

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Victória Veiga Alves

**EFEITOS DA INOCULAÇÃO *IN OVO* DE PEPTÍDEOS BACTERIANOS E CpG-
ODN NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE AVES *SPF* POR *Salmonella enterica*
SOROVAR Heidelberg**

Belo Horizonte

2023

Victória Veiga Alves

**EFEITOS DA INOCULAÇÃO *IN OVO* DE PEPTÍDEOS BACTERIANOS E CpG-
ODN NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE AVES *SPF* POR *Salmonella enterica*
SOROVAR Heidelberg**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto

Belo Horizonte

2023

A955e Alves, Victória Veiga, 1997 -
Efeitos da inoculação *in ovo* de peptídeos bacterianos e CpG-ODN no controle da infecção de aves SPF por *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg / Victória Veiga Alves. – 2023.
57f: il

Orientador: Oliveira Caetano de Freitas Neto
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Inclui bibliografia f. 47 – 56.

1- Ave - Teses - 2 – Medicina Veterinária – Teses – I – Freitas Neto, Oliveira Caetano – II – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III – Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

VICTÓRIA VEIGA ALVES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovada em 07 de fevereiro 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto - Presidente - Orientador

Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva

Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins



Documento assinado eletronicamente por Oliveira Caetano de Freitas Neto, Professor do Magistério Superior, em 07/02/2023, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Nelson Rodrigo da Silva Martins, Professor do Magistério Superior, em 07/02/2023, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Mauro de Mesquita Souza Saraiva, Usuário Externo, em 07/02/2023, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2027002 e o código CRC B9859E2B.

Dedico esse trabalho à minha avó, Neide
(*in memoriam*), que sempre esteve ao
meu lado e foi a maior incentivadora e
apoiadora dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que está sempre me guiando e abençoando o caminho em direção aos meus sonhos. À minha família que está comigo em todos os momentos, principalmente à minha avó, Neide (*in memoriam*), que esteve ao meu lado em cada etapa da minha vida e foi a maior entusiasta das minhas realizações. À minha irmã, Dara e aos meus pais, Sergio e Amanda, que fazem do meu sonho o deles e me apoiam em todos os momentos, fazendo tudo valer a pena.

Ao meu orientador, Prof. Oliveira Caetano de Freitas Neto, por todos os conhecimentos passados a mim, pela ótima orientação, boa vontade e por estar sempre à disposição de ensinar. Ao Prof. Nelson, Prof. Leonardo, Prof. João, Prof. Jenner, Prof^a. Roselene e Prof. Rafael pelas valiosas contribuições para o meu estudo.

Às pessoas que estiveram ao meu lado durante o experimento e contribuíram grandiosamente para o meu estudo, Dayse, Letícia, Mailson, Eric, Júlia, Derci, Grazi, Thaís, Rodrigo, Yasmin, Pedro e Matheus. À minha melhor amiga, Laryssa, que mesmo de longe sempre se fez presente em todos os momentos. Agradeço à toda equipe do Laboratório de Doenças das Aves, onde conheci pessoas incríveis que alegraram os meus dias e a todos os amigos que fiz durante o período de pós-graduação.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva que tive oportunidade de ter aulas, por todos os ensinamentos que foram imprescindíveis para o sucesso deste trabalho e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade. Agradeço também à Universidade Federal de Minas Gerais e a Escola de Veterinária por proporcionarem a execução desta pesquisa e pelo conhecimento que pude obter ao realiza-la.

Aos animais utilizados no estudo, que foram cruciais para a realização do experimento e contribuíram imensamente para minha formação.

Agradeço aos órgãos de fomento PRPq-UFMG, FAPEMIG, CAPES e ao CNPq pela bolsa de mestrado. À banca examinadora por estarem presentes e terem aceitado meu convite de avaliação do trabalho. Por fim, agradeço a todos que contribuíram, mesmo que indiretamente, para que eu concluísse mais essa etapa da minha vida profissional.

Agradeço de coração!

RESUMO

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorovar Heidelberg (SH) possui relevância tanto para a produção avícola como para a saúde pública. Isolados cada vez mais patogênicos e resistentes aos antimicrobianos representam uma preocupação mundial. Portanto, novas abordagens para a prevenção e controle da infecção por essa bactéria são necessárias. O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial efeito protetor da inoculação *in ovo* de uma formulação de peptídeos bacterianos adicionados ou não de CpG-oligodeoxinucleotídeo (CpG-ODN) frente à infecção por SH em aves. Para isso, foram analisados genomas de SH disponíveis em bancos de dados públicos dos quais foram extraídas sequências de proteínas estruturais e/ou de maior relevância para a colonização intestinal. Tais sequências foram submetidas aos preditores de epítomos lineares para seleção dos peptídeos de maior imunogenicidade. 180 ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF) foram incubados e, aos 18 dias de incubação, foram separados em grupos e receberam as formulações via fluido amniótico, conforme descrição a seguir. Grupo A (embriões que receberam peptídeos + CpG-ODN), B (embriões que receberam somente peptídeos), C (embriões que receberam somente CpG-ODN), D (embriões que receberam PBS) e ovos intactos. No terceiro dia pós-eclosão, as aves dos grupos A, B, C e D foram desafiadas com 0,2 mL de inóculo contendo $5,6 \times 10^3$ unidades formadoras de colônia (UFC) de SH. Aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi), cinco aves de cada tratamento foram eutanasiadas e tiveram seus fígados, conteúdo cecal e segmentos intestinais coletados. A colonização cecal e infecção sistêmica foram avaliadas por meio da contagem de UFC de SH em conteúdo cecal e fígado. A excreção fecal de SH foi monitorada por meio de suabes cloacais coletados de todas as aves duas vezes por semana. Além disso, foi realizada a análise histomorfométrica do duodeno. Notou-se que, aos 7 dpi, as aves do grupo A (peptídeos + CpG-ODN) apresentaram menor quantidade de SH em conteúdo cecal quando comparadas às do grupo D (PBS) ($P < 0,05$). As formulações utilizadas nos embriões não reduziram a excreção fecal de SH ao longo do estudo. As contagens de SH se mantiveram nulas nos fígados das aves de todos os grupos infectados durante o estudo. Aos 21 dpi, as aves do grupo C apresentaram menor profundidade de cripta quando comparadas às do grupo D (controle infectado) ($P < 0,05$). Enquanto que aos 28 dpi, as aves também do grupo C exibiram maior média de altura de vilosidades quando comparadas às aves dos demais grupos infectados ($P < 0,05$). Os resultados indicaram que a inoculação *in ovo* de peptídeos + CpG-ODN auxiliou na diminuição da colonização cecal de SH na primeira semana pós-infecção, mas não reduziu a excreção fecal. Além disso, a inoculação de CpG-ODN, aparentemente, afetou positivamente a saúde intestinal das aves, as quais apresentaram melhora em parâmetros como a profundidade de cripta e altura de vilosidades ao final do estudo.

Palavras-chave: Avicultura. Colonização intestinal. Paratifo aviário. Proteção. Saúde intestinal.

ABSTRACT

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Heidelberg (SH) is relevant for both poultry production and public health. The increasing frequency of pathogenic and antimicrobial resistant isolates represents a worldwide concern. Therefore, new approaches for preventing and controlling infection by this bacterium are needed. The present study aimed at investigating the potential protective effects of *in ovo* inoculation of a formulation based on bacterial peptides solely or added with CpG oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) against SH infection in birds. For this, SH genomes sequences available in public databases were analyzed and the deduced amino acid compositions of structural protein sequences and/or those of greater relevance for intestinal colonization were selected. Such sequences were submitted to predictors of linear epitopes for the selection of peptides with greater immunogenicity. 180 embryonated eggs free of specific pathogens (SPF) were incubated and, at 18 days of incubation, they were separated into groups and received the formulations via amniotic fluid, as described below. Group A (embryos that received peptides + CpG-ODN), B (embryos that only received peptides), C (embryos that received only CpG-ODN), D (embryos that received PBS) and intact eggs. On the third post-hatching day, birds of groups A, B, C and D were orally challenged with 5.6×10^3 colony forming units (CFU) of SH. At 7, 14, 21 and 28 days post-infection (dpi), five birds from each treatment were euthanized and had their livers, cecal contents and intestinal segments collected. Cecal colonization and systemic infection were assessed by serial plating counts of cecal and liver contents. Fecal SH excretion was monitored using cloacal swabs collected from all birds twice a week. In addition, histomorphometric analysis of the duodenum was performed. It was noted that, at 7 dpi, the birds in group A (peptides + CpG-ODN) had a lower counting of SH in cecal content when compared to those in group D (PBS) ($P < 0.05$). However, the formulations used in the embryos did not reduce the overall SH-fecal excretion over the study. SH counts remained zero in the livers of birds from all infected groups during the study. At 21 dpi, the birds of group C had a lower crypt depth when compared to those in group D (infected control) ($P < 0.05$). At 28 dpi, the birds of group C did also have a higher villus height when compared to birds from the other infected groups ($P < 0.05$). The results suggested that *in ovo* inoculation of peptides + CpG-ODN may help to reduce cecal colonization of SH in the first week post-infection, although did not reduce total fecal excretion. In addition, the CpG-ODN inoculation may have positively affected the intestinal health of the birds, which showed improvement in parameters such as crypt depth and villus height at the end of the study.

Keywords: Poultry production. Intestinal colonization. Fowl paratyphoid. Protection. Gut health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Metodologia da inoculação de substâncias no fluído amniótico. A: câmara de ar; B: alantoide; C: fluido amniótico; D: embrião; E: saco vitelino. Extraído de Rocha; Maiorka (2013).26
- Figura 2.** Metodologia usada para realizar as mensurações de altura de vilosidade (seta preta) e profundidade de cripta (seta vermelha). 35
- Figura 3.** Média do número viável de unidades formadoras de colônias ($\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$) de *Salmonella* Heidelberg em conteúdo cecal de aves desafiadas aos três dias de idade. Amostras de 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi). Barras com letras diferentes no mesmo período pós-infecção indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)......38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de sorovares em cada espécie e subespécie de <i>Salmonella</i> spp.	16
Tabela 2. Proteínas estruturais selecionadas de <i>Salmonella</i> Heidelberg.	30
Tabela 3. Sequências de peptídeos selecionados para compor as formulações.	31
Tabela 4. Composição dos grupos experimentais.	31
Tabela 5. Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de peptídeos bacterianos adicionados ou não de CpG-ODN na taxa de eclosão e taxa de eclodibilidade dos ovos.	36
Tabela 6. Médias das contagens de <i>Salmonella</i> Heidelberg NaI ^r (SH) no conteúdo cecal e fígado das aves aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi).	38
Tabela 7. Recuperação de <i>Salmonella</i> Heidelberg NaI ^r (SH) de aves por meio de suabes cloacais colhidos aos 2, 6, 9, 12, 16, 20, 23 e 26 dias pós-infecção (dpi).	39
Tabela 8. Média \pm desvio-padrão dos parâmetros histomorfométricos do duodeno de aves desafiadas com <i>Salmonella</i> Heidelberg aos 7, 14, 21 e 28 dpi e aves do grupo controle em diferentes tratamentos.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica para aves
AVB	Ágar Verde Brilhante
BHI	Infusão de cérebro e coração
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CpG-ODN	Oligodeoxinucleotídeo com sequência CpG
CTLs	Linfócitos TCD8 ⁺ citotóxicos
DM	Doença de Marek
Dpi	Dias pós-infecção
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. tenella</i>	<i>Eimeria tenella</i>
GALT	Tecidos Linfóides Associados ao Intestino
HE	Hematoxilina eosina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HVT	Herpesvírus de peru
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
LITAF	Fator de necrose tumoral alfa induzido por lipopolissacarídeos
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MHC-I	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I
MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II
mL	Mililitros
Nal ^f	Resistente ao ácido nalidíxico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLR	Receptor <i>Nod-like</i>
OMPs	Proteínas de membrana externa
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> Gallinarum
<i>S. Pullorum</i>	<i>Salmonella</i> Pullorum

<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
SH	<i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovar Heidelberg
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SPF	Livre de Patógenos Específicos
SPI-1	Ilha de Patogenicidade 1
SPI-2	Ilha de Patogenicidade 2
SSTT	Sistema de Secreção do Tipo Três
Ta1	Resposta T auxiliar 1
Ta17	Resposta T auxiliar 17
Ta2	Resposta T auxiliar 2
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Importância da <i>Salmonella</i> na avicultura e saúde pública	15
3.1.2. <i>Salmonella</i> Heidelberg	18
3.2. Resposta imune contra <i>Salmonella</i>.....	20
3.2.1. Resposta imune inata	21
3.2.2. Resposta imune adaptativa	23
3.3. Vacinação <i>in ovo</i>.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Definição das soluções antigênicas.....	30
4.2. Incubação dos ovos, inoculação <i>in ovo</i> e aves experimentais	32
4.3. Bactéria e preparação do inóculo	33
4.4. Exames bacteriológicos.....	33
4.5. Análise histomorfométrica do duodeno	34
4.6. Análise estatística	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Taxa de eclosão e eclodibilidade	36
5.2. Bacteriologia.....	37
5.3. Análise histomorfométrica do duodeno	39
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorovar Heidelberg (SH) possui importância tanto para a produção avícola, por poder provocar o paratifo aviário, quanto para a saúde pública. A introdução de salmonelas paratíficas nas granjas avícolas pode acontecer de forma vertical ou horizontal (VOSS-RECH et al., 2019) e sua presença no ambiente de produção é um importante fator de risco para contaminação de produtos de origem avícola, como carne e ovos e, conseqüentemente, para sua transmissão aos consumidores desses produtos (ANTUNES et al., 2016). As aves acometidas geralmente não desenvolvem doença sistêmica, mas podem se tornar portadoras do agente no plantel (ZANETTI et al., 2019). No entanto, em humanos a bactéria possui capacidade de causar septicemia em indivíduos vulneráveis, como crianças e gestantes (COLLINEAU et al., 2020; VUGIA et al., 2004). O isolamento de cepas de SH cada vez mais virulentas e resistentes a antimicrobianos tem preocupado autoridades de saúde do mundo (MELO et al., 2021). Portanto, novas abordagens para prevenção e controle de SH na cadeia produtiva da avicultura se fazem necessárias.

A vacinação é o método mais eficaz na prevenção de doenças infecciosas em animais de produção (DALLOUL et al., 2005). Nesse contexto, a proteção das aves contra patógenos virais e bacterianos é uma medida com implicações positivas para a saúde pública e animal (VAEZIRAD et al., 2018). A vacinação *in ovo* é uma forma eficaz de estimular resposta imune precoce, aumentando a proteção contra doenças (JOHNSTON et al., 1993), sendo uma técnica amplamente usada em incubatórios para prevenção de infecções virais (VAEZIRAD et al., 2018). O método tem sido estudado e aplicado às diversas doenças como doença de Marek, doença de Gumboro, boubá aviária, doença de Newcastle e coccidiose (PEEBLES, 2018), mas essa tecnologia ainda não é empregada comercialmente na profilaxia de enfermidades bacterianas.

Em estudo prévio, foi relatado que o sistema imune do embrião de galinha é capaz de produzir resposta imunológica após ser exposto ao antígeno bacteriano flagelar FliC, derivado de *Salmonella* Enteritidis quando administrado *in ovo*, proporcionando elevados níveis de expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias no intestino e altos títulos de anticorpos no soro (VAEZIRAD et al., 2018). Além disso, o adjuvante oligodeoxinucleotídeo (CpG-ODN), o qual foi administrado em conjunto com os peptídeos no presente estudo, demonstrou-se capaz de estimular a imunidade inata em aves recém eclodidas, aumentando a resistência à infecção por *Salmonella* em pintainhos no estudo

conduzido por He et al. (2003) e resultou em diminuição na colonização cecal por *Salmonella* Enteritidis quando administrado *in ovo* na pesquisa feita por MacKinnon et al. (2009).

Neste trabalho, sequências de proteínas estruturais e/ou de maior relevância para a colonização intestinal de *Salmonella* Heidelberg foram obtidas de base de dados pública e submetidas a programas de predição de epítomos para seleção e, posterior, síntese de peptídeos lineares imunogênicos. Com os peptídeos obtidos, foram elaboradas formulações adicionadas ou não de CpG-ODN. Em seguida, ovos embrionados de aves livres de patógenos específicos (*SPF*) foram incubados e, no 18º dia de incubação, receberam as formulações antigênicas via fluido amniótico. Após a eclosão, as aves foram desafiadas com SH, sendo avaliadas a colonização cecal, infecção sistêmica e excreção fecal por 28 dias. Aliado a isso, foi realizada a avaliação morfométrica de vilosidades e criptas duodenais das aves.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O presente estudo objetivou investigar a influência da inoculação de embriões de galinhas *SPF* com formulações compostas por peptídeos bacterianos e CpG-oligodeoxinucleotídeo (CpG-ODN) na saúde intestinal e na infecção por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Heidelberg em pintainhos desafiados após a eclosão.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos das formulações compostas por peptídeos bacterianos e CpG-oligodeoxinucleotídeo (CpG-ODN) na saúde intestinal, excreção fecal, colonização intestinal, invasão sistêmica por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Heidelberg (SH) por meio de:

- Suabes cloacais realizados em todas as aves duas vezes por semana;
- Contagens de unidades formadoras de colônias de SH em conteúdo cecal e fígado;

- Análise histomorfométrica do duodeno.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Importância da *Salmonella* na avicultura e saúde pública

Atualmente o Brasil encontra-se na posição de maior exportador e terceiro maior produtor mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (1º lugar) e China (2º lugar). Em 2021 o país produziu 14,329 milhões de toneladas do produto, sendo 67,83% dessa produção destinada ao mercado interno e 32,17% à exportação para diversos países da África, América, Ásia, Europa, Oceania e Oriente Médio (ABPA, 2022). A expansão deste setor exige a criação das aves em altas densidades, facilitando a disseminação de patógenos como as bactérias do gênero *Salmonella*, agente infeccioso que possui importância sanitária para as aves e seres humanos (VOSS-RECH et al., 2019).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é composto pelas espécies *enterica* e *bongori*, sendo a espécie *Salmonella enterica* dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010). De acordo com o esquema de sorotipagem de White-Kauffman-Le Minor, baseado nas características dos antígenos somáticos O (lipopolissacarídeo), H (flagelar) e Vi (capsular) (DIECKMANN; MALORNY, 2011), o gênero *Salmonella* possui atualmente 2.659 sorovares descritos, sendo que destes, 1.586 pertencem a subespécie *enterica* (Tabela 1) (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014) grupo que desempenha papel importante na infecção de humanos e animais de sangue quente (BHUNIA, 2018).

Tabela 1. Número de sorovares em cada espécie e subespécie de *Salmonella* spp.

Gênero	Espécie	Subespécie	Número de sorovares descritos
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	1.586
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	522
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>arizonae</i>	102
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>diarizonae</i>	338
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>	76
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>indica</i>	13
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>		22
Total			2.659

Fonte: Adaptado de Issenhuth-Jeanjean et al. (2014)

Salmonella spp. são bacilos gram-negativos curtos não esporulados, anaeróbicos ou aeróbios facultativos e medem em média entre 0,7 a 1,5 µm de largura e 2,5 µm de comprimento, fermentam a glicose e descarboxilam aminoácidos. A maioria é móvel e possuem flagelos petríquios (exceto *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum e biovar Pullorum) (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020). Para sua multiplicação, a temperatura ótima é de 35 a 37°C e o pH ideal é entre 6 e 7. Pode atuar como patógeno intracelular facultativo e ser encontrado no trato intestinal de aves, répteis, insetos, animais domésticos e seres humanos (BHUNIA, 2018).

Em aves, principalmente Galliformes (aves galináceas), essas bactérias podem causar três enfermidades diferentes: a pulorose, causada por *Salmonella* Pullorum, o tifo aviário cujo agente é a *Salmonella* Gallinarum e o paratifo aviário que pode ser causado por qualquer outra salmonela. As últimas são denominadas de salmonelas paratíficas, não possuem hospedeiro específico e podem provocar infecções alimentares em seres humanos (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020). O tifo aviário é uma doença aguda septicêmica que afeta principalmente as aves adultas. Enquanto que a pulorose é caracterizada por desencadear septicemia acompanhada de diarreia esbranquiçada em aves jovens. O paratifo raramente causa doença sistêmica. Por outro lado, as aves podem tornar-se portadoras, disseminando a bactéria no plantel e levando à contaminação dos alimentos de origem avícola (GAST et al., 2009; ZANETTI et al., 2019).

Salmonella é um dos patógenos zoonóticos de maior impacto na saúde pública, causando três tipos de doença em humanos: as febres entéricas (*Salmonella* Paratyphi A, B e C), febre tifoide (*Salmonella* Typhi) e as enterocolites, causadas pelas demais salmonelas (SHINOHARA et al., 2008). A salmonelose é uma das enfermidades mais importantes do grupo de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), provocando sinais como diarreia, vômito, febre moderada, dor abdominal e perda de apetite. No Brasil, *Salmonella* spp. foi detectada como um dos agentes etiológicos mais prevalentes nos surtos de DTAs ocorridos entre 2000 a 2017, sendo *Salmonella* Enteritidis o sorovar mais isolado em surtos no estado de São Paulo e no Brasil no período entre 2000 e 2018, tendo como principal fonte de infecção produtos à base de ovos (COSTA, 2020). De acordo com o Ministério da Saúde, os surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar ocorridos entre 2012 a 2021, deram-se, em sua maioria, nas residências, restaurantes e padarias. Nesses casos, os principais alimentos associados foram a água e alimentos mistos (cuja composição possui ingredientes de diferentes grupos) contaminados por *E. coli* (29,6%), *Staphylococcus aureus* (12,9%) e *Salmonella* spp. (11,2%) (BRASIL, 2022).

A presença de *Salmonella* em produtos de origem avícola oferece risco à segurança alimentar (HAI et al., 2020). A carne de frango e seus derivados são veiculadores de DTAs causadas por essa bactéria e sua contaminação pode ocorrer em diferentes etapas, como durante o abate das aves, processamento da carcaça e vísceras, transporte e por meio de contaminação cruzada (COLLA et al., 2012). Enquanto que o ovo, por ser um alimento altamente nutritivo, é parte importante da dieta da população. No entanto, vale destacar que o mesmo é suscetível à contaminação por *Salmonella*, o que o torna uma fonte de contaminação para os consumidores (HAI et al., 2020).

No Brasil, o controle e prevenção dessas enfermidades se dá pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), instituído pela Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. O objetivo deste programa é atuar na prevenção e controle das enfermidades de interesse em avicultura e saúde pública, definindo ações para a certificação sanitária do plantel avícola nacional e auxiliando na produção de produtos de origem avícola saudáveis para o mercado nacional e internacional (BRASIL, 1994). A instrução normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003 apresenta as normas técnicas para certificação dos estabelecimentos avícolas como livres de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e livres ou controlados para *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (BRASIL, 2003). O controle e monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de perus e frangos de corte, assim como nos

estabelecimentos de abate e reprodução registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF) é realizado com base na instrução normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016. Esta tem como objetivo reduzir a prevalência de *Salmonella* spp. e constituir um nível apropriado de proteção ao consumidor por meio da adoção de medidas de controle específicas, monitoramento, gestão de risco e revisão periódica e sistemática dessas ações (BRASIL, 2016).

Existem diferentes portas de entrada para patógenos de origem alimentar no ciclo de produção avícola, seja no período de criação das aves, na planta de processamento ou no transporte e manuseio dos alimentos (BAKER; JAMES, 1997). A alta tolerância de *Salmonella* spp. ao estresse ambiental, sua ampla distribuição, resistência a diversos tipos de medicamentos e sua fácil adaptabilidade dificultam seu controle (CHEN et al., 2013). Dessa forma, a implementação de boas práticas de produção, análise de pontos críticos de controle, transporte e armazenamento adequado dos produtos, assim como medidas educacionais sobre o tema, são importantes ferramentas na prevenção dessas doenças (BAKER; JAMES, 1997).

3.1.2. *Salmonella* Heidelberg

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorovar Heidelberg (SH) foi descoberta em 1933, em Heidelberg, na Alemanha e em 1954 foi isolada pela primeira vez nos Estados Unidos (KALDHONE et al., 2017). No Brasil, SH foi identificada em amostras de fezes ou excretas, coração e fígado de aves em um estudo retrospectivo que analisou amostras colhidas entre 1962 e 1991 (HOFER et al., 1997). Sua introdução nas granjas avícolas pode acontecer de forma horizontal, via alimento e água contaminados, por exemplo, ou vertical, por meio de plantéis de aves reprodutoras infectados. SH pode viver por mais de dois anos na cama de frango, sendo que a limpeza e desinfecção incorreta do aviário pode levar à infecção de lotes futuros, evidenciando a importância desse componente na sua transmissão, principalmente quando reutilizada sem o tratamento correto (VOSS-RECH et al., 2019).

Em aves adultas e saudáveis a infecção por sorovares paratíficos geralmente é assintomática, mas quadros clínicos podem ocorrer em pintainhos recém-eclodidos (BARROW, 2000). SH pode se multiplicar em macrófagos, atingindo órgãos como baço, fígado, ovários, ovidutos, moela e pulmões por meio do sistema linfático e corrente sanguínea (CHAPPELL et al., 2009; VELLANO et al., 2022). Já em humanos, a infecção

pode resultar em doença leve ou moderada, mas complicações como septicemia e miocardite podem acontecer em indivíduos susceptíveis (COLLINEAU et al., 2020; VUGIA et al., 2004).

Nos Estados Unidos, entre os patógenos que causam DTAs, as infecções causadas por *Salmonella* spp. correspondem anualmente a 35% das hospitalizações e 28% das mortes (SCALLAN et al., 2011), sendo que no mesmo país SH está entre os cinco sorovares que mais causam salmonelose humana (KALDHONE; FOLEY; RICKE, 2017). No Brasil, SH tem sido frequentemente isolada de lotes de frangos de corte e produtos de origem avícola como carcaças de frango, coxas e asas nos últimos vinte anos (KIPPER et al., 2021). Ao avaliar a diversidade de sorovares de *Salmonella* spp. presentes em aves na região sul do Brasil, pesquisadores isolaram SH em 40,6% das amostras, representando o sorovar mais predominante no estudo (PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2013). Além disso, SH pode ser encontrada em abatedouros, sendo isolada de carcaças de frangos logo após a depenagem e também na água do *chiller*, indicando sua presença no ambiente de processamento de alimentos (COLLA et al., 2012).

A indústria avícola brasileira atende boa parte da procura mundial por carne de frango e apesar de possuir sistemas intensivos e verticalmente integrados, é dependente do uso de antimicrobianos para atender à essa demanda (ALIKHAN et al., 2022). O uso indiscriminado desses fármacos facilitou a aquisição de genes de resistência por esse sorovar (NÚNCIO et al., 2022), sendo frequentemente relatados isolados resistentes às cefalosporinas de terceira geração, tetraciclina e/ou sulfonamidas (ALIKHAN et al., 2022; SOUZA et al., 2020; VOSS-RECH et al., 2015). Dessa forma, cepas cada vez mais virulentas e resistentes aos antimicrobianos são uma preocupação mundial, visto que isso pode levar à ocorrência de infecções de difícil tratamento e à permanência do agente no ambiente de produção (MELO et al., 2021; ZHAO et al., 2008)

A permanência de SH no ambiente de produção e processamento de alimentos pode ser prolongada por sua capacidade de formar biofilmes, fato que aumenta as chances de transmissão para o consumidor final (FLEMMING et al., 2016; WEBBER et al., 2022). Em um estudo realizado por Dantas et al. (2020), *Salmonella* spp. demonstrou-se presente nas superfícies de contato de uma planta de processamento por até 18 a 20 semanas por meio da formação de biofilme, enfatizando esse risco. A formação de biofilme depende de fatores como as condições de crescimento, do tipo de superfície de contato presente e do isolado (CHIA et al., 2009). Essa característica favorece a permanência de *Salmonella* no ambiente, contribuindo para a contaminação dos alimentos, fato que é agravado levando em

consideração o potencial patogênico, capacidade de adesão e resistência a antimicrobianos desse agente (DANTAS et al., 2020).

Considerando todos os riscos que esse agente representa para a saúde pública e a preocupação crescente com a resistência aos antibióticos, há uma demanda contínua por ferramentas para o seu controle (PINEDA et al., 2021). Como exemplo de produtos, têm-se as vacinas, probióticos, simbióticos, enzimas, ácidos orgânicos e inorgânicos, fitobióticos e prebióticos, mas ainda são necessárias pesquisas por outras ferramentas que possam complementar o controle desse patógeno na produção avícola (YADAV et al., 2016).

3.2. Resposta imune contra *Salmonella*

Os órgãos do sistema imune das aves são divididos em: (i) primários, grupo composto pela medula óssea, timo e Bursa de Fabricius; (ii) secundários, composto pelo baço, tecidos linfoides associados ao trato respiratório e anexos, como a glândula de Harder e no trato intestinal, como as placas de Peyer e tonsila cecal. Em conjunto os órgãos linfoides possuem a função de prover ambientes adequados para interação entre as células do sistema imune e os antígenos. A medula óssea é responsável pela geração de precursores das células T e B, que passam pelo seu amadurecimento no timo e na Bursa de Fabricius, respectivamente (MONTASSIER, 2020).

A resposta imune das aves é dividida em inata e adaptativa. A imunidade inata é responsável pela defesa do organismo no início da infecção. É uma resposta rápida mediada por componentes pré-existentes, sendo composta por fagócitos, células dendríticas, sistema complemento e mediadores inflamatórios. Já a imunidade adaptativa é mais especializada, atua reconhecendo e reagindo aos antígenos e é mediada por linfócitos e produtos por eles sintetizados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022; JEURISSEN et al., 2002).

Salmonella spp. pode colonizar diversos tecidos nas aves, estando presente no lúmen intestinal e nos órgãos de forma intracelular ou extracelular (BARROW et al., 2012). A resposta imune contra essas bactérias depende do sorovar que está causando a infecção, da genética do hospedeiro e condições imunológicas e fisiológicas da ave (CHAPPELL et al., 2009; FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020).

No caso da infecção sistêmica em aves, causada principalmente por *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, a interação com o sistema imune ocorre em três fases: (i) invasão intestinal, (ii) estabelecimento de infecção sistêmica e, por último, a infecção pode ser (iii-a) eliminada

(*clearance*) ou a ave pode se tornar (iii-b) portadora ou (iii-c) morrer (CHAPPELL et al., 2009). Os mecanismos que atuam na infecção por *Salmonella* spp. no lúmen intestinal são diferentes dos que atuam nos demais tecidos. Sorovares que possuem flagelo, como Typhimurium e Enteritidis, possuem mais dificuldade para se translocar através do epitélio intestinal em aves com mais de 3 dias de idade, sendo impedidos ou eliminados pela resposta inflamatória no local de entrada, por outro lado, para os sorovares Pullorum e Gallinarum, existe uma resposta inflamatória reduzida no intestino, o que facilita a ocorrência da doença sistêmica (BARROW et al., 2012).

Como *Salmonella* spp. é uma bactéria intracelular facultativa, os fagócitos (monócitos, macrófagos e heterófilos) possuem grande relevância na resposta imune (KRAMER et al., 2001), que pode ser afetada por fatores como estresse (HOLT, 1992), dieta (PETERSON et al., 1999) e idade da ave (HOLT et al., 1999). Os patógenos são capazes de colonizar os tecidos somente quando conseguem cruzar a barreira epitelial e, quando isso ocorre, as respostas inata e adaptativa são ativadas para promover as próximas linhas de defesa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022). A interação entre o sistema imune inato e adaptativo, juntamente com seus diferentes tipos de células e moléculas, como anticorpos e citocinas, compõem a imunidade do hospedeiro como um todo (HURLEY et al., 2014).

3.2.1. Resposta imune inata

O sistema imune inato responde de forma quase imediata à presença de patógenos e células danificadas, visto que seus receptores são específicos para estruturas que são comuns a diferentes grupos de agentes infecciosos. Esse tipo de resposta é composta principalmente por barreiras físicas e químicas, como o epitélio e os componentes antimicrobianos produzidos na superfície deste, além de fagócitos, como heterófilos e macrófagos, células dendríticas, células *natural killer*, componentes do sistema complemento e mediadores inflamatórios (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022).

O epitélio intestinal atua como a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos intestinais, visto que muitos deles usam o intestino como porta de entrada para causar diversas doenças. O trato gastrointestinal é o principal local de colonização por *Salmonella* spp., dessa forma, os enterócitos e os tecidos linfóides associados ao intestino (GALT) que possuem células apresentadoras de antígenos e células T e B fornecem uma

proteção inicial contra agentes infecciosos. Nas aves, as tonsilas cecais, localizadas na junção ileocecal, são tecidos linfoides muito importantes, sendo os maiores que compõem o GALT (GÓMEZ DEL MORAL et al., 1998; HAN et al., 2020).

Como dito anteriormente, o sistema imune inato reconhece estruturas que são comuns a diferentes agentes, ou seja, são padrões moleculares conservados e, por isso, chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e os receptores que os reconhecem são chamados de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Como exemplo clássico de PAMP, tem-se o lipopolissacarídeo (LPS), cuja porção lipídica A é comum entre bactérias gram-negativas como *Salmonella* spp. Os PRRs têm como funções promover a opsonização e fagocitose, ativação das cascatas do complemento e coagulação, das vias de sinalização pró-inflamatórias e de apoptose (MEDZHITOV, 2001).

Ao colonizar e se multiplicar no intestino das aves, *Salmonella* spp. desencadeia inflamação, levando ao aumento de temperatura, diarreia e atração de componentes do sistema imune importantes nas infecções intestinais, como os linfócitos T gama/delta ($\gamma\delta$) e *natural killer*. Essa inflamação é iniciada por receptores presentes nos enterócitos e GALT que estimulam a liberação de interleucinas como IL-1 β e IL-6 e quimiocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa induzido por lipopolissacarídeos (LITAF), interferon-gama (INF- γ), CXCLi1 e CXXLi2, além de heterófilos, macrófagos e linfócitos (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020).

PRRs como o receptor transmembrânico *Toll-Like 5* (TLR-5) desempenham papel importante na restrição da entrada de sorovares paratíficos no intestino, visto que este está envolvido no reconhecimento da flagelina (BARROW et al., 2012), enquanto o TLR-4 detecta o LPS. Além dos TLRs, os receptores *Nod-like* (NLRs) também atuam no reconhecimento de moléculas de agentes patogênicos (KEESTRA-GOUNDER; TSOLIS; BÄUMLER, 2015). Juntamente com as proteínas secretadas pelo sistema de secreção do tipo três (SSTT) da ilha de patogenicidade 1 (SPI-1), esses PAMPs levam à inflamação intestinal (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020). A presença dessa resposta inflamatória faz com que os leucócitos circulantes e proteínas plasmáticas cheguem ao local de infecção, onde são ativados com o intuito de eliminar o agente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022).

Ao invadir o epitélio, *Salmonella* spp. libera proteínas efetoras que são secretadas pelo SSTT, como SopA, SopB, SopD, SopE e SipA que são responsáveis por modificar o citoesqueleto dos enterócitos, contribuindo para a invasão. Após adentrar a barreira intestinal, *Salmonella* é fagocitada pelos macrófagos ou células dendríticas presentes na

lâmina própria e a partir daí é transportada para o fígado e baço, sendo essa etapa responsável pelo estabelecimento da infecção sistêmica (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020). Os fagócitos tentam destruí-la, mas por ser uma bactéria intracelular facultativa, esta consegue resistir à ação do fagossomo (PENHA FILHO, 2013; RUBY et al., 2012) usando o SSTT da SPI-2, que impede a fusão do fagossomo com o lisossomo por meio da injeção de proteínas que alteram o transporte intracelular (WIGLEY et al., 2002).

Pelo fato da resposta imune inata ser considerada inespecífica, muitos estudos são direcionados à resposta imune adaptativa ou adquirida, mas algumas pesquisas têm mostrado que a imunidade inata possui alta capacidade e especificidade no reconhecimento de patógenos, modulando o início da resposta imune adaptativa, que é dividida em imunidade humoral e celular (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020; HAN et al., 2020; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; MEDZHITOV, 2001).

3.2.2. Resposta imune adaptativa

A imunidade humoral é composta por moléculas presentes no sangue e secreções da mucosa, essas moléculas são chamadas de anticorpos e são secretadas pelos linfócitos B. Os anticorpos conseguem reconhecer agentes patogênicos, neutralizá-los e marcá-los para eliminação pelo sistema complemento e por fagócitos. Já a imunidade mediada por células é caracterizada pela ação dos linfócitos T. Alguns patógenos como *Salmonella*, apesar de ingeridos pelos fagócitos, conseguem sobreviver dentro dessas células, onde ficam inalcançáveis para a ação dos anticorpos. Nesse caso, a imunidade celular promove a destruição desses microrganismos internalizados, matando as células infectadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022; TIZARD, 2014).

A infecção por *Salmonella* spp. pode induzir a resposta Ta1 (T auxiliar 1), em que ocorre a produção de IFN- γ e ativação da resposta imune celular e também a resposta Ta2 (T auxiliar 2), a qual é responsável pela produção de anticorpos (MASTROENI et al., 2001; PENHA FILHO, 2013). Em um estudo com aves infectadas com *S. Enteritidis*, foi verificada a produção de IL-17 e IL-22 por células Ta17 (responsáveis pela resposta Ta17), levando ao aumento da produção de peptídeos antimicrobianos e recuperação de tecidos danificados, promovendo a proteção das aves contra a infecção (CRHANNOVA et al., 2011). Durante o momento de alteração da resposta imune, componentes da imunidade inata podem agir,

como a IL-1 β que atua na ativação de macrófagos e linfócitos T e a IL-6, que ativa os linfócitos B, que por sua vez podem ser ativadas também pela IL-4 e IL-13, secretadas por linfócitos Ta2 (FREITAS NETO; PENHA FILHO; BERCHIERI JÚNIOR, 2020).

A conexão entre resposta imune inata e adaptativa ao nível celular se dá pelas células dendríticas, que são importantes apresentadoras de antígenos. A estimulação das células dendríticas por PAMPs levam ao seu amadurecimento, e, uma vez maduras, essas células apresentam os antígenos aos linfócitos T que reconhecem antígenos associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), ativando os linfócitos T imaturos. Os linfócitos são classificados em T CD4⁺ (auxiliares) e CD8⁺ (citotóxicos) e estes são ativados após o reconhecimento de antígenos apresentados pelo MHC-II e MHC-I, respectivamente (BERNAL-BAYARD; RAMOS-MORALES, 2018).

As células T CD4⁺ ativam os fagócitos por meio do receptor CD40 e IFN- γ , o que leva a morte de patógenos que se encontram nos fagolisossomos. A expressão do receptor CD40 e secreção de IFN- γ ativam macrófagos e induzem a produção de substâncias microbicidas como o óxido nítrico, enzimas lisossômicas e oxigênio reativo, produzidas principalmente dentro dos fagolisossomos. A diferenciação das células T CD4⁺ em Ta1 se dá por ação da IL-12, interleucina produzida por células dendríticas e macrófagos que possui importância na imunidade contra bactérias intracelulares. Já os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) eliminam patógenos intracelulares matando a célula que se encontra infectada. Os CTLs fazem isso por meio da entrega de proteínas que induzem morte celular após reconhecimento do alvo infectado (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022).

A resposta imune humoral é composta por linfócitos B que se proliferam e diferenciam-se em plasmócitos, secretando diferentes classes de anticorpos. Receptores de antígenos são expressos na superfície dos clones de célula B, que atuam como um anticorpo ligado à membrana que possui alta especificidade antigênica. A interação entre os linfócitos B e os antígenos precisa de sinais de ativação das células TCD4⁺, por isso estas são chamadas de auxiliares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022). A infecção inicial por *Salmonella* spp. ocorre principalmente nas mucosas, desencadeando essa imunidade humoral, composta por imunoglobulinas, predominantemente a IgA secretória, mas também podem ser observadas IgG e IgM (SEO et al., 2002). Essa imunidade pode resultar da resposta contra diversos tipos de antígenos presentes na estrutura de *Salmonella* spp. e é um mecanismo importante no combate da infecção extracelular (MASTROENI et al., 2001).

A IgA secretória possui alta diversidade e capacidade de promover a proteção, sendo encontrada nas secreções biliares e das mucosas, além de ser capaz de reconhecer diferentes

tipos de antígenos de *Salmonella* spp., desencadeando mecanismos como a neutralização e opsonização (MASTROENI et al., 2001; SEO et al., 2002). A neutralização realizada pelos anticorpos é a única estratégia da imunidade adquirida que bloqueia a infecção antes que ela se estabeleça, por isso a produção de imunoglobulinas é um objetivo importante da vacinação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022).

3.3. Vacinação *in ovo*

A técnica de inoculação *in ovo* foi introduzida na década de 80 por Sharma e Burmester no procedimento de vacinação contra doença de Marek, sendo uma forma eficaz de estimular resposta imune precoce nas aves e consequentemente aumentar a proteção contra doenças (JOHNSTON et al., 1993). Hoje em dia a técnica é amplamente utilizada em incubatórios comerciais para vacinação de embriões (GIMENO et al., 2015), sendo conduzidos cada vez mais estudos da sua eficácia na proteção contra diferentes enfermidades, como, por exemplo, doença de Marek, doença de Gumboro, boubá aviária, doença de Newcastle e coccidiose (PEEBLES, 2018).

Esse tipo de vacinação possui diversas vantagens, entre elas têm-se a eficácia e padronização do manejo vacinal, garantindo que todos os ovos recebam a mesma dose de antígeno e geração de imunidade precoce. Além disso, o uso dessa técnica permite a redução dos custos com mão de obra e do tempo que as aves passam no incubatório, pois não são submetidas aos procedimentos estressantes de vacinação subcutânea. Essa técnica torna o processo de vacinação mais ágil, uma vez que os equipamentos permitem vacinar mais de 50.000 ovos por hora (BERNADINO; DAGA, 2013; WILLIAMS; ZEDEK, 2010).

O sistema imune do pintainho inicia seu desenvolvimento durante a fase embrionária e ainda não está completamente formado no momento da eclosão, dessa forma, o tempo é um fator importante para a vacinação *in ovo* (MARCANO et al., 2021), mesmo assim, o embrião é capaz de reagir a antígenos administrados por essa via (VANDEPUTTE et al., 2019). A capacidade de gerar imunidade celular se inicia por volta da segunda semana de incubação (JANKOVIĆ et al., 1975). Enquanto que a capacidade de produzir imunidade humoral pode variar do final da segunda semana de incubação (JANKOVIĆ et al., 1977) ao nascimento e após a eclosão (SOLOMON, 1966). A imunização *in ovo*, seja com antígenos inteiros, proteínas purificadas ou genomas virais, pode levar ao desenvolvimento tanto de

imunidade humoral quanto celular, sendo que a proteção pós eclosão contra doenças depende da natureza do antígeno (DING et al., 2005).

A vacinação *in ovo* é um procedimento seguro com efeitos mínimos para a eclodibilidade dos embriões. Dentre os fatores que influenciam a eficácia desse método, têm-se o local de inoculação, o estágio de desenvolvimento embrionário, o controle da presença de microrganismos no incubatório e os equipamentos utilizados no processo (PEEBLES, 2018). Para que a vacinação seja efetiva, a solução deve atingir a cavidade amniótica ou o corpo do embrião, de modo que não seja injetada muito profundamente, a ponto de causar trauma, e nem tão superficialmente, ficando restrita a câmara de ar ou cavidade alantoide, locais que não propiciam uma estimulação satisfatória do sistema imune (BERNADINO; DAGA, 2013).

Existem diferentes vias possíveis para injeção *in ovo*, como o corpo do embrião, a membrana cório-alantoide, cavidade alantoide, câmara de ar, saco vitelino e fluido amniótico (Figura 1), sendo este último preferivelmente usado quando o embrião atinge seu estágio tardio de crescimento, momento em que o líquido amniótico é consumido e seu conteúdo entra em contato com os enterócitos (SAEED et al., 2019). Dessa forma, a inoculação de vacinas via âmnio permite que a solução seja ingerida e aspirada pelo embrião, agindo de forma sistêmica (PEEBLES, 2018).

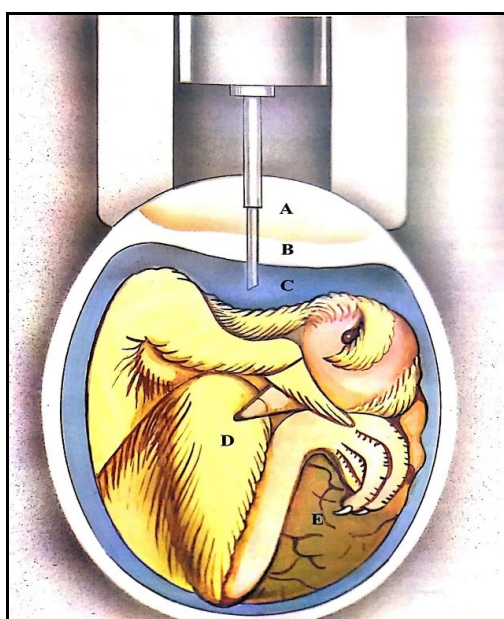


Figura 1. Metodologia da inoculação de substâncias no fluido amniótico. A: câmara de ar; B: alantoide; C: fluido amniótico; D: embrião; E: saco vitelino. Extraído de Rocha; Maiorka (2013).

Geralmente a inoculação de vacinas é realizada no 18º dia de incubação, anterior à bicagem interna e quando a cabeça do pintainho está posicionada medialmente em relação às pernas (PEEBLES, 2018). Além de vacinas, existem diversos estudos sobre o uso da inoculação *in ovo* para administração de outros componentes, como aminoácidos, glicerol, carboidratos, vitaminas, minerais, imunostimulantes, probióticos, prebióticos, simbióticos e fármacos (SAEED et al., 2019).

Em 1982, Sharma e Burmester descobriram que a vacinação dos embriões poderia ser usada para proteger as aves contra a doença de Marek (DM) de forma eficaz. As aves foram vacinadas com herpesvírus de peru (HVT) aos 18 dias de incubação e após a eclosão desafiadas com vírus patogênico da DM. Os autores constataram que as aves vacinadas *in ovo* tiveram uma resistência maior à infecção quando comparadas com as aves vacinadas após a eclosão, além disso, a vacinação dos embriões não afetou a eclodibilidade (SHARMA; BURMESTER, 1982).

A segurança e eficácia da administração *in ovo* de vacinas contra a doença de Gumboro foi investigada por Giambrone, Dormitorio e Brown (2001). Três diferentes vacinas foram testadas, sendo inoculadas aos 18 dias de incubação em aves livres de patógenos específicos (*SPF*) e aves comerciais. Foram observadas lesões microscópicas significativas nas bursas das aves 1 e 3 semanas após a eclosão quando usada a dose vacinal completa. No entanto, quando administrada meia dose de vacina, as lesões foram evidentes somente na primeira semana nas aves comerciais. As aves foram desafiadas com uma estirpe variante padrão e outra variante antigênica do vírus da doença de Gumboro às 3 semanas de idade. Foi observada pelo menos 87% de proteção contra a estirpe padrão e 60% contra a estirpe com variação antigênica, indicando proteção das aves contra imunossupressão e mortalidade causadas pela doença. Rautenschlein e Haase (2005) realizaram um estudo no qual compararam a imunopatogênese de uma vacina contra doença de Gumboro administrada *in ovo* e após a eclosão. Foi observado que as aves vacinadas *in ovo* se recuperaram mais rápido das lesões bursais após a infecção, quando comparadas com as aves vacinadas após a eclosão, indicando uma vantagem no uso da vacinação *in ovo* para essa enfermidade.

Para avaliar o potencial imunogênico e o efeito na eclodibilidade da vacinação *in ovo* contra doença de Newcastle e influenza aviária, Stone, Mitchell e Brugh (1997) administraram vacinas inativadas oleosas contra essas doenças em ovos embrionados de galinha aos 18 dias de incubação. Os resultados obtidos indicaram uma taxa de eclodibilidade aceitável, além de boas taxas de soroconversão e imunidade protetora nas

aves. As estirpes convencionais de vacinas vivas contra a doença de Newcastle, como LaSota e V4 são letais para o embrião quando administradas *in ovo*, por isso não podem ser aplicadas por essa via (MAST et al., 2006). Fan et al. (2020) investigaram a segurança, eficácia e duração da proteção da estirpe TS09-C do vírus da doença de Newcastle como vacina administrada *in ovo*. Esta demonstrou-se segura para aves comerciais, fornecendo pelo menos 80% de proteção frente ao desafio durante 3 meses e apresentando um papel importante da resposta imune celular na eficácia protetora da vacina, além de não sofrer influência significativa dos anticorpos maternos presentes.

Com o objetivo de investigar a ação da injeção *in ovo* de diferentes estágios do parasita *Eimeria tenella*, Weber e Evans (2003) inocularam esporozoítos, esporocistos ou oocistos de uma estirpe vacinal de *E. tenella* em diferentes doses infectantes em ovos embrionados aos 18 dias de incubação. A eclodibilidade dos ovos não foi afetada e, após a eclosão, foi realizado o desafio das aves. A vacinação resultou em infecção dos pintainhos recém-eclodidos e consequente imunização frente ao desafio experimental, visto que as aves vacinadas apresentaram escores de lesões inferiores aos das aves do grupo controle. Ao que tudo indica, haveria viabilidade do uso dessa via de imunização contra coccidiose. No incubatório, vacinas vivas contra a coccidiose são comumente usadas, seja via *spray* ou *in ovo*. Um exemplo é a vacina Inovocox EM1, que possui oocistos esporulados de *Eimeria acervulina*, *Eimeria máxima* e *Eimeria tenella*, sendo administrada *in ovo* entre o 18º e 19º dia de incubação (SOKALE et al., 2021).

Estudos da aplicação da técnica de vacinação *in ovo* para controle de patógenos bacterianos também vêm sendo realizados. Elliott et al. (2018) investigaram o potencial de uma vacina *in ovo* contra *Mycoplasma gallisepticum* (MG). Os embriões receberam uma dose de vacina viva atenuada contendo a cepa F de MG no 18º dia de incubação em diferentes diluições e, posterior, avaliação por 6 semanas após a eclosão. A menor dosagem usada foi considerada a mais prática por causar menor mortalidade, menor perda de peso e indução de resposta imune humoral na maioria das aves. Entretanto, vale destacar que foram observadas elevadas taxas de mortalidade e diminuição na eclodibilidade entre os tratamentos. Alqhtani et al. (2022) testaram o potencial da administração *in ovo* da vacina ts-11MGV contra MG no 18º dia de incubação usando diferentes dosagens da vacina viva atenuada. Não foram observados impactos negativos na eclosão, porém não foi observada resposta sorológica. Os efeitos da vacinação *in ovo* com bacterina ou vacina de subunidade contra *Campylobacter jejuni* e *C. coli* foi investigada por Vandeputte et al. (2019). Os embriões foram imunizados no 18º dia de incubação com bacterina ou vacina de subunidade

e, posteriormente, foi realizada a quantificação de *C. jejuni* no conteúdo cecal, a qual demonstrou que não houve proteção pela vacinação *in ovo*.

A administração de peptídeos e proteínas *in ovo* também vem sendo estudada com objetivo de estimular o sistema imune das aves. Dalloul et al. (2005) testaram os efeitos protetores da inoculação *in ovo* de uma proteína recombinante de *Eimeria tenella* (MIC2) contra infecção por *Eimeria*, o que resultou na redução da eliminação de oocistos e aumento da resposta humoral, sugerindo que a injeção *in ovo* de MIC2 pode reduzir a liberação de oocistos em aves com coccidiose. Cuperus et al. (2016) avaliaram os efeitos imunomoduladores de D-CATH-2 administrado *in ovo* na proteção contra a infecção por *E. coli*, resultando em proteção parcial contra a infecção por *E. coli* patogênica aviária (APEC) e maior eficácia em comparação com a administração intramuscular. Ao inocular proteína bacteriana purificada de *Salmonella* (FliC) em ovos, aos 18 dias de incubação, Vaezirad et al. (2018) constataram elevados níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias no intestino e altos títulos de anticorpos específicos para FliC no soro, indicando que o sistema imune do embrião foi capaz de produzir resposta imunológica após exposição ao antígeno bacteriano.

A vacinação *in ovo* é uma estratégia que permite o controle de diversas enfermidades aviárias que possuem importância econômica, sendo em sua maioria doenças virais (HOELZER et al., 2018). Após a eclosão, os pintainhos passam pela exposição a diversos antígenos, sendo os primeiros dias de vida uma fase crítica da criação, visto que seu sistema imunológico ainda é imaturo. Para evitar a mortalidade precoce dessas aves, antibióticos são comumente administrados ainda no incubatório, prática deletéria por favorecer a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos. Assim, a vacinação *in ovo* é uma técnica promissora que, além de promover a proteção das aves nos seus primeiros dias de vida por meio do estímulo da resposta imune inata e adaptativa, poderia se tornar uma alternativa ao uso de antimicrobianos nesta fase (GIMENO et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte, Minas Gerais. O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UFMG sob o protocolo 232/21.

4.1. Definição das soluções antigênicas

Foram selecionadas dez proteínas estruturais e/ou de maior relevância para a colonização intestinal com base em sequências conservadas presentes no genoma de *Salmonella* Heidelberg. As sequências de aminoácidos das proteínas foram obtidas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Tabela 2). Para seleção dos peptídeos mais imunogênicos presentes em cada uma das proteínas, estas foram submetidas a programas de predição de epítomos lineares, sendo eles o ABCpred (Institute of Microbial Technology, Índia), BepiPred – 2.0 (Department of Health Technology, Denmark), LBtope (Department of Computational Biology, Indraprastha Institute of Information Technology, Índia) e SVMTriP (System Biology Laboratory of Chi Zhang). As análises obtidas na predição de cada um dos programas foram submetidas a um *script* de otimização de seleção que combina todas as análises utilizando um *score* único com auxílio do Prof. Dr. João Luís Reis Cunha da Universidade de York no Reino Unido. Foram determinadas sequências de peptídeos de 18 aminoácidos (Tabela 3) e sua síntese foi realizada pela empresa AminoTech (São Paulo, Brasil). Os peptídeos foram submetidos à análise por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e foi realizada adição de contra-íons.

Tabela 2. Proteínas estruturais selecionadas de *Salmonella* Heidelberg.

Proteína	GenBank
Fibronectin-binding autotransporter adhesin ShdA	TKE64699.1
Fimbriae usher protein StcC	AFH46088.1
Fimbrial outer membrane usher protein StdB	TKE67612.1
Flagellin	KNV80899.1
Non-fimbrial adhesin SiiE	UAH14968.1
Outer membrane usher protein LpfC	TKE65681.1
Porin OmpA	TKE70238.1
Porin OmpC	TKE64368.1
Porin OmpS2	EBV9429398.1
Type III secretion system effector inositol phosphate phosphatase SopB	TKE70258.1

Fonte: National Center for Biotechnology Information – NCBI (2021).

Tabela 3. Sequências de peptídeos selecionados para compor as formulações.

Proteína	Sequência de peptídeos
Fibronectin-binding autotransporter adhesin ShdA	AGTGVYILASDARIDGAT
Fimbriae usher protein StcC	GLQPQGATDCIALKDVVR
Fimbrial outer membrane usher protein StdB	RYQDPDWVPPSRWSDGVT
Flagellin	NNGTTLDVSGLDAAIKA
Non-fimbrial adhesin SiiE	SDGKIYITDTRNLLFSG
Outer membrane usher protein LpfC	VPGIDQHVDLSMYESNKA
Porin OmpA	GNTCDNVKPRAALIDCLA
Porin OmpC	KGKDISNGYGASYGDQDI
Porin OmpS2	DRTNEQVNAGGTIAGGDK
Type III secretion system effector inositol phosphate phosphatase SopB	SYNAEALHQLLGNDLRPE

Com o objetivo de auxiliar os efeitos imunogênicos das formulações foi utilizado o oligodeoxinucleotídeo com sequência CpG GTCGTTGTCGTTGTCGTT (CpG-ODN) como adjuvante (HE et al., 2003; MacKINNON et al., 2009), cuja síntese foi realizada pela empresa LabScience - Sigma Aldrich. Foram utilizadas duas formulações contendo peptídeos bacterianos na inoculação *in ovo*, sendo a primeira composta pelos 10 peptídeos selecionados combinados com o adjuvante CpG-ODN e a segunda por apenas peptídeos sem adjuvante. Para avaliar os efeitos do adjuvante isoladamente, um grupo recebeu apenas o componente CpG-ODN. Como controle das soluções, um grupo recebeu apenas PBS e o grupo dos ovos intactos compôs o controle negativo dos ovos inoculados (Tabela 4).

Tabela 4. Composição dos grupos experimentais.

Grupo experimental	Tratamento
A	OmpC, SiiE, ShdA, OmpA, Flagellin, StcC, SopB, OmpS2, StdB e LpfC + CpG-ODN
B	OmpC, SiiE, ShdA, OmpA, Flagellin, StcC, SopB, OmpS2, StdB e LpfC
C	CpG-ODN
D	PBS
E	Ovos intactos (não inoculados)

4.2. Incubação dos ovos, inoculação *in ovo* e aves experimentais

Foram incubados 180 ovos de aves livres de patógenos específicos (*SPF*), adquiridos da empresa Valo BioMedia do Brasil, resultando em 5 grupos compostos por 36 ovos cada, distribuídos aleatoriamente em duas incubadoras artificiais da marca Premium Ecológica modelo DP 130 disponíveis no Laboratório de Doenças das Aves da UFMG. Os ovos foram incubados a temperatura média de 37,8°C e 55 a 60% de umidade relativa.

A inoculação foi realizada no 18º dia de incubação em sala higienizada, mantendo os ovos fora da incubadora pelo mínimo período de tempo possível. Após o preparo de cada solução, estas tiveram seu pH medido com fitas de papel medidor, que apresentaram-se entre 6 e 7. Os ovos passaram por ovoscopia aos 18 dias de incubação para descartar os inférteis ou com mortalidade precoce e intermediária e posteriormente foram divididos em cinco grupos:

- Grupo A: 20 µg de cada peptídeo juntamente com 16 µg de CpG-ODN diluídos em PBS, compondo um volume total de 100 µL/ovo;
- Grupo B: 20 µg de cada peptídeo diluído em PBS, compondo um volume total de 100 µL/ovo;
- Grupo C: 25 µg de CpG-ODN diluído em PBS, compondo um volume total de 100 µL/ovo;
- Grupo D: 100 µL de PBS/ovo;
- Grupo E: ovos intactos.

O procedimento de inoculação *in ovo* foi realizado conforme descrito anteriormente por Sharma e Burmester (1982). Com o auxílio de um ovoscópio foi localizado o ponto de inserção da agulha, que foi desinfetado com álcool iodado antes da injeção. Cada formulação antigênica foi injetada no fluido amniótico usando seringas descartáveis de 1 mL e agulha de calibre 22. Depois de injetada a solução, o orifício foi vedado com cola branca e os ovos foram identificados de acordo com cada grupo experimental e devolvidos para as incubadoras. Para possibilitar a identificação dos pintainhos pertencentes a cada tratamento após a eclosão, posteriormente à inoculação, os ovos de cada tratamento foram acomodados separadamente em bolsas de tecido telado maleável, impedindo que as aves de cada tratamento se misturassem.

Após a eclosão, amostras de mecônio foram coletadas para pesquisa de *Salmonella* spp. conforme metodologia de Zancan et al. (2000). A taxa de eclosão e taxa de eclodibilidade foram calculadas usando as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ eclosão} = (\text{número de pintos nascidos} / \text{número de ovos incubados}) \times 100.$$

$$\% \text{ eclodibilidade} = (\text{número de pintos nascidos} / \text{número de ovos férteis incubados}) \times 100.$$

Posteriormente à secagem das plumas, as aves foram alojadas em cinco gaiolas metálicas de acordo com cada grupo experimental e distribuídas em duas salas climatizadas, sendo uma sala composta pelos grupos infectados (A, B, C e D) e a outra pelo grupo controle não infectado (E). As aves receberam água e ração *ad libitum* sem antibióticos ou coccidiostáticos.

4.3. Bactéria e preparação do inóculo

Para o desafio experimental, foi utilizada uma estirpe de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Heidelberg (SH) resistente ao ácido nalidíxico (Nal^r). A estirpe foi previamente isolada de um lote de frangos de corte criado no estado do Paraná e armazenada a -80°C em infusão de cérebro e coração (BHI - Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, Michigan) suplementado com glicerol. O isolado foi cadastrado no SISGEN (A968A81). A estirpe foi cultivada em tubo estéril contendo 20 mL de caldo BHI e incubada a 37°C por 18 horas. Foi realizada uma diluição decimal seriada obtendo-se um inóculo de $2,8 \times 10^4$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL que foi administrado diretamente no inglúvio das aves no terceiro dia pós-eclosão na dose de 0,2 mL ($5,6 \times 10^3$ UFC) utilizando uma agulha de gavagem estéril.

4.4. Exames bacteriológicos

Para avaliação da excreção fecal de *Salmonella* spp., foram realizados suabes cloacais duas vezes por semana em todas as aves infectadas, referentes a 2, 6, 9, 12, 16, 20, 23 e 26 dias pós-infecção. Os suabes foram semeados diretamente em ágar verde brilhante (AVB – OXOID LTD. Basingstoke, Hampshire, England) com 100 ug/mL de ácido nalidíxico e posteriormente incubados em caldo tetrionato (Acumedia, Neogen

Corporation. Lansing, Michigan) com novobiocina. As amostras que não apresentaram multiplicação foram semeadas novamente em AVB a partir das culturas enriquecidas.

Aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção, cinco aves de cada grupo foram eutanasiadas para realizar a contagem de SH no conteúdo cecal e fígado. Após coletadas, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em solução salina tamponada com fosfato. A contagem de *Salmonella* spp. nas amostras foi realizada pelo plaqueamento das alíquotas de diluições seriadas decimais em AVB contendo 100 ug/mL de ácido nalidíxico. Um volume da primeira diluição (1:10) de cada uma das amostras foi adicionada de um volume igual de caldo tetrionato (dupla concentração), incubadas a 37°C por 24 horas e semeadas em AVB. Posteriormente foi realizada a contagem das colônias e os resultados apresentados em logaritmo decimal (log UFC/g) conforme metodologia descrita por Berchieri Júnior et al. (2001).

4.5. Análise histomorfométrica do duodeno

Aos 7, 14, 21 e 28 dias após o desafio, 5 aves de cada grupo foram eutanasiadas e tiveram seus segmentos intestinais coletados para avaliação de altura de vilosidades, profundidade de criptas e relação vilo/cripta do duodeno. O processamento das amostras foi realizado conforme metodologia descrita por Luna (1968). As amostras inicialmente foram fixadas em formol a 10% por 48 horas, clivadas e processadas em séries de álcool e xilol e incluídas em parafina. Posteriormente foram seccionadas a 4 µm de espessura, coradas pela hematoxilina e eosina (HE) e analisadas em microscópio de luz.

Para análise histomorfométrica do duodeno foram realizadas 10 mensurações por animal, totalizando 50 mensurações por grupo em cada um dos tempos de coleta. A altura de vilosidade foi medida da ponta do vilo até a junção vilo-cripta, já a profundidade de cripta foi considerada a invaginação localizada entre as vilosidades adjacentes (Figura 2). As mensurações foram realizadas por meio do software LAS Core utilizando microscópio LEICA DM 4000 B em objetiva de 10x com câmera acoplada.

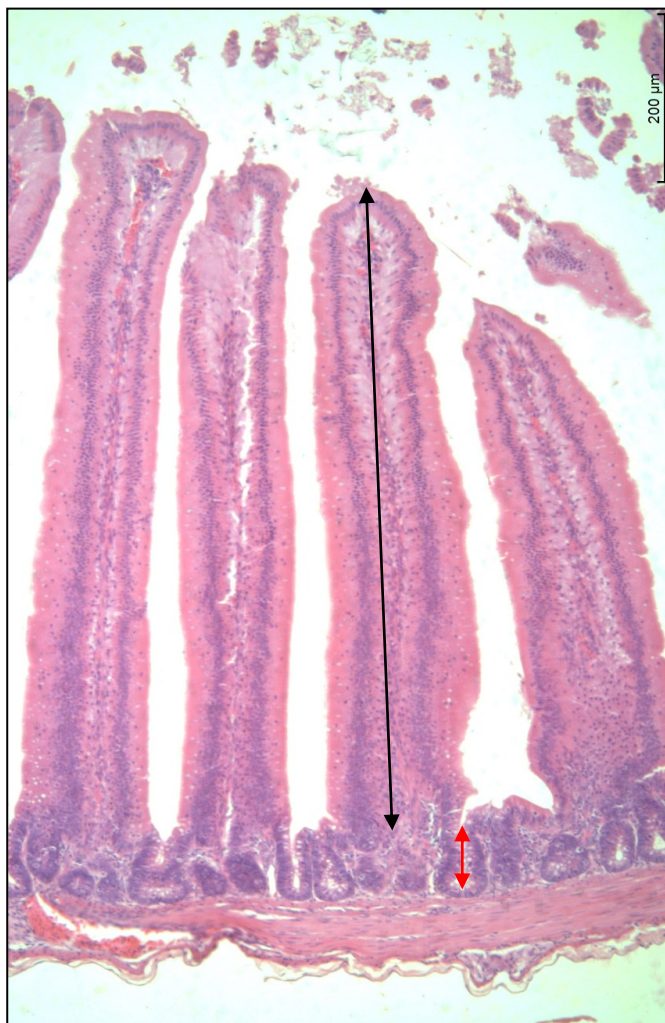


Figura 2. Metodologia usada para realizar as mensurações de altura de vilosidade (seta preta) e profundidade de cripta (seta vermelha).

4.6. Análise estatística

Os dados oriundos das contagens bacterianas em conteúdo cecal e fígado foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade. As contagens referentes ao conteúdo cecal apresentaram distribuição normal, sendo, portanto, submetidas ao teste ANOVA de duas vias e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados de excreção fecal obtidos por meio de suabes cloacais foram convertidos em números binários (1, 0) e comparados pelo teste Qui-quadrado, assim como o número de pintainhos nascidos por tratamento. Os parâmetros histomorfométricos do duodeno das aves foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade. Aqueles que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, sendo as médias comparadas pelo

teste T de Student. Já os dados que apresentaram distribuição não normal foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis, sendo as médias comparadas pelo teste de Dunn. A significância estatística foi considerada quando o valor de P demonstrou-se inferior a 0,05 ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas usando os *softwares* GraphPad Prism versão 8.0.1 (*Software GraphPad*, EUA), Stata 14.0 (*StataCorp, College Station, Texas, EUA*) e R versão 4.2.2 (*R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*).

5. RESULTADOS

5.1. Taxa de eclosão e eclodibilidade

Na tabela 5 estão apresentados os resultados dos efeitos da inoculação *in ovo* das diferentes soluções na taxa de eclosão e eclodibilidade das aves. Inicialmente 180 ovos foram incubados, sendo 36 por tratamento. No 18º dia de incubação os ovos passaram pelo procedimento de ovoscopia com o intuito separar os viáveis e inférteis. No total, 146 ovos demonstraram-se viáveis, representando 81,11% dos ovos incubados. Estes foram separados em quatro grupos de 29 ovos e um grupo de 30. Não houve mortalidade significativa durante o estudo. Não houve diferença significativa entre a quantidade de pintainhos nascidos entre os grupos ($P > 0,05$). A taxa de eclosão e eclodibilidade geral foram 58,88% e 72,60%, respectivamente.

Tabela 5. Efeitos da inoculação *in ovo* de peptídeos bacterianos adicionados ou não de CpG-ODN na taxa de eclosão e taxa de eclodibilidade dos ovos

Grupo	Soluções inoculadas	Número de ovos incubados	Número de ovos férteis	Número de pintos nascidos	% de eclosão	% de eclodibilidade
A	Peptídeos + CpG-ODN	36	30	22 a	61,11	73,33
B	Peptídeos	36	29	19 a	52,78	65,52
C	CpG-ODN	36	29	23 a	63,88	79,31
D	PBS	36	29	21 a	58,33	72,41
E	Ovos intactos	36	29	21 a	58,33	72,41

% eclosão = (número de pintos nascidos / número de ovos incubados) x 100.

% eclodibilidade = (número de pintos nascidos / número de ovos férteis incubados) x 100.

Parâmetros seguidos de letras iguais na mesma coluna indicam inexistência de diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($P > 0,05$).

5.2. Bacteriologia

As médias das contagens bacterianas em conteúdo cecal e fígado, seguidas de seus desvios-padrão, estão disponibilizadas na tabela 6. Os resultados das contagens de SH em conteúdo cecal foram transformados em Log_{10} e submetidos à análise estatística. Na figura 3 é possível observar os dados referentes às contagens de SH em conteúdo cecal expressos em log_{10} UFC/g em cada um dos momentos analisados após o desafio.

As amostras de mecônio coletadas para pesquisa de *Salmonella* spp. após eclosão apresentaram resultado negativo. Aos 7 dias pós-infecção observou-se contagem de SH mais elevada no conteúdo cecal das aves do grupo D (PBS) quando comparadas às do grupo A (peptídeos + CpG-ODN) ($P < 0,05$). Aos 14, 21 e 28 dias pós-infecção não houve diferença nas contagens de SH em conteúdo cecal ($P > 0,05$). O resultado da contagem de SH em fígado de todas as aves se manteve nula durante todo estudo, não havendo diferença entre os grupos. A pesquisa de *Salmonella* spp. nas aves do grupo controle não infectado se manteve negativa ao longo do experimento.

O resultado da excreção fecal de SH pode ser observado na Tabela 7, esta foi monitorada por suabes cloacais coletados de todas as aves desafiadas duas vezes por semana, durante quatro semanas, totalizando oito coletas correspondentes aos 2, 6, 9, 12, 16, 20, 23 e 26 dias pós-infecção. De forma geral, a proporção de suabes cloacais positivos foi maior nas aves do grupo A (peptídeos + CpG-ODN) comparando-se com as aves pertencentes aos grupos C (CpG-ODN) e D (PBS) ($P < 0,05$). Além disso, foram observadas diferenças na excreção fecal aos 2 dpi, indicando um maior número de positivos nas aves dos grupos A (peptídeos + CpG-ODN) e B (peptídeos) nesse período ($P < 0,05$) em comparação com as aves do grupo C (CpG-ODN) e D (PBS), que não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$). Nos demais momentos de coleta não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($P > 0,05$).

Tabela 6. Médias das contagens de *Salmonella* Heidelberg NaI^r (SH) no conteúdo cecal e fígado das aves aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi)

Amostras	Dpi	Grupos			
		A	B	C	D
Conteúdo cecal	7	6,14 a ± 2,92	7,85 ab ± 0,55	7,52 ab ± 0,99	8,32 b ± 0,37
	14	7,72 a ± 0,35	7,95 a ± 0,14	8,08 a ± 0,11	7,77 a ± 0,16
	21	7,37 a ± 0,65	7,46 a ± 0,46	7,73 a ± 0,26	6,04 a ± 0,76
	28	3,65 a ± 1,53	3,2 a ± 0,84	2,37 a ± 2,14	2,67 a ± 2,04
Fígado	7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	14	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	21	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	28	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão das contagens bacterianas (\log_{10} UFC/g). Grupo A: aves que receberam peptídeos + CpG-ODN. Grupo B: aves que receberam apenas peptídeos. Grupo C: aves que receberam apenas CpG-ODN. Grupo D: aves que receberam apenas PBS. Todas as aves foram desafiadas com um inóculo de $5,6 \times 10^3$ UFC de *Salmonella* Heidelberg. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa no teste de Tukey ($P < 0,05$).

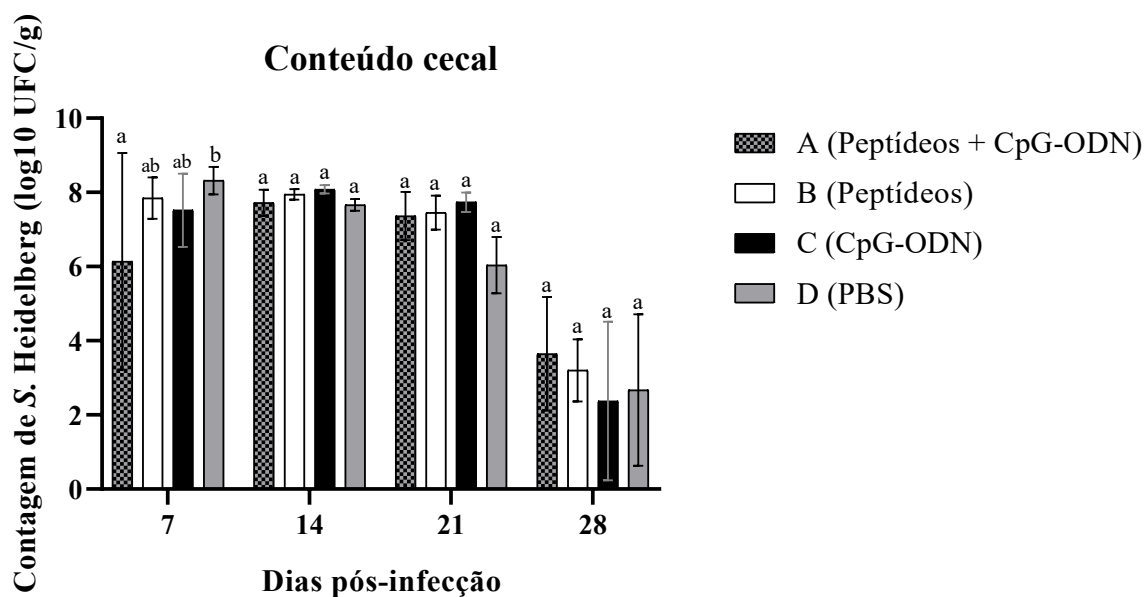


Figura 3. Média do número viável de unidades formadoras de colônias (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Heidelberg em conteúdo cecal de aves desafiadas aos três dias de idade. Amostras de 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi). Barras com letras diferentes no mesmo período pós-infecção indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

pertencentes ao grupo B (peptídeos) apresentaram maior profundidade de cripta em relação às aves dos grupos C (CpG-ODN), D (PBS) e controle não infectado ($P < 0,05$). As aves do grupo A (peptídeos + CpG-ODN), C (CpG-ODN) e D (PBS) não apresentaram diferenças no parâmetro profundidade de cripta, comparando-se às do grupo controle não infectado ($P > 0,05$). No que diz respeito à relação vilo/cripta, as aves dos grupos A (peptídeos + CpG-ODN), B (peptídeos), C (CpG-ODN) e D (PBS) apresentaram menores médias em relação às pertencentes ao grupo controle não infectado ($P < 0,05$).

Aos 21 dpi, para o parâmetro de altura de vilosidade, observou-se que as aves dos grupos A (peptídeos + CpG-ODN) e B (peptídeos) apresentaram médias significativamente menores do que as do grupo C (CpG-ODN) ($P < 0,05$). As aves pertencentes ao grupo B (peptídeos) também apresentaram menor média de altura de vilosidades em relação às pertencentes aos grupos D (PBS) e controle não infectado ($P < 0,05$). No que diz respeito à profundidade de cripta, houve diferença somente entre as aves do grupo C (CpG-ODN), que apresentaram menor profundidade de cripta quando comparadas às aves do grupo D (PBS) ($P < 0,05$), não havendo diferença entre os demais grupos ($P > 0,05$). A relação vilo/cripta demonstrou-se menor nas aves do grupo B (peptídeos) comparando-se com as do grupo C (CpG-ODN), que por sua vez apresentaram uma relação vilo/cripta maior do que as aves do grupo D (PBS) ($P < 0,05$).

Aos 28 dpi as aves pertencentes aos grupos A (peptídeos + CpG-ODN), B (peptídeos) e D (PBS) apresentaram menor altura de vilosidades em comparação com as dos grupos C (CpG-ODN) e controle não infectado ($P < 0,05$), não havendo diferença entre as médias de altura de vilosidades entre as aves dos grupos C (CpG-ODN) e controle não infectado ($P > 0,05$). Para o parâmetro de profundidade de cripta, as aves do grupo A (peptídeos + CpG-ODN) apresentaram maior média quando comparadas às do grupo D (PBS). As aves do grupo B (peptídeos) demonstraram maior média quando comparadas com as pertencentes aos grupos C (CpG-ODN), D (PBS) e grupo controle não infectado ($P < 0,05$). As aves do grupo D (PBS) apresentaram menor média de profundidade de cripta em relação às do grupo controle não infectado ($P < 0,05$). A relação vilo/cripta demonstrou-se menor nas aves pertencentes aos grupos A (peptídeos + CpG-ODN) e B (peptídeos) comparando-se às dos grupos C (CpG-ODN), D (PBS) e controle não infectado ($P < 0,05$).

Tabela 8. Média \pm desvio-padrão dos parâmetros histomorfométricos do duodeno de aves desafiadas com *Salmonella* Heidelberg aos 7, 14, 21 e 28 dpi e aves do grupo controle em diferentes tratamentos

Tratamentos	Altura de vilosidade (μm)	Profundidade de cripta (μm)	Relação vilo/cripta
7 dpi			
Peptídeos + CpG-ODN	745,00 \pm 88,20 ab	71,00 \pm 13,80 a	10,90 \pm 2,29 a
Peptídeos	712,00 \pm 66,70 b	71,30 \pm 13,30 a	10,30 \pm 1,90 a
CpG-ODN	688,00 \pm 137,00 b	77,50 \pm 15,00 a	8,99 \pm 1,86 b
PBS – controle positivo	740,00 \pm 117,00 ab	76,50 \pm 15,80 a	9,96 \pm 2,14 ab
Controle negativo	774,00 \pm 86,30 a	80,30 \pm 18,70 a	10,10 \pm 2,21 ab
14 dpi			
Peptídeos + CpG-ODN	761,00 \pm 110,00 a	81,00 \pm 13,20 ab	9,60 \pm 1,88 a
Peptídeos	797,00 \pm 136,00 a	86,50 \pm 12,60 b	9,37 \pm 1,98 a
CpG-ODN	789,00 \pm 106,00 a	78,60 \pm 12,80 a	10,30 \pm 1,92 a
PBS – controle positivo	787,00 \pm 105,00 a	77,80 \pm 13,10 a	10,30 \pm 1,85 a
Controle negativo	868,00 \pm 55,70 b	76,20 \pm 9,65 a	11,50 \pm 1,42 b
21 dpi			
Peptídeos + CpG-ODN	881,00 \pm 94,50 ab	82,30 \pm 21,10 ab	11,20 \pm 2,55 ab
Peptídeos	836,00 \pm 96,10 a	82,40 \pm 16,10 ab	10,60 \pm 2,53 a
CpG-ODN	942,00 \pm 102,00 c	80,90 \pm 14,60 a	11,90 \pm 2,15 b
PBS – controle positivo	906,00 \pm 90,60 bc	93,00 \pm 19,10 b	10,20 \pm 2,36 a
Controle negativo	926,00 \pm 103,00 bc	88,30 \pm 16,60 ab	10,80 \pm 1,84 ab
28 dpi			
Peptídeos + CpG-ODN	964,00 \pm 108,00 a	94,40 \pm 20,60 ab	10,50 \pm 1,79 a
Peptídeos	962,00 \pm 98,60 a	102,00 \pm 15,50 b	9,62 \pm 1,60 a
CpG-ODN	1025,00 \pm 119,00 b	87,50 \pm 16,80 ac	12,10 \pm 2,62 b
PBS – controle positivo	948,00 \pm 87,00 a	79,20 \pm 15,30 c	12,30 \pm 2,07 b
Controle negativo	1026,00 \pm 93,70 b	89,20 \pm 16,50 a	11,80 \pm 2,05 b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de t de Student ou teste de Dunn ($P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Entre as bactérias que possuem importância para a produção avícola, *Salmonella* spp. é uma das mais relevantes, sendo um dos patógenos mais significativos para essa atividade (VOSS-RECH et al., 2019). Os sorovares paratíficos, apesar de causarem infecção sistêmica transitória nas aves e doença clínica mais branda (BARROW, 2000), representam uma preocupação para a saúde pública mundial (MAJOWICZ et al., 2010). Este problema é ampliado pelo crescente surgimento de isolados resistentes às diferentes classes de antimicrobianos. Como agravante, destaca-se ainda que os isolados de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) são capazes de causar septicemia em seres humanos vulneráveis (COLLINEAU et al., 2020; MELO et al., 2021). O registro de infecções por esse sorovar vem aumentando nos últimos anos em países da América do Norte, Europa e América do Sul (ANTUNES, et al., 2016; FOLEY et al., 2011; GÓES et al., 2022; MELO, et al., 2021).

A introdução de SH na cadeia avícola envolve diversos componentes, incluindo a contaminação do ambiente, a transmissão vertical, presença de insetos e roedores, ração contaminada, limpeza e desinfecção do ambiente realizadas de forma incorreta e fômites contaminados (COLLINEAU et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2022). A presença dessa bactéria no ambiente de produção leva à infecção das aves e, conseqüentemente, contaminação das carcaças no momento do abate (VOSS-RECH et al., 2019; YAMAZAKI et al., 2016), refletindo na perda de qualidade microbiológica dos alimentos de origem avícola destinados ao mercado interno e à exportação (KIPPER et al., 2021). Dessa forma, a pesquisa por novas ferramentas que auxiliem no controle de *Salmonella* spp. no campo ainda são necessárias (CASANOVA et al., 2021).

O presente estudo buscou avaliar os efeitos da inoculação *in ovo* de formulações composta por peptídeos bacterianos associados ou não ao CpG-ODN frente à infecção por SH em aves. Para isso, ovos de galinhas *SPF* foram incubados e no 18º dia de incubação receberam as soluções via fluido amniótico. No terceiro dia pós-eclosão as aves foram desafiadas com uma estirpe de SH e a excreção fecal, colonização cecal, invasão sistêmica e parâmetros morfométricos do duodeno foram avaliados até 28 dias pós-infecção.

Não houve diferença significativa entre o número de pintos nascidos entre os tratamentos, incluindo os ovos intactos. No entanto, a taxa de eclosão foi relativamente baixa em todos os grupos (58,88%), indicando que a inoculação das soluções não seria a responsável. Existem muitos desafios no processo de incubação, entre eles a temperatura, níveis de CO₂ e O₂, umidade, perda de peso dos ovos e aspectos relacionados à incubadora

(DECUYPERE et al., 2013). Além disso, existem fatores que afetam o processo de eclosão em si, como condições de armazenagem dos ovos, idade da matriz e temperatura de armazenamento (WILLEMSEN, 2013). Os ovos usados no estudo foram provenientes de matrizes jovens, com 21 semanas, sendo que a pouca idade da matriz é um fator diretamente associado à irregularidades no metabolismo de lipídios em embriões, aumentando as chances de mortalidade. Ainda, outros fatores como menor porosidade da casca, maior espessura da membrana e maior densidade do albúmen podem diminuir a eclodibilidade (MAIORKA; LUQUETTI; MACARI, 2013). Aliado a isso, vale destacar que os ovos foram armazenados por um período longo (9 dias) antes da incubação. Tona et al. (2004) demonstraram que o armazenamento dos ovos por sete dias prejudicou a eclodibilidade e a qualidade dos pintainhos. Isso possivelmente está associado à diminuição da qualidade do embrião devido ao aumento da morte de células (REIJRINK et al., 2010). Dessa forma, a idade da matriz e armazenamento dos ovos devem ter sido determinantes para a baixa eclosão.

O uso de substâncias imunomoduladoras, como o CpG-ODN, auxilia na geração de resposta imune mais eficiente, levando ao adequado processamento dos antígenos vacinais e indução resposta imune adaptativa (SAVELKOUL et al., 2015; VAEZIRAD et al., 2018). Os receptores TLR detectam ligantes provenientes de patógenos, incluindo o CpG-ODN, sintetizando mediadores pró-inflamatórios e conseqüentemente promovendo a ação das células dendríticas e resposta por células T e B (WEST; KOBLANSKY; GHOSH, 2006). De acordo com Vaezirad et al. (2018), a estimulação de TLR é mais eficaz quando o antígeno utilizado possui atividade intrínseca-de estimular o receptor ou é conjugado a um agonista, por exemplo o CpG-ODN, que consiga estimulá-lo de forma eficiente. Nas aves, o TLR21 é responsivo ao CpG-ODN, pois esse oligodeoxinucleotídeo sintético que possui sequências CpG não metiladas, é semelhante ao DNA CpG de microrganismos, e, portanto, é capaz de estimular o sistema imune de vertebrados (SAJEWICZ-KRUKOWSKA et al., 2017; ST. PAUL, 2013).

No presente estudo, notou-se que, aos 7 dpi, as aves do grupo A (peptídeos + CpG-ODN) apresentaram menor colonização cecal por SH quando comparadas às aves do grupo D (PBS), sugerindo uma ação da formulação inoculada na redução da colonização cecal. Sabe-se que o CpG-ODN é capaz de ativar macrófagos e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, com conseqüente maior atividade microbicida desses fagócitos e ativação da imunidade inata em aves jovens, elevando a resistência à infecção por *Salmonella* spp. (HE et al., 2003). Embora no presente estudo apenas as aves do grupo A (peptídeos + CpG-ODN) apresentaram redução na colonização intestinal por SH,

MacKinnon et al. (2009) observaram redução na colonização cecal por *Salmonella* Enteritidis aos 6 dpi em aves que receberam somente CpG-ODN, *in ovo* no 18º dia de incubação, quando comparadas às tratadas com PBS. Provavelmente, variações nas capacidades de colonização cecal entre os dois sorovares seriam responsáveis pelas diferenças de resultados observadas.

A ação dos peptídeos em conjunto com o CpG-ODN na diminuição da colonização cecal por SH no início da infecção poderia estar relacionada aos efeitos sinérgicos desses componentes na estimulação de receptores do sistema imune da ave, como os TLR. Embora não tenham avaliado a ação direta de peptídeos, Vaezirad et al. (2018) administraram a flagelina, proveniente de *Salmonella* Enteritidis, em embriões de galinha e relataram elevação nos níveis de de chIL-8 e chIL-6 no tecido intestinal 24 horas após a inoculação, indicando que ocorreu ativação de resposta imune inata nessas aves. Aos 14, 21 e 28 dias pós-infecção não foi observada diferença na colonização cecal entre os grupos, nem mesmo entre o grupo A (peptídeos bacterianos + CpG-ODN) e grupo D (PBS). Portanto, a ação dos compostos administrados na diminuição da colonização cecal por SH ficou restrita à primeira semana pós-infecção. Possivelmente, as formulações avaliadas, incluindo a associação de peptídeos e adjuvante, não foram capazes de estimular eixos de resposta imune adaptativa capazes de atuar no *clearance* intestinal de SH nas fases mais tardias da infecção (CHAPPELL et al., 2009).

Não houve contagem de SH no fígado das aves de todos os grupos infectados ao longo do estudo, o que pode ser atribuído ao fato de que as salmonelas paratíficas, como SH, possuem patogenicidades variadas e produzem principalmente infecções restritas ao intestino (GAST et al., 2013). Este resultado também pode ser atribuído à linhagem de aves usadas no estudo, pertencentes à raça *White Leghorn*, conhecidas por serem mais resistentes às infecções bacterianas sistêmicas. Linhagens mais resistentes possuem macrófagos primários mais eficazes na morte oxidativa (WIGLEY et al., 2002), além disso, esses macrófagos são capazes de expressar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias de forma mais rápida e de maior magnitude, quando comparados aos de linhagens mais susceptíveis (WIGLEY et al., 2006). Esses macrófagos resistentes expressam altos níveis IL-18, citocina associada à ativação de resposta Ta1 (associada à estimulação de linfócitos T citotóxicos), que ao contrário dos macrófagos das linhagens susceptíveis, expressam pouca ou nenhuma IL-18 (CHAPPELL et al., 2009).

Apesar do grupo A (peptídeos + CpG-ODN) ter apresentado redução na colonização cecal aos 7 dpi, o mesmo não pôde ser observado em relação à excreção fecal de SH ao

longo do estudo. Ao contrário do esperado, aves do grupo A apresentaram maior taxa de excreção de SH quando comparado as dos grupos C (CpG-ODN) e D (PBS). É possível observar que esse resultado foi diretamente influenciado pela elevação na excreção fecal aos 2 dpi em aves dos grupos A (peptídeos + CpG-ODN) e B (peptídeos), que apresentaram maior número resultados positivos para SH (Tabela 7) quando comparadas às dos grupos C e D. É sabido que a inflamação intestinal aguda pode favorecer a multiplicação de *Salmonella* spp. por levar a síntese de tetracionato no lúmen, o qual é utilizado como acceptor de elétrons por essas bactérias (WINTER et al., 2010). Portanto, é provável que a elevação na excreção fecal no 2 dpi em aves dos grupos A e B esteja relacionada à ação inflamatória dos peptídeos no início da vida dessas aves.

Com relação aos parâmetros morfométricos do intestino das aves, considera-se que vilosidades altas estão relacionadas à maior superfície de absorção de nutrientes, sendo a cripta considerada a “fábrica” de vilosidades. Uma cripta profunda pode indicar necessidade de renovação do tecido das vilosidades, devido a descamação ou destruição causada por patógenos e toxinas (YASON; SUMMERS; SCHAT, 1987). Vilosidades mais curtas e criptas mais profundas podem ocasionar má absorção de nutrientes e, conseqüentemente, baixo desempenho das aves. O aumento da altura das vilosidades e da relação vilosidade:cripta estão correlacionados ao aumento da renovação celular do intestino, que consiste na migração de células epiteliais originadas na cripta intestinal para a ponta da vilosidade (AWAD et al., 2009; XU et al., 2003).

Aos 7 dias pós-infecção a altura de vilosidades intestinais demonstrou-se menor nas aves pertencentes ao grupo B (peptídeos) e C (CpG-ODN) em relação ao grupo controle não infectado. Aos 14 dpi, aves de todos os grupos desafiados com SH apresentaram vilosidades menores em comparação às do grupo controle não infectado. Aos 21 dpi, as aves do grupo B (peptídeos) apresentaram menor média para este parâmetro. Enquanto que aos 28 dpi, a altura de vilosidades demonstrou-se maior nas aves do grupo C (CpG-ODN) quando comparadas às dos grupos A (peptídeos + CpG-ODN), B (peptídeos) e D (PBS), ficando semelhante às do grupo controle não infectado. Tais resultados sugerem que o CpG-ODN possa ter auxiliado na modulação da resposta imune adaptativa na mucosa intestinal, atenuando os efeitos deletérios causados por SH as vilosidades intestinais (ZHANG et al., 2014). Tal ação também foi constatada por Ameiss et. al (2006) que observaram que o CpG-ODN, quando administrado via oral, foi capaz de aumentar respostas humorais específicas no intestino das aves, sugerindo sua capacidade de melhorar a imunidade intestinal contra patógenos entéricos.

Em relação à profundidade de criptas, aos 7 dpi não houve diferença entre os tratamentos. No entanto, aos 14 dpi, as aves do grupo B (peptídeos) apresentaram criptas mais profundas em relação aos grupos C (CpG-ODN), D (PBS) e controle não infectado. Aos 21 dpi as aves do grupo C (CpG-ODN) apresentaram menor profundidade de cripta quando comparadas às do grupo D (PBS). Aos 28 dpi, as aves do grupo B (peptídeos) apresentaram maior média do parâmetro profundidade de cripta, indicando que os peptídeos escolhidos, quando utilizados sem o CpG-ODN, não auxiliaram no restabelecimento da saúde intestinal. Considerando os resultados obtidos para esse parâmetro, é possível sugerir que o CpG-OND possa ter auxiliado na modulação da resposta imune adaptativa, no controle da infecção intestinal e, conseqüentemente, na renovação celular. A inflamação local causada por patógenos na mucosa intestinal leva à diferenciação e proliferação dos enterócitos nas criptas, resultando na substituição das células danificadas na extremidade da vilosidade (WICKRAMASURIYA et al, 2022). Considerando que o CpG-ODN possui propriedades como o estímulo da expressão de genes envolvidos na imunidade inata, este pode ser capaz de reduzir o tempo de ação do sistema imune para detecção e eliminação de microrganismos infectantes. Além disso, essa ativação da resposta imune é acompanhada da regulação de genes envolvidos na apoptose e rearranjo do citoesqueleto de actina (OUATTARA et al., 2020; WICKRAMARACHCHI et al., 2010.), melhor preservando a integridade do epitélio intestinal.

No que diz respeito à relação vilosidade:cripta, aos 7 dpi as aves do grupo C (CpG-ODN) apresentaram menor média em relação às dos grupos A (peptídeos + CpG-ODN) e B (peptídeos), mas não diferiu em relação às aves dos grupos D (PBS) e E (não infectado). Aos 14 dpi a relação vilosidade:cripta foi significativamente maior no grupo controle não infectado (E) em relação aos demais grupos. Aos 21 dpi, as aves do grupo C (CpG-ODN) apresentaram maior média para o referido parâmetro quando comparadas às dos grupos B (peptídeos) e D (PBS). Aos 28 dpi os grupos A (peptídeos + CpG-ODN) e B (peptídeos) apresentaram as menores médias para relação vilosidade:cripta indicando que não houve efeito benéfico decorrente da inoculação destes componentes neste período. A resposta inflamatória, quando induzida ou regulada de forma inadequada, pode causar danos colaterais ao hospedeiro (BARTON, 2008). Algumas células que são recrutadas durante a resposta imune podem liberar conteúdo tóxico de seus grânulos, como espécies reativas de oxigênio e enzimas (NATHAN, 2006). Tais componentes são inespecíficos e podem também atingir e provocar danos às células de outros tecido do hospedeiro (NATHAN, 2002). Embora não seja possível afirmar, acredita-

se que ao longo do estudo os peptídeos aparentemente exacerbaram a inflamação, o que pode ter prejudicado a estrutura das células intestinais frente ao desafio.

De maneira geral, a inoculação *in ovo* das soluções contendo peptídeos não promoveu melhora nos parâmetros relacionados à saúde intestinal e também não reduziu a excreção fecal de SH ao longo do estudo. No entanto, quando os peptídeos foram associados ao CpG-ODN observou-se redução na colonização cecal por SH aos 7 dpi. Aparentemente os efeitos imunomoduladores do CpG-ODN (MacKINNON et al., 2009) podem ter auxiliado na recuperação da mucosa intestinal frente à infecção por SH. Diante dos resultados obtidos, acredita-se que a estimulação de resposta imune prematura do embrião de galinha para prevenção de infecções por *Salmonella* spp. pode ser uma linha promissora e que poderia ser útil ao setor avícola após aprimoramento por novas pesquisas.

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que o presente estudo foi conduzido, pôde-se concluir que:

- As soluções administradas não atuaram na redução da excreção fecal por SH ao longo do estudo.
- A solução de peptídeos acrescida de CpG-ODN administrada *in ovo* reduziu a contagem de SH no conteúdo cecal das aves aos 7 dpi.
- A inoculação *in ovo* de CpG-ODN melhorou indicadores de saúde intestinal das aves ao final do estudo, que apresentaram menor profundidade de cripta aos 21 dpi e maior altura de vilosidade aos 28 dpi.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 10. ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2022.

ABPA. **Relatório Anual ABPA 2022**. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/05/Relatorio-Anual-ABPA-2022-1.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2022.

ALIKHAN, N.-F. et al. Dynamics of *Salmonella enterica* and antimicrobial resistance in the Brazilian poultry industry and global impacts on public health. **PLOS Genetics**, v. 18, n. 6, p. e1010174, 2022.

- ALQHTANI, A. H. et al. Effects of the *In Ovo* Vaccination of the ts-11 Strain of *Mycoplasma gallisepticum* in Layer Embryos and Posthatch Chicks. **Animals**, v. 12, n. 9, 2022.
- AMEISS, K. A. et al. Influence of orally administered CpG-ODNs on the humoral response to bovine serum albumin (BSA) in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3-4, p. 257-267, 2006.
- ANTUNES, P. et al. Salmonellosis: The role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110–121, 2016.
- AWAD, W. A. et al. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, n. 1, p. 49–55, 2009.
- BAKER, P. L. W. A. R.; JAMES, W. O. Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* in raw poultry products. **Re. Sci. Tech. Off. Int. Epiz**, v. 16, n. 2, p. 525–541, 1997.
- BARROW, P. A. et al. The long view: *Salmonella* - the last forty years. **Avian Pathology**, v. 41, n. 5, p. 413–420, 2012.
- BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 19, n. 2, p. 351–375, 2000.
- BARTON, G. M. A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 413–420, 2008.
- BERCHIERI JÚNIOR, A. et al. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: Effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, v. 30, n. 3, p. 221–231, 2001.
- BERNADINO, A.; DAGA, M. Vacinações “*in ovo*”. In: MACARI, M. et al. **Manejo da Incubação**. 3. ed. Campinas, SP: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas - FACTA, 2013. p. 397–408.
- BERNAL-BAYARD, J.; RAMOS-MORALES, F. Molecular mechanisms used by *Salmonella* to evade the immune system. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 25, p. 133–168, 2018.
- BHUNIA, A. K. *Salmonella enterica*. In: **Foodborne Microbial Pathogens. Food Science Text Series**. [s.l.] Springer, 2018. v. 27p. 271–287.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 20, DE 21 DE OUTUBRO DE 2016. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 out. 2016, edição 205, seção 1, pag. 13.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 78, DE 3 DE NOVEMBRO DE 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 nov. 2003, seção 1, pag. 3.

BRASIL. **Portaria n.º 193, de 19 de setembro de 1994**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 set. 1994, seção 1, pag. 13.

BRASIL. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil - Informe 2022**. Sinan/SVS/Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/copy_of_apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CASANOVA, N. A. et al. Efficacy of chestnut and quebracho wood extracts to control *Salmonella* in poultry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 135–145, 2021.

CHAPPELL, L. et al. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 53–59, 2009.

CHEN, H. M. et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. **Pediatrics and Neonatology**, v. 54, n. 3, p. 147–152, 2013.

CHIA, T. W. R. et al. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 853–859, 2009.

COLLA, F. L. et al. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 603–606, 2012.

COLLINEAU, L. et al. A within-flock model of *Salmonella* Heidelberg transmission in broiler chickens. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 174, n. November 2019, p. 104823, 2020.

COSTA, J. N. B. **ESTUDO RETROSPECTIVO DA OCORRÊNCIA DE SALMONELOSE NO BRASIL NO PERÍODO DE 2000 A 2018**. Instituto Adolfo Lutz, 2020. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1141131>

CRHANOVA, M. et al. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2755–2763, 2011.

CUPERUS, T. et al. Protective effect of *in ovo* treatment with the chicken cathelicidin analog D-CATH-2 against avian pathogenic *E. coli*. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 1–11, 2016.

DALLOUL, R. A. et al. *In ovo* administration of CpG oligodeoxynucleotides and the recombinant microneme protein MIC2 protects against *Eimeria* infections. **Vaccine**, v. 23, n. 24, p. 3108–3113, 2005.

DANTAS, S. T. A. et al. Environmental persistence and virulence of *Salmonella* spp. Isolated from a poultry slaughterhouse. **Food Research International**, v. 129, n. November 2019, p. 108835, 2020.

DECUYPERE, E. et al. Desafios no processo de incubação. In: MACARI, M. et al. **Manejo da Incubação**. 3. ed. Campinas, SP: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas -

FACTA, 2013. p. 229–313.

DIECKMANN, R.; MALORNY, B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4136–4146, 2011.

DING, X. et al. *In ovo* vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. **Vaccine**, v. 23, n. 28, p. 3733–3740, 2005.

ELLIOTT, K. E. C. et al. Early post-hatch survival and humoral immune response of layer chickens when *in ovo* vaccinated with strain F *Mycoplasma gallisepticum*. **Poultry Science**, v. 97, n. 11, p. 3860–3869, 2018.

FAN, S. et al. In-ovo Newcastle disease virus vaccine strain TS09-C protects commercial chickens against Newcastle disease in the presence of maternally derived antibodies. **Poultry Science**, v. 99, n. 5, p. 2438–2443, 2020.

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FOLEY, S. L. et al. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4273–4279, 2011.

FREITAS NETO, O. C.; PENHA FILHO, R. A. C.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R. L. et al. **Doenças das aves**. 3. ed. Campinas, SP: FACTA, 2020. p. 495–516.

GAST, R. K. et al. Colonization of internal organs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. **Poultry Science**, v. 92, n. 2, p. 468–473, 2013.

GAST, R. K. et al. Effect of prior passage through laying hens on invasion of reproductive organs by *Salmonella* Enteritidis. **International Journal of Poultry Science**, v. 8, p. 116–121, 2009.

GIAMBRONE, J. J.; DORMITORIO, T.; BROWN, T. Safety and efficacy of *in ovo* administration of infectious bursal disease viral vaccines. **Avian Diseases**, v. 45, n. 1, p. 144–148, 2001.

GIMENO, I. M. et al. *In Ovo* Vaccination with Turkey Herpesvirus Hastens Maturation of Chicken Embryo Immune Responses in Specific-Pathogen-Free Chickens. **Avian Diseases**, v. 59, n. 3, p. 375–383, 2015.

GÓES, V. et al. *Salmonella* Heidelberg side-step gene loss of respiratory requirements in chicken infection model. **Microbial Pathogenesis**, v. 171, n. February, p. 1–5, 2022.

GÓMEZ DEL MORAL, M. et al. Appearance and development of lymphoid cells in the chicken (*Gallus gallus*) caecal tonsil. **Anatomical Record**, v. 250, n. 2, p. 182–189, 1998.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26–29, 2010.

HAI, D. et al. Occurrence, drug resistance, and virulence genes of *Salmonella* isolated from chicken and eggs. **Food Control**, v. 113, n. January, p. 107109, 2020.

HAN, Y. et al. Temporal dynamics of innate and adaptive immune responses in broiler birds to oral delivered chitosan nanoparticle-based *Salmonella* subunit antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 228, p. 110111, 2020.

HE, H. et al. Identification of CpG oligodeoxynucleotide motifs that stimulate nitric oxide and cytokine production in avian macrophage and peripheral blood mononuclear cells. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, n. 6–7, p. 621–627, 2003.

HOELZER, K. et al. Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 2: New approaches and potential solutions. **Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 1–15, 2018.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J. DA; REIS, E. M. F. DOS. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55–62, 1997.

HOLT, P. S. Effects of induced moulting on immune responses of hens. **British Poultry Science**, v. 33, n. 1, p. 165-175, 1992.

HOLT, P. S. et al. Hyporesponsiveness of the systemic and mucosal humoral immune systems in chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis at one day of age. **Poultry Science**, v. 78, n. 11, p. 1510-1517, 1999.

HURLEY, D. et al. *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–11, 2014.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 2, p. 197–216, 2002.

JANKOVIĆ, B. D. et al. Immunological capacity of the chicken embryo. II. Humoral immune responses in embryos and young chickens bursectomized and sham-bursectomized at 52 – 64h of incubation. **Immunology**, v. 32, n.5, p. 689-699, 1977.

JANKOVIĆ, B. D. et al. Immunological capacity of the chicken embryo. I. Relationship between the maturation of lymphoid tissues and the occurrence of cell mediated immunity in the developing chicken embryo. **Immunological Communications**, v. 29, n.3, p. 497-508, 1975.

JEURISSEN, S. H. M. et al. Parameters and techniques health of poultry as constituted by immunity, integrity and functionality. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2002.

JOHNSTON, P. A. et al. Applications in *In Ovo* Technology. **Poultry Science**, v. 76, p. 165–178, 1993.

KALDHONE, P. R.; FOLEY, S. L.; RICKE, S. C. *Salmonella* Heidelberg in Layer Hens and Egg Production: Incidence and Potential Issues. In: **Producing Safe Eggs: Microbial Ecology of *Salmonella***. Jefferson, AR, United States: Elsevier Inc., 2017. p. 235–256.

KEESTRA-GOUNDER, A. M.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. Now you see me, now you don't: the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 206–216, 2015.

KIPPER, D. et al. Recent Evolution and Genomic Profile of *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from Poultry Flocks in Brazil. **American Society for Microbiology - Applied and Environmental Microbiology**, p. 19, 2021.

KRAMER, J. et al. Characterization of the innate and adaptive immunity to *Salmonella* Enteritidis PT1 infection in four broiler lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, n. 3–4, p. 219–233, 2001.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

MACKINNON, K. M. et al. *In ovo* treatment with CpG oligodeoxynucleotides decreases colonization of *Salmonella* enteritidis in broiler chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 3–4, p. 371–375, 2009.

MAIORKA, A.; LUQUETTI, B. C.; MACARI, M. Idade da matriz e qualidade do pintinho. In: MACARI, M. et al. **Manejo da Incubação**. 3. ed. Campinas, SP: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas - FACTA, 2013. p. 163–173.

MAJOWICZ, S. E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882–889, 2010.

MARCANO, V. C. et al. A novel recombinant newcastle disease vaccine improves post-*in ovo* vaccination survival with sustained protection against virulent challenge. **Vaccines**, v. 9, n. 9, 2021.

MAST, J. et al. Vaccination of chicken embryos with escape mutants of La Sota Newcastle disease virus induces a protective immune response. **Vaccine**, v. 24, n. 11, p. 1756–1765, 2006.

MASTROENI, P. et al. *Salmonella*: Immune responses and vaccines. **Veterinary Journal**, v. 161, n. 2, p. 132–164, 2001.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2001.

MELO, R. T. et al. Molecular Characterization and Survive Abilities of *Salmonella* Heidelberg Strains of Poultry Origin in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. June, 2021.

MONTASSIER, H. J. Fisiopatologia do sistema imune. In: ANDREATTI FILHO, R. L. et al. **Doenças das aves**. 3. ed. Campinas, SP: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2020. v. 00p. 458–467.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173–182, 2006.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–852, 2002.

NUÑCIO, A. S. P. et al. International Journal of Food Microbiology Genomic characterization of multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg E2 strain isolated from chicken carcass in southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 379, n. September 2021, p. 109863, 2022.

OUATTARA, D. A. et al. An integrated transcriptomics and metabolomics study of the immune response of newly hatched chicks to the cytosine-phosphate-guanine oligonucleotide stimulation. **Poultry Science**, v. 99, n. 9, p. 4360–4372, 2020.

PEEBLES, E. D. *In ovo* applications in poultry: A review. **Poultry Science**, v. 97, n. 7, p. 2322–2338, 2018.

PENHA FILHO, R. A. C. **Resposta imune celular e humoral em aves (*Gallus gallus*) vacinadas, antes e após o desafio com *Salmonella* Enteritidis**. Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Jaboticabal, 2013. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/104670/penhafilho_rac_dr_jabo.pdf;jsessionid=CEB646B3983FF40990CE535C42BBF034?sequence=1

PETERSON, A. L. et al. Enhancement of cellular and humoral immunity in young broilers by the dietary supplementation of β -Hydroxy- β -Methylbutyrate. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 21, n.2, p. 307-330, 1999.

PINEDA, M. R. et al. Evaluation of sodium bisulfate on reducing *Salmonella* Heidelberg biofilm and colonization in broiler crops and ceca. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, 2021.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. et al. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 288–294, 2013.

RAUTENSCHLEIN, S.; HAASE, C. Differences in the immunopathogenesis of infectious bursal disease virus (IBDV) following *in ovo* and post-hatch vaccination of chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, n. 1–2, p. 139–150, 2005.

REIJRINK, I. A. M. et al. Influence of egg storage time and preincubation warming profile on embryonic development, hatchability, and chick quality. **Poultry Science**, v. 89, n. 6, p. 1225-1238, 2010.

RUBY, T. et al. *Salmonella*'s long-term relationship with its host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 600–615, 2012.

SAEED, M. et al. *In ovo* delivery of various biological supplements, vaccines and drugs in

poultry: current knowledge. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 8, p. 3727–3739, 2019.

SAJEWICZ-KRUKOWSKA, J.; OLSZEWSKA-TOMCZYK, M.; DOMAŃSKA-BLICHARZ, K. *In ovo* administration of CpG ODN induces expression of immune response genes in neonatal chicken spleen. **Journal of Veterinary Research (Poland)**, v. 61, n. 4, p. 451–458, 2017.

SAVELKOUL, H. F. J. et al. Choice and design of adjuvants for parenteral and mucosal vaccines. **Vaccines**, v. 3, n. 1, p. 148–171, 2015.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SEO, K. H. et al. Mucosal humoral immunity to experimental *Salmonella* Enteritidis infection in the chicken crop. **Avian Diseases**, v. 46, n. 4, p. 1015–1020, 2002.

SHARMA, J. M.; BURMESTER, B. R. Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. **Avian diseases**, v. 26, n. 1, p. 134–149, 1982.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675–1683, 2008.

SOKALE, A. O. et al. Effects of administration of an *in ovo* coccidiosis vaccine at different embryonic ages on vaccine cycling and performance of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, p. 100914, 2021.

SOLOMON, J. B. Induction of antibody formation to goat erythrocytes in the developing chick embryo and effects of maternal antibody. **Immunology**, v. 11, p. 89-96, 1966.

SOUZA, A. I. S. et al. High occurrence of β -lactamase-producing *Salmonella* Heidelberg from poultry origin. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. 1–11, 2020.

ST. PAUL, M. et al. Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 3–4, p. 191–199, 2013.

STONE, H.; MITCHELL, B.; BRUGH, M. *In ovo* vaccination of chicken embryos with experimental Newcastle disease and avian influenza oil-emulsion vaccines. **Avian Diseases**, v. 41, n. 4, p. 856–863, 1997.

TEIXEIRA, M. S. et al. Assessment of maternal immunity against *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in progeny of broiler breeders vaccinated with different formulations of bacterins. **Avian Pathology**, v. 51, n. 2, p. 197–205, 2022.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

TONA, K. et al. Effects of age of broiler breeders and egg storage on egg quality, hatchability, chick quality, chick weight, and chick posthatch growth to forty-two days. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, n. 1, p. 10-18, 2004.

- VAEZIRAD, M. M. et al. Chicken immune response following *in ovo* delivery of bacterial flagellin. **Vaccine**, v. 36, n. 16, p. 2139–2146, 2018.
- VANDEPUTTE, J. et al. *In ovo* vaccination of broilers against *Campylobacter jejuni* using a bacterin and subunit vaccine. **Poultry Science**, v. 98, n. 11, p. 5999–6004, 2019.
- VELLANO, I. H. B. et al. Comparison of microbiological, pathological, and zootechnical aspects between broiler chickens and turkeys challenged with *Salmonella* Heidelberg. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 31, n. 3, 2022.
- VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433–441, 2015.
- VOSS-RECH, D. et al. Longitudinal study reveals persistent environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. **Veterinary Microbiology**, v. 233, n. April, p. 118–123, 2019.
- VUGIA, D. J. et al. Invasive *Salmonella* infections in the United States, foodnet, 1996-1999: Incidence, serotype distribution, and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. SUPPL. 3, p. 1996–1999, 2004.
- WEBBER, B. et al. Surface conditioning with bacteriophages reduces biofilm formation of *Salmonella* Heidelberg. **Food Science and Technology International**, 2022.
- WEBER, F. H.; EVANS, N. A. Immunization of broiler chicks by *in ovo* injection of *Eimeria tenella* sporozoites, sporocysts, or oocysts. **Poultry Science**, v. 82, n. 11, p. 1701–1707, 2003.
- WEST, A. P.; KOBLANSKY, A. A.; GHOSH, S. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 409–437, 2006.
- WICKRAMARACHCHI, D. C; THEOFILOPOULOS, A. N.; KONO, D. H. Immune pathology associated with altered actin cytoskeleton regulation. *Autoimmunity*, v. 43, n. 1, p. 64-75, 2010.
- WICKRAMASURIYA, S. S. et al. Role of Physiology, Immunity, Microbiota, and Infectious Diseases in the Gut Health of Poultry. **Vaccines**, v. 10, n. 2, 2022.
- WIGLEY, P. et al. *In vivo* and *in vitro* studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SAL1 locus. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 11, p. 1111–1120, 2002.
- WIGLEY, P. et al. Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1425–1430, 2006.
- WILLEMSSEN, H. Mecanismos de controle fisiológico no final da embriogênese e durante a bicagem e a eclosão. In: MACARI, M. et al. **Manejo da Incubação**. 3. ed. Campinas, SP: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas - FACTA, 2013. p. 65–82.

WILLIAMS, C. J.; ZEDEK, A. S. Comparative field evaluations of *in ovo* applied technology. **Poultry Science**, v. 89, n. 1, p. 189–193, 2010.

WINTER, S. E. et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature**, v. 467, n. 7314, p. 426–429, 2010.

XU, Z. R. et al. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. **Poultry Science**, v. 82, n. 6, p. 1030–1036, 2003.

YADAV, A. S. et al. Exploring alternatives to antibiotics as health promoting agents in poultry- a review. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 4, n. 2320, p. 368–383, 2016.

YAMAZAKI, W. et al. *Campylobacter* and *Salmonella* are prevalent in broiler farms in Kyushu, Japan: Results of a 2-year distribution and circulation dynamics audit. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1711–1722, 2016.

YASON, C. V.; SUMMERS, B. A.; SCHAT, K. A. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: pathology. **American Journal of Veterinary Research**, v. 6, p. 927–938, 1987.

ZANCAN, F. T. et al. *Salmonella* spp investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 230–232, 2000.

ZANETTI, N. S. et al. Molecular Detection and Characterization of *Salmonella* Gallinarum From Poultry Farms in Brazil. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 28, n. 4, p. 1335–1341, 2019.

ZHANG, Y. G. et al. *Salmonella*-infected crypt-derived intestinal organoid culture system for host–bacterial interactions. **Physiological Reports**, v. 2, n. 9, p. 1–11, 2014.

ZHAO, S. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6656–6662, 2008.