Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 8824, Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil. Postal Code: 91546-000

^bLaboratory of Microbiology and Avian Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná. Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba, PR, Brazil. Postal Code: 80035-050

^cFaculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo. Campus I, Km 171 - BR 285, São José, Passo Fundo, RS, Brazil; Postal Code: 99001-970

*Correspondence address: Rua Chichorro Júnior, 410/92, Bairro Cabral, Curitiba, Paraná, Brazil. Postal Code: 80035-040.

E-mail: anderliseb@yahoo.com.br

Phone: +55 (41) 352 1054

Fax: +55 (51) 3308 7305

ABSTRACT

Over the years, *Salmonella* Heidelberg has gained prominence in North America and also in poultry production in other countries. *Salmonella* Heidelberg has been isolated and reported from poultry and poultry products in Brazil since 1962, while the *Salmonella* Enteritidis emerged as a serious problem in poultry and public health since 1993. These *Salmonellae* can cause intestinal problems in newly hatched chicks and may persist until adulthood and can contaminate the carcasses at slaughter threats to human health. The aim of this study was to compare the fecal excretion of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg inoculated in newly hatched chicks until 20 days of age, as well as, in chicks from 0 to 3 days old, to analyze the cecal villus height: crypt depth relation (morphometry) and perform the cell counting in the liver and cecum. One hundred seventeen chicks were separated in three groups named as a Control, SE and SH and eight chicks per group were euthanized at 6, 12 and 72 hours post-inoculation (pi) in order to allow liver and cecum *Salmonella* isolation and to collect the cecum for villi and crypt analyses. The other birds grow up until 20 day of age and cloacal swabs were taken at 2, 6, 13 and 20 days pi to compare the fecal excretion of inoculated strains. *Salmonella* Enteritidis group had a higher cell number excreted during the trial. Both strains were isolated from the liver and cecum since 6h pi. At 12h pi the *Salmonella* Heidelberg group had high cell count in the cecum. No difference was found in liver cell count. Both strains showed lowest villus height: crypt depth ratio when compared with the control group in the days post-infection analyzed.

Key words: *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Enteritidis, Fecal Excretion, villus:crypt ratio, Broiler

RESUMO

Ao longo dos anos a *Salmonella* Heidelberg ganhou importância na América do Norte assim como na produção avícola em outros países. A *Salmonella* Heidelberg tem sido isolada de aves e produtos avícolas e relatada no Brasil desde 1962, enquanto a *Salmonella* Enteritidis, por sua vez, emergiu como um grave problema nas aves e para saúde pública em 1993. Tais *Salmonella* podem causar problemas intestinais em pintos recém-eclodidos e persistir até a vida adulta das aves, deste modo podendo contaminar as carcaças no abate representando risco para a saúde humana. O objetivo do presente estudo foi comparar a excreção fecal de

Salmonella Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg inoculadas em pintos recém-eclodidos até os 20 dias de idade, bem como nos pintos de 0 a 3 dias, analisar a relação de altura vilosidade e profundidade cripta (morfometria) nos cecos e realizar contagem de células bacterianas no fígado e nos cecos. Cento dezessete pintos foram separados em três grupos denominados como um controle, SE e SH e oito aves por grupo foram sacrificados aos 6, 12 e 72 horas pós-inoculação (pi), a fim de permitir o isolamento de *Salmonella* no fígado e cecos e coletar os cecos para análise de vilosidades e criptas. As outras aves foram mantidas até os 20 dias de idade e suabes cloacais foram realizados aos 2, 6, 13 e 20 dias pi para comparar a excreção fecal das cepas inoculadas. A excreção fecal apresentou maior contagem de células bacterianas excretadas no grupo inoculado com *Salmonella* Enteritidis. Ambas as cepas foram isoladas do fígado e do ceco desde as 6h pi e às 12h pi a cepa *Salmonella* Heidelberg apresentou maior contagem nos cecos. Não houve diferença entre as duas cepas quanto à contagem de células no fígado. Ambas as cepas apresentaram menor relação entre altura vilo: profundidade cripta quando comparadas ao grupo controle nos dias pós-infecção analisados.

Palavras - chave: *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Enteritidis, Excrção Fecal, relação vilosidade:cripta, frango de corte.

INTRODUCTION

Many strains of *Salmonella* are zoonotic agents, infecting humans by contaminated animal origin food products. In humans, salmonellosis is one of the most common causes of food poisoning. The most common serovars causing disease in humans are *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. Over the recent years, *Salmonella* Heidelberg has gained prominence in North America and is also being found in poultry production in other countries, with commercial importance in laying hens, turkeys and broiler chickens because of its increase in meat and eggs (Chittick et al., 2006; Gast et al., 2004; Nayak, Kenney, 2002). *Salmonella* Heidelberg has been isolated and reported from poultry and poultry products in Brazil, since 1962 (Hofer et al., 1997), while the *Salmonella* Enteritidis emerged as a serious problem in poultry and public health as from 1993. The rate of growth of the Brazilian poultry industry in the nineties created favorable conditions for the maintenance of *Salmonella* positive flocks (Silva, Duarte, 2002). The *Salmonellae* control in Brazil is regulated by Poultry National Health Plan stated by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. In 2003, the *Salmonella* vaccination for broilers breeders, with killed

vaccine only against *Salmonella* Enteritidis was allowed (SDA, 2003). Some authors suggest that when one serovar was present in a flock others can reduce, like the reduction of Gallinarum and the increase of Enteritidis, or the increased presence of Enteritidis making other serovars reduce (Silva, Duarte, 2002). In broiler production, when caecal tonsil colonization is established by *Salmonellae* in chickens, this bacteria is consistently excreted in the feces (Backer et al., 1980). The *Salmonella* Heidelberg is present in Brazilian broiler flocks and in an effort to better understand the behavior of this strain, this study was performed to compare *Salmonella* Heidelberg with an ATCC *Salmonella* Enteritidis strain. In chicks from 0 to 3 days old, was analyzed villus height: crypt depth ratio and cell counting in the liver and cecum. The fecal excretion of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg inoculated in newly hatched chicks was assessed until 20 days of age.

MATERIALS AND METHODS

Chicks. Recently hatched commercial Ross chicks were obtained from a Brazilian Poultry Company. All chicks were *Salmonella* free, hatched from breeders unvaccinated against *Salmonellae* and were housed on battery cages. Water and feed free from antibiotics and animal protein were given *ad libitum* and the environment temperature was set to attend their physiological comfort.

Bacteria. *Salmonella* Heidelberg (SH) was isolated from broiler carcasses in Southern Brazil and the *Salmonella* Enteritidis (SE) ATCC (American Type Culture Collection) 1980 was kindly provided by Dr. Paul Barrow (AFRC Institute for Animal Health, Berkshire, UK). The organisms were retrieved from freeze cultures and cultured overnight at 37°C on Brain Heart Infusion broth (BHI; Merck, Germany). The culture was streaked on Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD, Difco, UK) and incubated at 37°C for 24 hours. Five colony forming unit (CFU) of each strain was selected and transferred to BHI and incubated at 37°C for 24 hours. The CFU were determined by ten-fold dilutions in Buffered Peptone Water 0,1% (BPW, Oxoid, UK) and streaked on XLD agar. The suspension with 10⁵ CFU/mL was selected for inoculation.

Experimental design. One hundred seventeen chicks were separated on three groups named as Control, SE and SH. Two groups were inoculated orally with 1mL contained 10⁵ CFU/mL of SE and SH respectively and another group was inoculated with saline solution as a control

group. From each group during the entire trial, 24 birds were killed and 15 were kept to *Salmonella* fecal excretion analyzes. All birds were individually numbered by a metal ring placed on the wing. Eight chicks per group were killed by cervical dislocation at 6, 12 and 72 hours post-inoculation (pi). At necropsy, the cecum and the liver were collected for *Salmonella* bacteriological enumeration. The cecum were collected three centimeters away from the colon, and taken for histological examination while the cecum was also submitted to electron microscopy analysis. Cloacal swabs of 15 birds from each group were collected for bacteriological examination at 2, 6, 13 and 20 days post-inoculation (pi). At necropsy (21 days post-infection), cecum and liver were collected for bacteriological examination. The trial was approved and performed according to the recommendations of the Ethic Committee of Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Brazil.

Bacterial examination in chicks liver and cecum. Two pools of four birds per group had their organs homogenized in BPW 2% (ten times the volume of organs the weight). BPW cultures were diluted ten-fold in BPW 0, 1% until 10^{-3} and after that were streaked in duplicate of XLD agar plate, incubated for 24 hours at 37°C and then realized the CFU counting, adapted from Desmidt et al. (1998b). All the organs samples were also incubated for 16-18 hours at 37°C and then, 100µL from each BPW were inoculated in 10mL of Rappaport Vassiliadis (RV) (Merck, Germany) and placed at 42°C for 24 hours. The RV samples were streaked on XLD (24 hours at 37°C). The *Salmonella* CFU were counted and the results expressed according to the Plate Count Proceedings recommended by Normative Instruction N°6 from the Brazilian Ministry of Livestock and Food Supply (MAPA, 2003). One typical colony per plate was biochemically and antigenically screened to confirm *Salmonella* identification.

Bacteriological examination for cloacal swabs. Cloacal swabs (180 units) were directly inoculated on XLD agar while others (180 units) were placed in 2 mL of BPW 2%. BPW cultures were diluted ten-fold in BPW 0,1% until 10^{-3} and after that 100 µL was plated out on duplicate XLD agar (adapted from Desmidt et al. 1998b). The *Salmonella* colonies were counted and the results were expressed according to the Plate Count Proceedings recommended by Normative Instruction N°6 published in august 26th, 2003 recommended by Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA, 2003). One typical colony per plate was biochemically and antigenically screened to confirm *Salmonella*

identification. From all the first dilutions, 100 μ L were enriched in 10mL of Rappaport Vassiliadis (Merck, Germany), incubated at 42°C for 24 hours and plated in XLD agar. The threshold of *Salmonella* detection after direct plating was 10 CFU/mL. Samples which were negative after direct plating but positive for *Salmonella* after enrichment were presumed to contain less than 10 CFU/mL and adopted 0,699 log₁₀ to perform the statistical analyzes. Samples which were negative after direct plating were presumed to contain 0 CFU/mL. Regarding cecum and liver samples collected at necropsy (21 day old chickens), 25 grams of each organ were added to 225mL of BPW into sterile plastic bags and homogenized for two minutes. The procedures for counting or isolation were the same as described above.

Histological examination and villus and crypt analyzes. Cecum samples were fixed in a 4% phosphate-buffered formaldehyde solution, paraffin-embedded, sectioned at 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin (HE). The cecum samples processed for histological examination were measured for villi height and crypt depth. These data were taken from the tip of the villus to the valley between individual villi, and measurements for crypt depth were taken from the valley between individual villi to the baso-lateral membrane (Thompson, Applegate, 2006). Fifty villi and 50 crypt were measured for each time group (Pelicano et al, 2007). The villus and crypt study was carried out using an image-analyzing system (Motic Images Plus 2.0-Motic China Group Co.2006), coupled to a microscope (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA).

Electron microscopy. The cecum sections were collected to perform scanning photomicroscopy analysis. These sections were processed as described by Maiorka et al. (2003).

Statistical analysis. Data were submitted to analysis of variance using StatView SAS software (1992-98-SAS Institute Inc. USA) and means were compared using the test of Tukey at a 5% significance level (P<0,05).

RESULTS

Salmonella Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg isolation and villi height : crypt depth analyzes. Quantification of *Salmonella* per gram of cecum and liver, villi height, crypt depth relation were analyzed during 72 hours pi with two different *Salmonella* strains, serovars

Enteritidis (SE) and Heidelberg (SH). The control group had no *Salmonella* infection. Since 6 hours pi the two strains were present in the cecum and liver. The SH had higher CFU/g count in the cecum at 12 hours pi and no difference was observed in number of cells in the liver between the two strains (Table 1). For the villus height : crypt depth ratio, the SE and SH groups showed lowest relation when compared with the control group (Table 2).

Salmonella Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg Fecal Excretion. The SH strain 2 days pi showed a cell count higher than the SE strain, while in the SE group the counting only was possible after the selective enrichment. At 6 days pi, both strains showed no difference in the number of cells excreted in the cloacal swabs. During the trial from 6 days pi the Enteritidis strain had higher excretion (Table 3 and Figure 5). As regards to the isolation in direct agar plate (DAP), it was possible to observe that the SH group attained a higher number of positive birds at the day 2 pi, and to SH group, it was possible to observe a gradual increase in the number of chick positive in the DAP . Due to the individual identification of birds into the groups, it was possible to observe that all birds were positive for *Salmonella*. At necropsy performed, 21 days pi, all birds were found positive for SH and SE in the liver and the cecum bacterial counting was higher in the SH group. Means and the standard deviation to cecum were $1,34 \pm 1,37$ for SE and $2,96 \pm 1,52$ for SH, with $p < 0,05$. Data obtained from analyses of the caecal contents did not correlate with the results from the last cloacal swab taken, one day before euthanasia.

Electron microscopy. The figure 1 shows the cecum scanning photomicroscopy of birds from control group, where it can be identified some injured areas. The Figures 2 and 3 from birds infected with *Salmonella* Heidelberg (10^5 CFU/mL), showing villi with aspect of edema, rough aspect, mucosal erosion, degenerate cells and attached bacteria

DISCUSSION

Studies performed with *Salmonella* Enteritidis in different broiler lines had presented an inverse relationship between severity of cecal infection and colonization in systemic organs in animals with similar age and challenge (Kramer et al., 2001, Sadeyen et al., 2004). In the present study, we also found cell counting from cecum higher than liver to SE and SH (Table1). The different cecum and liver colonization level may be due to *Salmonella* colonization virulence systems, and these systems are based on two *Salmonella* pathogenic

island systems (SPI 1 and 2) responsible for intestinal (SPI 1) and systemic (SPI 2) host infection. The expression of these island systems are regulated in response to different environmental factors. SPI 1 responds to low oxygen levels and high osmolarity in the gut lumen, while the SPI 2 responds to low magnesium and phosphorus levels inside the host cells, for example (Deiwick et al., 1999).

According to Nabburs (1995), under optimal circumstances, intestinal villi should be high and crypts should be shallow, resulting in a high villus height to crypt depth ratio. In the present work, from 0 to 3 days pi, SE and SH groups had low villus height: crypt depth ratio when compared with the control group, possibly because of SE and SH damage caused to the intestinal mucosa. Reductions in villi height : crypt depth ratio can occur due the intestinal pathogens infections and also are seen in other occasions in poultry, as after feed withdrawal (Thompson and Applegate, 2006), and when some feed additives are fed during growout (Hancock et al. 1990; Friesen et al. 1993; Pelicano et al. 2007). These changes were attributed to reduced cell migration and proliferation rates, along with increased rates of cell loss and programmed cell death, or apoptosis (Ferraris and Carey, 2000).

Such intestinal mucosa alteration found in this work, also may have occurred because chicks immediately after hatching have the immature immune system and the protection of intestinal mucosa depends on the barrier cell (macrophages, natural killer cells, heterophils), chemical and physical factors, and the presence of Paneth cells, located in the crypt, which secrete defensins, and phospholipase that lyses bacteria, fungi and enveloped viruses (Ito et al., 2007).

Infection of newly hatched chicks with *Salmonella* Enteritidis by oral inoculation or by horizontal contact exposure can lead to the establishment of an intestinal colonization that persists into adulthood (Gast et al., 2005) because the ability of this pathogen in replicate inside the host cells, most prominently in phagocytic cells such as a macrophages (Hansen-Wester, Hensel, 2001). In our study, the SE and SH strains were inoculated in chicks and cloacal swabs were taken until 20 days of life. Such as previous trials with these two strains (Borsoi et al., 2008) the birds infected with SE excreted very low *Salmonellae* number at 2 days pi (Table 3).

The SH group started with the largest counting from the cloacal swabs, but the number decreased until 20 days pi, while birds with SE showed an increase in number of positive birds and cell counting throughout the trial. The Table 3 also shows the comparison between

the isolation in direct agar plate (DAP) and the number of cells in each time, where the number of birds DAP positive in the SE group increased as well as the number of cells isolated. It was possible to determine that when the excretion level per bird was above 10 CFU/mL, it was detectable in DAP and with the individual birds identification performed, it was also possible to know that all birds were positive in at least one time analyzed and the same bird more than once.

Regarding the scanning photomicroscopy, the apical region of some villi showed affected areas, in the control group, and this can be related with old cells turnover (Figure 1). The Figures 2 and 3 shows the changes in the intestinal villi in the SH group. Aspect of edema, rough surface, mucosal erosion, epithelial cells degeneration, and presence of cellular debris in the space between villi were suggested by the findings in these scanning photomicroscopy. These results are in agreement with Desmidt et al. (1998a) which observed adhesion and colonization of *Salmonella* in the cecal lumen.

The concern about *Salmonella* Enteritidis is well characterized in poultry industry and humans. Similarly, as already mentioned, in these last years the presence of *Salmonella* Heidelberg in laying hens with egg contamination (Gast et al., 2004, 2005, 2007) and also in human illness (Chittick et al, 2006) has been documented. The present work was able to shown changes in the intestinal mucosa caused by *Salmonella* Heidelberg similar to those caused by the *Salmonella* Enteritidis strain; the presence in the liver of newly hatched chicks and the persistence in the fecal excretion in broiler chickens. These findings suggest that *Salmonella* Heidelberg have importance as a pathogen to newly hatched chicks and potential broiler carcass contaminant.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the professionals at the Centre for Diagnostics and Research in Avian Pathology (UFRGS), the professionals at the Laboratory of Microbiology and Avian Pathology (UFPR), Da Granja Poultry Company for the chicks. This study was supported by Brazilian National Council of Research (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

REFERENCES

BACKER, R. C., GOLF, J.P., MULNIX, E. J. *Salmonellae* recovery following oral and intravenous inoculation of laying hens. *Poult. Sci.* v.59, p. 1067-1072, 1980.

BORSOI, A., SANTIN, E., DINIZ, G. S., NASCIMENTO, V. P. Excreção de *Salmonella* Enteritidis e Heidelberg Inoculadas em Pintos de Corte e Avaliada por Suabe de Cloaca. *Rev. Bras. Cienc. Avíc.* v.10, p. 232-232, 2008.

CHITTICK, P., SULKA, A., TAUXE, R. V., FRY, A. M. A. Summary of National Reports of foodborn outbreaks of salmonella Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. *J. Food Prot.* v.69, n.5, p.1150-1153, 2006.

DEIWICK, J., NIKOLAUS, T., ERDOGAN S., HENSEL M. Environmental regulation of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 gene expression. *Mol. Microbiol.* v.31, p.1759-1764. 1999.

DESMIDT, M., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F. Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis phage type four. *Poult Sci.* v.77, p.73-74,1998a.

DESMIDT, M; DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* hadar in chickens. *Vet. Microbiol.* v.60, p.259-269, 1998b.

FERRARIS, R.P. AND H.V. CAREY. Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Ann. Rev. Nutr.* v.20, p.195-219, 2000.

FRIESEN, K.G., GOODBAND, R.D., NELSEN, J.L., BLECHA, F., REDDY, D.N., REDDY, P.G. AND L.J. KATS. *J. Anim. Sci.* v.71, p.2089-2098, 1993.

GAST, R., GUARD-BOULDIN J., HOLT, P. S. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* Heidelberg or *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis.* v.48, p. 863-869, 2004.

GAST, R., GUARD-BOULDIN J., HOLT, P.S. The relationship between the duration of fecalexcretion and the production of contaminated eggs by layng hens infected with strain *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. *Avian Dis.* v.49, p. 382-386, 2005.

GAST, R., GURAYA, R., GUARD-BOULDIN J., HOLT, P. S., MOORE, P. S. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. *Avian Dis.* p.40-44, 2007.

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

HANSEN-WESTER, I., HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microb Infect*, v.3, p.549-559, 2001.

HOFER, E., FILHO, S. J. S., REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* p.55-62, 1997.

ITO, N. M. K., MIYAJI, C. L., OKABAYASHI, S. M. Saúde intestinal em frangos de corte. Circular Técnica Aviação do Brasil. URL<http://www.agroceresross.com.br/images/noticias/384CircularTecnicaAviagen_200711.pdf>. 2007.

KRAMER, J., VISSCHER, A. H., WAGENAAR, A. G., BOONTRA-BLOM, A. G., JEURISSEN, S. H. M. Characterization of the innate and adaptive immunity to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT1 infection in four broiler lines. *Vet. Immunol. Immunopat.* v.79, p.219-233, 2001.

MAIORKA, A., SANTIN, E., DAHLKE, F., BOLELI, I. C., FURLAN, R. L., MACARI, M. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. *J. Appl. Poult. Res.* v.12, p.483-492, 2003.

MAPA (Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária). 2003. Diário Oficial da União. Instrução Normativa, SDA Nº 62, de 26 de agosto de 2003.

NABBURS, M.J. Microbiological, structural and functional changes of the small intestine of pigs at weaning. *Pig News Inform.* v.16, n.3, p.93-97, 1995.

NAYAK R., KENNEY, P. B. Screening of *Salmonella* isolates from a turkey production facility for antibiotic resistance. *Poult. Sci.* v.81, p.1496-1500, 2002.

PELICANO, E.R.L., SOUZA, P.A., SOUZA, H.B.A., FIGUEIREDO, D.F. AND C.M.C. AMARAL. Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broilers fed different additives. *Braz. J. Poult.Sci.* v.9, n.3, p.173-180, 2007.

SADEYEN, J-R., TROTTEREAU, J., VELGE, P., MARLY, J., BEAUMONT, C., BARROW, P. A., BUMSTEAD, N., LALMANACH, A-C. *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microb. Infect.* p.1278-1286, 2004.

SDA. Instrução Normativa nº 78. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas, como livres de *Salmonella gallinarum* e de *Salmonella pullorum* e livres ou controlados para *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*.
Secretaria de Defesa Animal. URL<http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33.981919&_dad=portal&_schema=PORTAL>. 2003.

SILVA, E. N., DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Rev. Bras. Ciênc. Avic.* v.4, n.2, p.85-100, 2002.

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

TABLES

Table 1. Counting of *Salmonella* (*S*) Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis per gram of caeca and liver tissue from newly hatched chicks inoculated with 10^5 CFU/mL. Original counting transformed into \log_{10} . Data are the means for eight animals collected in each period.

Period post - inoculation	Control	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Heidelberg</i>	Control	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Heidelberg</i>
	cecum CFU/g	cecum CFU/g \log_{10}	cecum CFU/g \log_{10}	liver CFU/g	liver CFU/g \log_{10}	liver CFU/g \log_{10}
0h	-	-	-	-	-	-
6h	-	3.22 ± 2.16	3.11 ± 2.32	-	2.20 ± 2.12	2.69 ± 2.81
12h	-	3.99 ± 0.06 ^{b*}	4.70 ± 0.03 ^a	-	0.69 ± 0.00	0.69 ± 0.00
72h	-	4.10 ± 0.64	4.37 ± 0.36	-	1.74 ± 0.29	1.08 ± 0.55

CFU/g: Colony Forming Units per gram. *Different letters in the same line differ by Tukey test with 95% level of confidence ($p < 0.05$).

Table 2. Cecal villus height : crypt depth ratio (μm) in different periods *Salmonella* (*S*) Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis post-inoculation (pi) of in chicks aged 0 to 3 days old.

Period post-inoculation	Control Villus:crypt	<i>S. Enteritidis</i> Villus:crypt	<i>S. Heidelberg</i> Villus:crypt
6h	^a 5.21 ± 2.28	^b 4.49 ± 1.62	^b 5.09 ± 1.56
12h	^a 6.59 ± 9.44	^b 4.28 ± 1.10	^b 5.21 ± 1.87
72h	^a 7.62 ± 2.36	^b 5.63 ± 1.89	^a 7.14 ± 2.20

* Different letters in the same line. differ by Tukey test with 5% probability of error ($p < 0.05$).

Table 3. Percentage of positive samples in direct agar plating (DAP) and fecal excretion counting of *Salmonella* Enteritidis (SE) and Heidelberg (SH) (10^5 CFU/mL). Original number transformed in \log_{10} .

Group	DAP+ (%)	Excretion (\log_{10})	DAP+ (%)	Excretion (\log_{10})	DAP+ (%)	Excretion (\log_{10})	DAP+ (%)	Excretion (\log_{10})
	2 days pi		6 days pi		13 days pi		20 days pi	
Control	0	-	0	-	0	-	0	-
SE	0	0.70 ± 0.00 ^b	20	1.23 ± 1.12	73	1.97 ± 0.97 ^a	100	2.92 ± 0.51 ^a
SH	53	1.52 ± 0.13 ^a	13	0.93 ± 0.61	20	1.05 ± 0.84 ^b	20	1.03 ± 0.94 ^b
P value	<0.01		= 0.36		<0.01		<0.0001	

* Different letters in the same column. differ by Tukey test with 5% probability of error ($p < 0.05$). pi: post-inoculation. DAP +: direct agar plating positive. pi: post-inoculation.

FIGURES

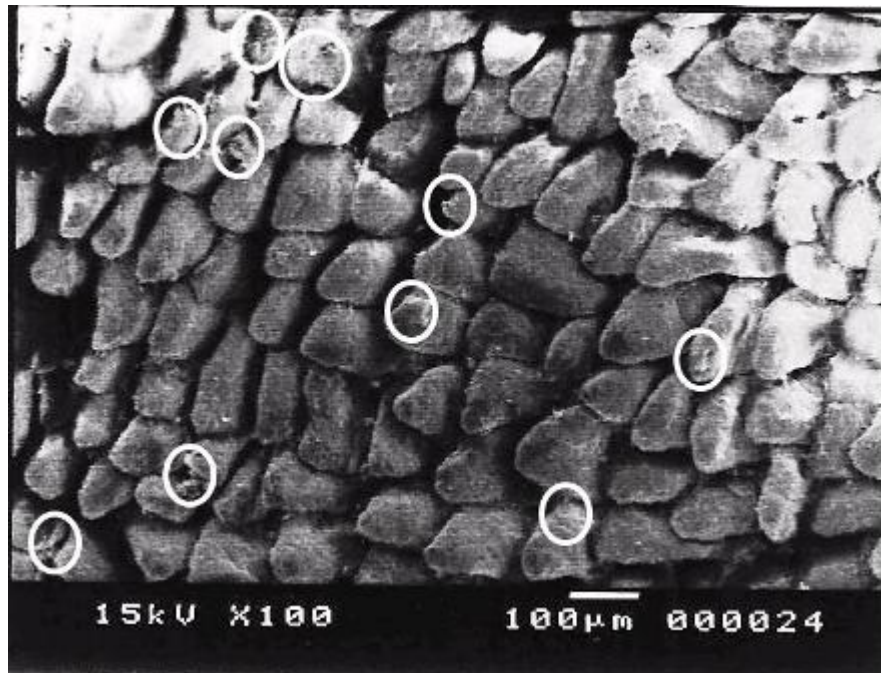


Figure 1. Electron microphotograph of the cecum of chicks from the Control group, 3 days post-inoculation with a saline solution (X100). In the circles, the apical region of some villi with injured areas.

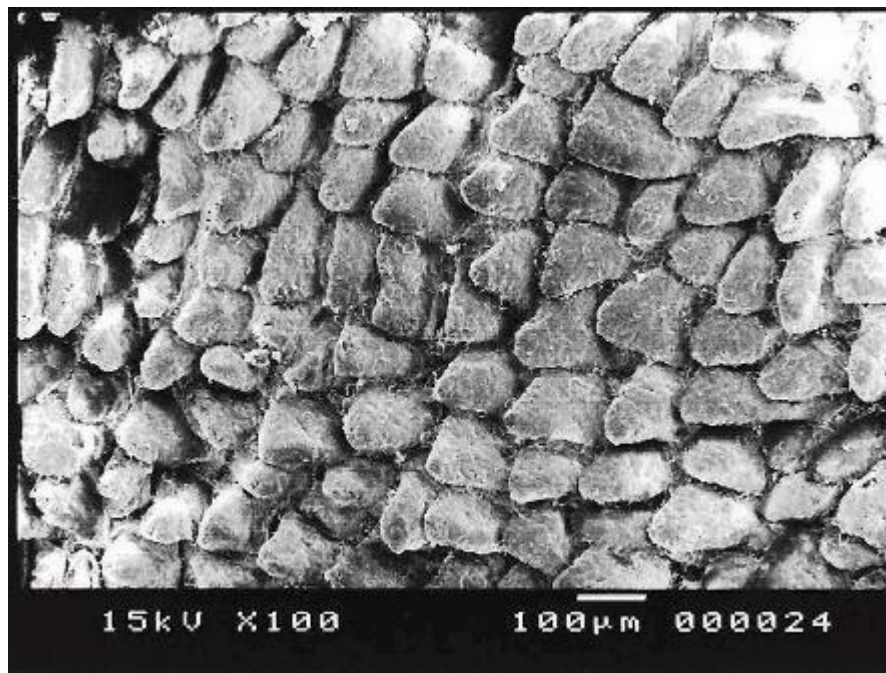


Figure 2. Electron microphotograph of the cecum of a chick at 3 days post-inoculation of 10^5 CFU/mL of *S. Heidelberg*, (X100). Villi with aspect of edema and surface with rough aspect or mucosal erosion. Space between the villi presenting structures similar to bacilli and cellular debris.

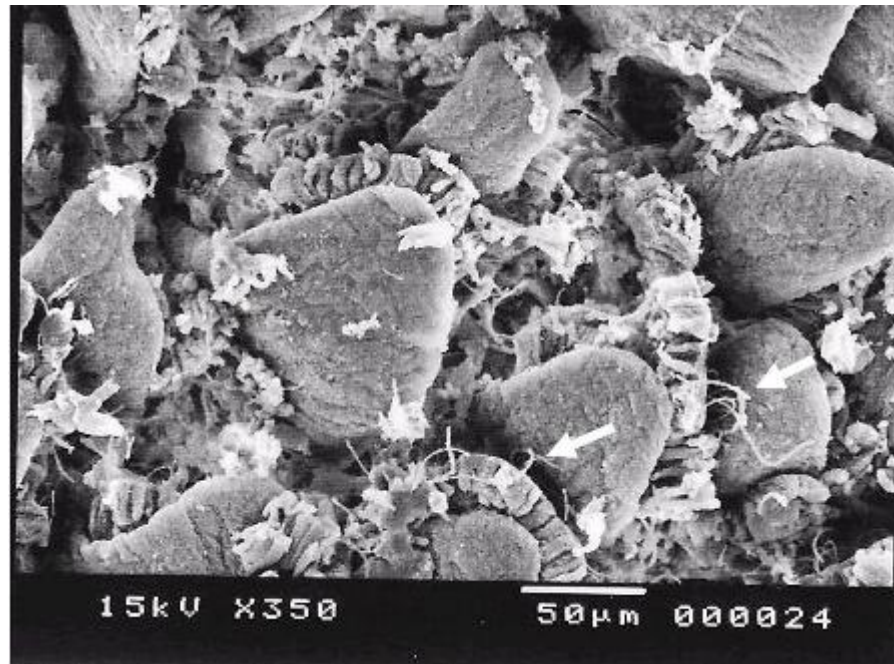


Figure 3. Electron microphotograph of the cecum of chicks at 3 days post-inoculation of 10^5 CFU/mL of *S. Heidelberg* (X350). Few attached bacteria (arrows) in epithelial cells and between the villi can be detected. Structures similar to bacilli and compatible with cellular debris or groats of bacteria.

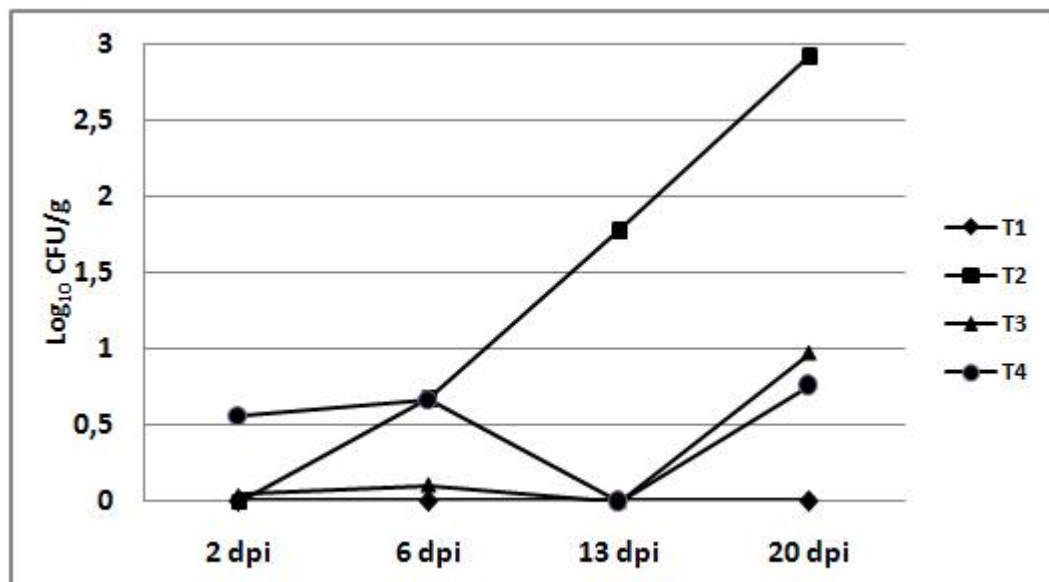


Figure 4. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg fecal excretion from 2 to 20 days post-inoculation,

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo estudar o sorovar *Salmonella* Heidelberg (SH), que conforme posto na revisão bibliográfica, aparece como um importante sorovar determinante de toxinfecções em humanos, importante agente patogênico em poedeiras comerciais, sendo que este também está presente na avicultura industrial brasileira. Ainda, foi objetivo de estudo, comparar o comportamento da SH frente a *Salmonella* Enteritidis (SE) e testar o uso de uma mistura de ácidos orgânicos e óleos essenciais no seu controle de SE inoculada em frango de corte.

Este trabalho iniciou com a seleção e isolamento das cepas de SH, realização dos testes de sensibilidade antimicrobiana e desenvolvimento dos protocolos para a pesquisa dos genes *invA*, *lpfA* e *agfA* nas cepas, realizados no Laboratório CDPA- UFRGS. A próxima etapa foi a realização do teste de eletroforese em campo pulsado (PFGE) no Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob orientação de Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues. Após a seleção das cepas de SH com maior diferença genética nos testes utilizados, dois testes pilotos foram desenvolvidos. Um para desenvolvimento de um protocolo para contagem de *Salmonella* a partir de suabes de cloaca (Resumo 1) e outro com o intuito de selecionar doses para inoculação das *Salmonella* nas aves (Resumo 2) (BORSOI et al. 2008a; 2008b).

Para o desenvolvimento da contagem de *Salmonella* a partir de suabes foram testados dois protocolos. O protocolo A idêntico ao descrito por Desmidt et al. (1998a), o qual selecionou o uso de caldo tetracionato para a diluição da água peptonada e plaqueamento. O teste do protocolo A nas amostras de *Salmonella* do presente trabalho não obteve resultado satisfatório. A parte sólida do meio precipitou nas placas e não foi possível a separação das colônias da bactéria. O protocolo B foi baseado nos protocolos de contagem para material avícola (como cama de galpões de aves e ração) com contagem de colônias efetuada pela regra da Instrução Normativa Nº 62 (MAPA, 2003). Esta técnica aborda a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) em cada uma das duas placas da diluição e fazendo a média aritmética, após a média das três diluições, estas são somadas e divididas por três. Com o protocolo B foi possível recuperar as bactérias inoculadas em curto espaço de tempo, pois o pré-enriquecimento foi realizado somente por uma hora, a fim de estabilizar as *Salmonella*, enquanto no protocolo de

Desmidt et al. (1998a), o pré-enriquecimento foi realizado por 24 horas. Analisando o protocolo de Desmidt et al. (1998a), é possível inferir que o pré-enriquecimento por 24 horas pode alterar o número inicial de células bacterianas da amostra, pois a função da água peptonada, além da reparação de células injuriadas é também, promover o crescimento das bactérias.

A seleção das doses de 10^5 e 10^8 UFC/mL de SH e SE para inoculação em pintos foi definida em função do teste piloto (Resumo 2) no qual, doses menores que 10^5 UFC/mL não foram suficientes para a detecção das bactérias a partir de suabes de cloaca direto em placa ou incubados, aos dois dias pós-inoculação (pi) das aves. Notou-se que a SE não teve excreção ao primeiro dia pi em ambas as doses inoculadas. Diferenças entre aderência e invasão intestinal entre as cepas podem explicar este fato. Também foi possível observar que provavelmente a excreção de SH, às 24 horas pi, não foi devido a passagem do inoculo (1mL via oral), pois com a mesma metodologia e quantidade de células bacterianas inoculadas, não foi possível a detecção de excreção nos grupos inoculados com SE.

Abordando a parte de análise molecular das cepas de SH, o método selecionado para a extração do DNA foi a extração pelo calor ou termo-extração. O protocolo foi baseado na metodologia desenvolvida por Guo et al. (2000), porém para a melhor separação do DNA foi necessário incluir uma etapa extra de lavagem e centrifugação do *pellet* inicial. Soumet et al. (1994) estudaram quatro diferentes protocolos de extração de DNA. A extração com enzima proteinase K foi a mais eficiente e em segundo lugar, apareceu a extração pelo calor, devido a sua menor necessidade de manipulação e por não ter apresentado contaminação. O limite de detecção da extração pelo calor encontrado pelos pesquisadores foi de $10^4 - 10^5$ UFC/mL. Os mesmos pesquisadores elegeram esta técnica para trabalhar com desenvolvimento de uma reação de PCR com múltiplos genes para detecção de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (SOUMET et al., 1999). Santos et al. (2000) também avaliaram diferentes protocolos para a extração de DNA de *Salmonella* inoculadas e carcaças de frangos e a melhor técnica foi a utilização do protocolo fenol-clorofórmio para extração. Analisando os resultados destes pesquisadores, foi possível notar que o protocolo de extração pelo calor não foi o mais eficiente para extração de DNA de *Salmonella* quando na presença de outras bactérias ou quando em baixa concentração, porém para trabalhar com cultura pura foi uma opção eficiente. No

presente trabalho não foi realizado teste para conhecer o nível de detecção do método de termo-extração para as amostras de SH.

Quanto a detecção dos genes *invA*, *lpfA* e *agfA*, as seqüências iniciadoras (*primers*) foram selecionados a partir de trabalhos já publicados e foram verificados no banco de genes antes de sua confecção (Artigo 1). O desenvolvimento das condições da PCR foi realizada com múltiplos testes para cada gene, alterando as quantidades de cloreto de magnésio, enzima *Taq* e temperatura de anelamento dos *primers*. Os controles negativos e positivos foram desenvolvidos utilizando uma cepa de SE ATCC 1980, uma cepa de *Salmonella* Typhimurium (isolada de linfonodo de suínos, cedida pela Dra. Mariza Cardoso, Departamento de Medicina Preventiva, UFRGS) e com uma cepa de *E. coli* ATCC 25922 (cedida pelo mestrando Sílvio Rocha, CDPA-UFRGS). além de um microtubo com todos os componentes da reação, exceto o DNA. Dentre as 65 amostras de SH analisadas, 59 amostras apresentaram os genes *invA* e *lpfA* e seis amostras apresentaram os genes *invA*, *lpfA* e *agfA*. Para a técnica de PCR são determinadas algumas condições para validar a técnica, como a inclusão de um controle interno de amplificação (CIA). CIA é uma seqüência de DNA não-alvo presente no tubo da reação, o qual é co-amplificado simultaneamente com a seqüência-alvo. Na reação de PCR sem um CIA, uma resposta negativa (sem banda ou sinal) pode significar que não há presença da seqüência-alvo na reação. Também, pode significar que a reação foi inibida, como um resultado de mau funcionamento do termociclador, preparação incorreta da mistura da PCR, baixa atividade da polimerase e presença de substâncias inibidoras na matriz da amostra (FREITAS et al., 2006). No presente trabalho, não foi utilizado CIA, porém os erros quanto ao funcionamento do termociclador, preparação da mistura da PCR e baixa atividade da polimerase talvez possam ser descartadas, por saber que foram analisadas amostras puras e também sustentado pelos resultados controles positivos e negativos da reação. Quanto à presença de substâncias inibidoras, todas as amostras foram verificadas antes da análise de PFGE, quanto a presença da enzima de degradação do DNA (DNAse), sendo plaqueadas em ágar específico para o teste. Quanto as amostras com a presença dos genes pesquisados, não foi realizado o seqüenciamento dos *primers*, porém diversos trabalhos publicados com diferentes genes, citam a especificidade da reação da PCR e também não apresentaram seqüenciamento dos *primers* utilizados (COCOLIN, et al., 1998; SOUMET et al., 1999; RAJASHEKARA et al., 2000; WANG; YEH, 2002;

IKUNO et al., 2004; UI-HASSAN et al., 2004; KUMAR et al., 2006; GIBSON et al., 2007).

Para a inoculação em aves, o objetivo foi selecionar duas cepas com a maior diferença genética, porém somente com a pesquisa dos genes citados não foi possível, pois foram apresentados dois perfis de genes, com mais de uma amostra cada. Deste modo, a técnica de PFGE foi selecionada para prover diferenciação entre os clones de SH. A técnica de PFGE foi descrita pela primeira vez em 1984, como uma ferramenta para exame de DNA cromossomal de organismos eucarióticos. Subseqüentemente, a técnica foi comprovada como altamente eficiente para tipagem molecular de diferentes espécies bacterianas. A técnica gera de 10 a 30 fragmentos de restrição, com tamanho de 10 a 800kb, através da preparação do DNA com o uso de enzimas de restrição (TENOVER et al, 1997). Em 1995, Tenover e colaboradores publicaram critérios de interpretação de resultados de PFGE, em um esforço para tornar homogêneo o uso desta técnica para fins epidemiológicos. Assim, se existe uma relação epidemiológica entre as bactérias idênticas, provavelmente trata-se de surto. Por outro lado, bactérias de mesma espécie e mesmo genótipo, isoladas de pacientes que não possuem uma ligação epidemiológica detectável, podem representar linhagens epidêmicas. Os mesmos pesquisadores, assumiram que bactérias não relacionadas epidemiologicamente, devem possuir genótipos diferentes. Considera-se o fato de que um mínimo de 10 fragmentos de DNA (conseqüentemente 10 bandas no gel) deve ser obtidos por bactérias, para que a técnica tenha poder discriminatório relevante. Alguns fatores podem interferir na PFGE, como composição e concentração da agarose, solução tamponante, tensão da corrente elétrica (voltagem), tempo de pulso e de corrida eletroforética dentre outros fatores, sendo que a escolha da enzima de uso deve ter sido previamente estudada (MAGALHÃES et al, 2005). Neste trabalho, foram utilizadas duas enzimas para digestão do DNA, *NotI* (resultados não incluídos na tese) e *XbaI*. A enzima *NotI* demonstrou menor poder discriminatório que a enzima *XbaI* para as cepas avaliadas. No Canadá, diferentes isolados de SH de surtos alimentares foram caracterizados utilizando a enzima *XbaI* e esta foi eficiente em gerar diferentes padrões para o sorovar (DEMEZUCK et al.,2003). Amavisit et al (2001), por sua vez, analisaram 28 amostras de SH isoladas de eqüinos, utilizando as enzimas *XbaI* e *BlnI*, as quais geraram 6 e 5 padrões de cortes de DNA, respectivamente. Dentre as amostras de SH analisadas para subseqüente

inoculação em aves, duas apresentaram-se não relacionadas no PFGE (SH23 e SH35), sendo que a SH35 obteve a presença do gene *agfA* e a SH23 não (Artigo 1, Tabela 1). A fimbria agregativa (Tafi) é identificada em *Salmonella* pelo *operon agf* e o gene *agfA* codifica sua maior sub-unidade. A Tafi é essencial na formação da matriz extracelular, a qual está envolvida com agregação de bactérias, formação de biofilmes, formação de película e sobrevivência no meio ambiente. Também esta relacionada com propriedades patogênicas, envolvendo ligação de fibronectina, aumentando a capacidade de aderência e invasão na célula hospedeira e apresentando atividade pró-inflamatória. Nos artigos 2 e 3 gerados nesta tese, não foi possível inferir que a cepa SH35 (com a presença do gene *agfA*) provocou maior reação inflamatória, por não ter sido realizado seqüenciamento da PCR e também por haver outros genes e proteínas importantes e não caracterizados neste estudo, que possam ter correlação com tal fato. Contudo, a maior quantidade de cortes de ceco com reação inflamatória foi significativamente superior para a cepa SH35 frente a cepa SH23, podendo haver relação com a presença deste gene e para maiores conhecimentos, estudos subseqüentes devem ser realizados, embasado no conhecimento de que os genes da Ilha de Patogenicidade 1, onde o gene *agfA* está localizado, são os principais genes determinantes da adesão e invasão intestinal das *Salmonella* (Hensel, 2000; Marcus et al., 2000; Hansel-Wester & Hensel, 2001; Portillo, 2001; Wigley et al., 2002).

A resistência das cepas de SH a alguns antimicrobianos de interesse na área de veterinária e na área de saúde humana foi verificada pelo teste de difusão em disco (BAUER et al., 1966). No presente trabalho as cepas SH23 e SH35 apresentaram, resistência ao ceftiofur e ceftiofur + doxiciclina, respectivamente (Artigo 1, Tabela 1). O uso generalizado de medicamentos antimicrobianos na alimentação animal tem resultado no aparecimento de estirpes resistentes antimicrobiana de agentes patogênicos alimentares, tais como a *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Campylobacter*, bem como, bactérias endógenas a microflora de animais conforme Davis et al. (1999). A resistência a droga ceftiofur (cefalosporina de terceira geração utilizada apenas em animais) entre os isolados de SH está altamente correlacionados com a resistência à ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico e cefoxitina (padrão resistência A2C-AMP). Também é associada com susceptibilidade reduzida (resistência intermediária) para a ceftriaxona, outra cefalosporina de terceira geração utilizados exclusivamente em seres humanos e é

uma droga de escolha para o tratamento de salmoneloses extra-intestinais em crianças e mulheres grávidas (SHEA, 2004). Devido a este fato, os pacientes com infecção extra-intestinal causada por cepas de SH com resistência intermediária a tais drogas, correm o risco de falha na terapia com ceftriaxona (PAHC, 2006).

Analisando-se as *Salmonella* inoculadas em pintos, SE, SH23 e SH35, as três cepas alcançaram o fígado no momento da primeira coleta, às 6h. As amostras SH35 e SE tiveram contagem de células bacterianas, maior que 2 log às 6 horas pi e a amostra SH23, por sua vez, apresentou este valor somente às 18 horas (Tabela 2, Artigo 1 e Tabela 1, Artigo 3), sugerindo um pico de infecção do fígado mais tardio. A contagem de *Salmonella* nos cecos mostrou diferença significativa para as três cepas somente às 12 horas pi, com uma elevação do número de células frente às 6 horas pi e subsequente aumento na contagem até os 3 dias pi (Tabela 2, Artigo 1 e Tabela 1, Artigo 3). A colonização intestinal de pintos, por ambas as cepas, determinou o estado de aves portadoras, até os 21 dias pi, como demonstrado no perfil de excreção traçado para SE e SH35 (Tabela 3, Artigo 3). Ainda na avaliação da excreção fecal SH35 e SE, pode-se notar que aos 2 dias pi, quando realizado suabe de cloaca nas aves, a contagem foi menor do que àquela apresentada nos cecos dos pintos para as mesmas cepas. Aos 13 e aos 20 dias pi, as aves contaminadas com SH35 apresentaram menor excreção fecal de *Salmonella*, sendo que este fato pode ter ocorrido devido a capacitação do sistema imune das aves, fazendo com que o *clearance* do sorovar *S. Heidelberg* fosse mais eficiente que o de *S. Enteritidis*.

A colonização de *Salmonella* é influenciada pela idade de ave, via de inoculação e sorovar e está sob controle genético aves (SADEYEN et al., 2004) e a colonização de órgão internos ou intestino está sob comando de dois sistemas diferentes na *Salmonella*, Ilhas de Patogenicidade 2 e 1, respectivamente (HENSEL, 2000). Estudos demonstraram que a relação de severidade entre colonização cecal por *Salmonella* ou em órgãos sistêmicos foi inversa nas aves, independente da idade e da dose inoculada (KRAMER et al., 2001, SADEYEN et al., 2004).

No estudo da excreção fecal de SH35, também foi demonstrada a intermitência de excreção nos três últimos dias do experimento, quando suabes foram coletados a cada 12 horas (Resumo 2). Ao menos em uma das coletas as aves apresentaram-se positivas, demonstrando que todos os animais estavam infectados até os 21 dias pi. Neste contexto,

é possível sugerir que o método de monitoria de *Salmonella* por suabes de cloaca têm valor limitado, assim como sugerido pelos pesquisadores Van Immerseel et al., (2004) e Andrade et al., (2007) que também demonstraram a intermitência de excreção fecal de *Salmonella* Enteritidis.

Na avaliação da morfologia intestinal dos pintos inoculados com SE, SH23 e SH35, cabe lembrar que a morfologia intestinal pode variar influenciada pelas características da dieta, estresse calórico e agentes patogênicos, dentre outros fatores (ALVARENGA et al., 2004). Quanto às criptas, de acordo com Hancock (1990) a profundidade da cripta é um indicativo do nível de hiperplasia das células epiteliais, sendo que a redução da profundidade indica um menor nível de agressão à morfologia da parede intestinal. O aumento da proliferação celular nas criptas determina o aparecimento de enterócitos imaturos, que apresentam baixa capacidade absorptiva, bem como reduzida atividade das enzimas (BUTS, et al., 1987). Para a relação vilosidade/cripta intestinal, o desejável é quando as vilosidades se apresentam altas e as criptas rasas (NABBURS, 1995).

As medidas das vilosidades e criptas de cecos dos pintos foi realizada em sete momentos a partir das 6 horas pi (Artigo 1 e Artigo 3). Analisando as três cepas inoculadas pode se perceber que a SE apresentou as relações vilosidade:cripta menores, na média geral. Ao observar a profundidade das criptas (dados não apresentados nos artigos, mas utilizados para calcular a relação vilosidade:cripta) o grupo SE apresentou em todos os momentos maior profundidade. Pode ser sugerido que apesar da altura das vilosidades terem sido próxima à do grupo controle, o aumento no tamanho das criptas indica que estava ocorrendo produção de células para reposição, significando que a vilosidade foi lesada pela SE.

Para os grupos SH 23 e SH 35, estes apresentaram mesmo valor VH ou maior que o grupo controle. A maior relação VH:CD foi encontrada nas duas cepas, exceto às 18 h pi, quando a relação VH:CD do grupo controle foi maior que a relação do grupo SH23, porém não diferente de SH 35. O alto valor de VH:CD nos grupos SH, pode ter sido causado pelo aumento da proliferação para a reposição de células da vilosidade (HANCOCK, 1990).

Na microscopia eletrônica (Artigo 3) foi descrita a possível presença de edema das vilosidades, fato que também poderia ter acontecido nos cecos e proporcionaria o aumento de tamanho da vilosidade.

A necessidade de alternativa ao uso de antimicrobianos em frangos apresenta algumas possibilidades como citado na revisão bibliográfica. Neste trabalho foi realizado o teste de uma mistura de ácidos orgânicos e óleos essenciais a fim de saber se esta alternativa para o controle de SE seria eficiente (Artigo 2). Os resultados apresentados mostraram que na coleta de suabes aos 2 dias pi o grupo T2 (inoculado com SE e sem a mistura na ração), não apresentou excreção e os grupos com as duas diferentes doses da mistura apresentaram. Este fato pode ser atribuído à capacidade dos ácidos mudarem o meio ambiente do lúmen intestinal e devido a sua ação de inativação de alguns genes de invasibilidade das *Salmonella* (LAWAHON, et al., 2002; VAN IMMENSEEL et al., 2003; 2004). A partir do momento que a excreção de SE não foi mais detectada nos grupos tratados, a mistura de ácidos orgânicos e óleos essenciais foi retirada da ração e então, na coleta dos 20 dias pi, as aves tornaram a excretar SE. Este fato sugere que o uso desta mistura de ácidos orgânicos e óleos essenciais deve ser contínuo, assim como também sugerido para uso de água acidificada no controle de *Salmonella* (Ávila et al., 2003). Não houve diferença significativa nas contagem de SE entre os grupos com diferentes doses da mistura, sugerindo que a ação do produto não foi dose dependente.

Concluindo estes estudos, a presença de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* em pintos pode ocasionar alterações intestinais, como foi demonstrado. Este fato torna-se importante, pois se sabe que as enteropatias pré e neonatais podem causar prejuízos ao sistema imune e baixos parâmetros zootécnicos nas aves adultas (MAIORKA, 2004; ITO et al. 2007).

No presente trabalho foi possível notar que as duas cepas utilizadas de *S. Heidelberg* apresentaram diferentes danos quando inoculados em pintos, fato este que também ocorreu entre os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* testados. Neste contexto, Gast (2007) sugere focar o controle ao nível de sorovares em poedeiras, matrizes, perus ou frangos de corte, pois parece ser mais relevante para um programa de controle de *Salmonella*.

5 CONCLUSÕES

- Os protocolos desenvolvidos para a pesquisa do gene *agfA* e *lpfA*, e o protocolo de contagem de *Salmonella* a partir de suabes de cloaca foram eficientes;
- A partir das 65 amostras de *S. Heidelberg* foi possível encontrar quatro padrões eletroforéticos na técnica de PFGE, utilizando a enzima *XbaI* e dentre as amostras, as cepas SH23 e SH35 foram os clones com maior diferença genética;
- Todas as amostras de *S. Heidelberg* apresentaram o gene *lpfA* e *invA*, enquanto somente 6 amostras apresentaram o gene *agfA* (SH23 *lpfA* e SH35 *lpfA* e *agfA*);
- As amostras de *S. Heidelberg* inoculadas apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados;
- Os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* apresentaram diferentes resultados nas análises microbiológicas e de morfometria intestinal quando inoculados em pintos, assim como as duas cepas de *S. Heidelberg* selecionadas por sua diferença a nível molecular, também apresentaram;
- A *S. Heidelberg* foi capaz de atingir o fígado e causar lesão em cecos de pintos de corte, bem como persistir em frangos de corte e ser excretada intermitentemente,
- Observou-se diferença morfométricas nos cecos entre as duas cepas de *S. Heidelberg* analisadas;
- A mistura de ácidos orgânicos e óleos essenciais foi eficiente no controle da excreção fecal de SE quando usada continuamente a partir do primeiro dia de vida.

REFERENCIAS

- AHO, M. Problems of *Salmonella* sampling. **Journal of Food Microbiology**, v.15, p.2461-2468. 1992.
- ALVARENGA, B.O; BELETTI, M.E; FERNANDES, E.A. et al. Efeitos de fontes alternativas de fósforo nas rações de engorda e abate sobre a morfologia intestinal de frangos de corte. **Bioscience Journal**, v.20,n.3, p.55-59. 2004.
- AMAVISIT, P.; MARKHAM, P.F.; LIGHTFOOT, D. et al. Molecular epidemiology of *Salmonella* Heidelberg in a equine hospital. **Veterinary Microbiology**, v.80, p.85-98. 2001.
- AVILA, L.A.F.; NASCIMENTO, V.P.; CANAL, C.W. et al. Effect of acidified drinking water on the recovery of *Salmonella* Enteritidis from broiler. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, p.183-188. 2003.
- BABU, U.; TAJIMA, O.; WATARAI, M. et al. Effects of rearing conditions on the colonization of *Salmonella* Enteritidis in the cecum of chicks. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.251-257. 2004.
- BACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J.A. Monitoria e controle de *Salmonella*: aspectos práticos. VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. **Anais**. Chapecó, p.95-103.2006.
- BAILEY, J. S. Integrated colonization control of *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, v.67, p. 928-932. 1988.
- BAILEY, J. S.; STERN, N. J.; FEDORKA-CRAY, P.; et al. Sources and movement of *Salmonella* through integrated poultry operations: a multistage epidemiological investigation. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 11, p. 1690-1697. 2001.
- BÄUMLER, A.J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analyses of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.2087-2097. 1995.
- BEAL, R. K.; WIGLEY, P.; POWERS, C. et al. Age at primary infection with *Salmonella* enteric serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.100, p.151-164. 2004.
- BEAUMONT, C.; PORTAIS, J.; PITEL, F. et al. Effect of two candidate genes on the *Salmonella* carrier state in fowl. **Poultry Science**, v.82, n.5, p.721-726. 2003.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S.A.; IRINO, K. et al.. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.24, n.1, p.22-25, 1993.

BERSOT, L.S. *Salmonella* no Brasil: sua importância no abate de aves. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 2006, Santa Maria **Anais**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria.

BERTHELOT-HÉRAULT, F., MOMPART, F., ZYGMUNT, M.S. et al. Antibody response in the serum and gut of chicken lines differing in cecal carriage of *Salmonella* Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.96, p.43-52. 2003.

BORSOI, A.; MORAES, H.S.; SALLE, C.T.P.S. et al. Excreção de *Salmonella* Enteritidis e Heidelberg inoculadas em pintos de corte e avaliadas por suabes de cloaca. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v.10, p.232. 2008.

BORSOI, A.; MORAES, H.S.; SALLE, C.T.P.S. et al. Protocolo para contagem de *Salmonella* a partir de suabes de cloaca. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v.10, p.233. 2008.

BORSOI, A.; SANTIN, E.; DINIZ, G. S.; NASCIMENTO, V. P. Excreção de *Salmonella* Enteritidis e Heidelberg Inoculadas em Pintos de Corte e Avaliada por Suabe de Cloaca. **Revista Brasileira de Ciencia Avícola**, v.10, p. 232-232. 2008.

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

BYRD, J. A.; DeLOACH, J. R.; CORRIER, D. E.; et al. Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. **Avian Disease**, v. 43, p. 39-47, 1999.

CARDOSO, B; ROCHA, L.C. Controle de salmonelas em avicultura através do uso de vacinas. In: V SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM. **Anais**. Santa Maria, p.95-99. 2006.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R. V. et al. Summary of National Reports of foodborn outbreaks of salmonella Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v.69, n.5, p.1150-1153. 2006.

CLOUTHIER, S.C.; MÜLLER, K-H.; DORAM, J.L et al. Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.9,p. 2523-2533. 1993.

COCOLIN, L.; MANZANO, M.; CANTONI, C. et al. Use of polimerase chain reaction and restriction enzyme analysis to directly detect and identify *Salmonella* Typhimurium in food. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.673-677. 1998.

CORRY, J. E. L.; ALLEN, V. M.; HUDSON, W. R.; et al. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. **Journal of Applied microbiology**, v. 92, p. 424-432, 2002.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p.405-428.1999.

DAVIS, M.A.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella* enteric serovar Typhimurium isolates from humans and cattle in the Northwestern United States. **Emerging Infectious Disease**, v.5, p.802-806.1999.

DEMEZUK, W.; SOULE, G.; CLARK, C. Phage-based typing scheme for *Salmonella* enteric Serovar Heidelberg, a causative agent of food poisonings in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, p.4279-4284. 2003.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis phage type four. **Poultry Science**, v.77, p.73-74. 1998a.

DESMIDT, M; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* hadar in chickens. **Veterinary Microbiology**, v.60, p.259-269.1998b.

DIBNER, J.J.; P. BUTTIN. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal Applied of Poultry Research**, v.11, p.453-463. 2002.

DICKEL, E. L. **Tese de Doutorado**: utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2004. 137p.

DOYLE, M. P.; CLIVER, D. O. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne Disease**. San Diego: Academic Press, 1990.

DUCHET-SUCHAUX, M.; LECHOPIER, P.; MARLY, J. et al. uantification of experimental *S. enterica* serovar Enteritids carrier-state in B13 leghorn chicks. **Avian Disease**, v.39, p.768-803. 1995.

ECHEITA, M. A.; HERRERA, S.; GARANIZAR, J. et al. Multiplex- PCR based detection and identification of most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. **Research in Microbiology**, v.153, p.107-113, 2002.

FOLKESSON, A.; ADVANI, A.; SUKUPOLVI, S. et al. Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. **Molecular Microbiology**, v.33, n.3, p. 612-622. 1999.

FREITAS, E.I.; LEMOS, A.A.; MARIN, V.A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.11, n.4, p.1073-1083. 1994.

FREUDENBERG, M. A.; MERLIN, T.; GUMENSCHWEIMER, M. et al. Bacteria-induced hypersensitivity to endotoxin. **Innate Immunity**, v.5, p. 231-238. 1999.

GALVANI, A. L. S.; REBS, V L J.; VAZ, F. A. C. Características bioquímicas e propriedades dos mediadores humorais nas infecções bacterianas. Disponível em: <URL:<http://www.pediatriasopaulo.usp.br>> Acesso em 26 jan. 2006

GAST, R; BEARD, C.W. Isolation of *Salmonella* Enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. **Avian Disease**, v.34, p.991-993. 1990.

GAST, R.; GUARD-BOULDIN J.; HOLT, P. S. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* Heidelberg or *Salmonella* Enteritidis. **Avian Disease**, v.48, p. 863-869. 2004.

GAST, R.; GUARD-BOULDIN J.; HOLT, P.S. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strain *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. **Avian Disease**, v.49, p.382-386. 2005.

GAST, R.; GURAYA, R.; GUARD-BOULDIN J. et al. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. **Avian Disease**, v.51, p.40-44. 2007.

GAUTHIER, R. Organic acids and essential oils, a realistic alternative to antibiotic growth promoters in poultry. 2005. URL < <http://www.jefo.ca/pdf/avicola/AnaisAveExpo-R.Gauthier.pdf> Acesso em 27 de novembro de 2005.

GIBSON, D.L.; WHITE, A.P.; RAJOTE, C.M. et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v.153, p.1131-140. 2007.

GUO, X.; CHEN, J.; BEUCHAT, L.R. et al. PCR detection of *Salmonella* enteric serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from H1A. **Applied and Environmental Microbiology**, p.5248-5252. 2000.

HANCOCK, J.D.; PEO, E.R.J.R.; LEWIS, A.J. et al. Effects of ethanol extraction and heat treatment of soybean flakes on function and morphology of pig intestine. **Journal of Animal Science**, v.68, p.3244-3251. 1990.

HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, v.3, p.549-559. 2001.

HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology*, 36, 5, 1015-1023. 2000.

HIRSH, D.C. *Salmonella*. In: **Microbiologia Veterinária**, Ed. Guanabara Koogan S.A. p.70-73. 2003.

HOFER, E.; FILHO, S. J. S.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p.55-62.1997.

IKUMO, A.A.; KANASHIRO, A.M.I.; KIYOTA, S. et al. Multiplex PCR for accurate diagnosis of poultry infection by using *Salmonella invA*, *sefD* and *spvC* genes sequences as molecular markers. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.71, p.579-581. 2004.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. L.; OKABAYASHI, S. M. Saúde intestinal em frangos de corte. Circular Técnica Aviação do Brasil. Disponível em: URL<http://www.agrocerosross.com.br/images/noticias/384CircularTecnicaAviagen_200711.pdf>. Acesso em 27 de junho de 2007.

KUMAR, S.; BALAKRISHNA, K.; BATRA, H.V. Detection os *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polimerase chain reaction in multiplex format. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p.149-154. 2006.

LAWHON, S.D.; MAURER, R.; SUYEMOTO, M. et al. Intestinal short fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. **Molecular Microbiology**, v.46, p.1451-1464. 2002.

LIBBY, S. J.; LESNICK, M.; HASAGAWA, P.; et al. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. **Cellular Microbiology**, V. 2; n. 1; p. 49-58, 2000.

LIBBY, S.J.; HALSEY, T.A.; ALTIER, C. et al. *Salmonella*. In: **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 3ed. Blackwell Publishing. 2004. USA.

MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, J.C.; BARRELI, C. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia- uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p. 155-161. 2005.

MAIORKA, A.; FISCHER DA SILVA, A.V.; SANTIM, E. et al. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.487-490. 2000.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. **Anais**. Chapecó, p.26-41. 2004.

MAPA (Ministério da Agricultura , Abastecimento e Pecuária). 2003. Diário Oficial da União. Instrução Normativa, SDA Nº 62, de 26 de agosto de 2003.

MARCUS, S.L., BRUNEL, J.H., PFEIFER, C.G. et al. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v.2, p.145-156. 2000.

McBRIDE, B.W.; KELLY, J.M.. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2997-3010. 1990.

McCLELAND, M., SANDERSON, K.E.; CLIFON, S.W. et al. Comparison of degradation in Paratyphi A and Thyphi, human-restricted serovars of Salmonella enteric that cause typhoid. **Nature Genetics**, p 1-7. 2004.

NABUURS, M.J.A. Microbiological, structural and functional changes of the small intestine of pigs at weaning. **Pig News and Information**, 16, 3, p.93-97. 1995.

NASCIMENTO, V. P. Salmonelose aviárias: uma revisão. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE MATRIZES DE CORTE,1. **Anais**, Chapecó, p.51-61. 1995.

NETO, C.C; ASSAFF FILHO, J.M.; NUNES, L.A. Biossegurança - Roedores. Disponível em URL<[http:// www.aviculturaindustrial.com.br/site/ dinamica.asp?id=1586&tipo_tabela=cet&categoria=manejo](http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=1586&tipo_tabela=cet&categoria=manejo)> Acesso em 16 de novembro de 2005.

NOY, Y.; SKLAN, D. Metabolic responses to early nutrition. **Journal Applied Poultry Research**, v.7, p.437-451. 1998.

OCHOA, I.M.; RODRIGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.47, n.1-2, p. 25-42.2005.

OKAMURA, M.; TACHIZAKI, H.; KUBO, T. et al. Comparative evolution of bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella* enteric serovars Enteritidis, Typhimurium and Gallinarum biovar Pullorum using four different challenge models. **Vaccine**, v.25, p.4837-4844. 2007.

OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; MICHAEL, G. B.; et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, supl. 1, p. 123-124, 2003.

PHAC (Public Health Agency of Canada). *Salmonella* Heidelberg - Ceftiofur-related resistance in human and retail chicken isolates. Disponível em: URL<[http:// www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/pdf/heidelberg_e.pdf](http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/pdf/heidelberg_e.pdf)>. (2006). Acesso em 12 de maio de 2008.

POPPE, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: SAEED, A.M.; GAST, R.K.; POTTER, M.E. et al. (Eds.) **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals**. Ames: Iowa State University Press, 1999. p.3-18.

RAJASHEKARA, G.; MUNIR, S.; ALEXEYEV, M.F. et al. Pathogenic role of SEF 14, SEF17 and SEF21 fimbriae in *Salmonella* entérica serovar Enteritidis infection of chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, p.1759-1763. 2000.

ROCHA, P.T.; MESQUITA, A.J.; ANDRADE, M.A. et al. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n6, p.672-676. 2003.

ROLAND, K.; TINGE, S.; WARNWER, E.; SIZEMORE, D. Comparison of different attenuation strategies in development a *Salmonella* Hadar vaccine. **Avian Disease**, v.48, p.445-452. 2004.

ROTGER, R.; CASADESÚS, J. The virulence plasmids of *Salmonella*. **International Microbiology**, v. 2, p. 177-184, 1999.

ROY, P.; DHILLON, A. S.; LLOYD, L. H.; et al. Results of *Salmonella* isolation from poultry products, poultry, poultry environment, and other characteristics. **Avian Disease**, v.46, p. 17-24, 2002.

RYCHLIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECCKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 621-632, 2006.

SADEYEN, J-R.; TROTTEREAU, J.; VELGE, P.; et al. *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. **Microbes Infection**, p.1278-1286. 2004.

SANTURIO, J.M.; SANTURIO, D.F.; POZZATTI, P. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* entérica de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, p.803-808. 2007.

SAUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, N. et al. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.113-117. 1999.

SAUMET, C.; ERMEL, G.; FACH, P. et al. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, p.294-298. 1994.

SHACKELFORD, A. D. Modifications of processing methods to control *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, v. 67, p. 933-935, 1988.

SHEA, K.M. Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics. **Pediatrics**, v.114, p.862-868. 2004.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns procedure by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.sep, p. 2233-2239. 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT,R.D.; RICHARD, M.D. et al. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologist. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.18, n.6, p. 426-439. 1997.

THOMPSON, K. L.; APPLGATE, T. J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broiler. **Poultry Science**, v.85, p.1535-1540. 2006.

VAN ASTEN, A. J. A. M.; VAN DIJK, J. E. Distribution of classic virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, p. 251-259. 2005.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; et al. Invasion of *Salmonella* Enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.237-248. 2003.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F. et al. Intermittent log-term shedding and induction if carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, v.83; p.1911-1916. 2004.

UI-HASSAN, S.; VERMA, V.;QUAZI, G.N. Rapid detection of *Salmonella* by polimerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, p.333-339. 2004.

WINGLEY, P.; HULME, S.D.; BUMSTEAD, N. et al. In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the *SALI* locus. **Microbes and Infection**, v.4, p.1111-1120. 2002.

WANG, S-J.; YEH,D-B. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella* Enteritidis in foods and fecal samples. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.422-427. 2002.

YAMAUCHI, K.E.; ISSHIKI, Y. Scanning electron mocroscopic observatio on the intestinalvilli in growing White Leghorns and broiler chicken, from 1 to 30 days of age. **British Poultry Science**, v.32, p.67-78. 1991.

YETHON, J. A.; VINOGRADOV, E.; PERRY, M. B. et al. Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by *waaG* destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.5620-5623. 2000.

ANEXO A – Comprovante de aceite do Artigo 1 na Revista Poultry Science.

Poultry Science - PS-08-00466.R2

Domingo, 7 de Dezembro de 2008 12:37

De: "scanes@uwm.edu" <scanes@uwm.edu>

Para: anderliseb@yahoo.com.br

* pscopyright.pdf (61 KB)

Nenhuma ameaça de vírus foi detectada Arquivo: * pscopyright.pdf [Fazer download de arquivo](#)

Norton
AntiVirus

07-Dec-2008

Dear Dr. BORSOI:

The Editorial Board of Poultry Science is pleased to announce that your manuscript PS-08-00466.R2 "INOCULATION OF NEWLY HATCHED BROILER CHICKS WITH TWO BRAZILIAN ISOLATES OF Salmonella Heidelberg STRAINS WITH DIFFERENT VIRULENCE GENE PROFILE, ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS PATTERN TO INTESTINAL CHANGES EVALUATION." has been accepted for publication in the journal.

Your paper has been forwarded to the Editorial Office for processing. You should receive author proofs for your final review within approximately 3 months time. If you have any questions, please contact the editorial office (journals@assochg.org).

Note that a copyright form signed by all authors must be on file at the editorial office before your paper can be published. If you have not already done so, please complete the attached form and fax (217-378-4083) it to them.

On behalf of the Editors of Poultry Science, we look forward to your continued contributions to the journal.

Sincerely,
Dr. Colin Scanes
Editor-in-Chief, Poultry Science
scanes@uwm.edu, cscanes@wi.rr.com

ANEXO B – Comprovante de submissão do Artigo 2 submetido à Revista Poultry Science.

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Poultry Science*.

Manuscript ID: PS-08-00409

Title: Mixture of Organic Acids and Essential Oils as an Alternative for Controlling the Fecal Excretion of Salmonella in Broiler Chickens

Authors: BORSOI, ANDERLISE
Santin, Elizabeth
Santos, Luciana
Diniz, Giankleber
Salle, Carlos
Moraes, Hamilton
Nascimento, Vladimir

Date Submitted: 24-Sep-2008

 **Print**  **Return to Dashboard**

Manuscript Central™ v4.1.1 (patent pending). © ScholarOne, Inc., 2008. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of
ScholarOne, Inc.

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

