

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Eric Santos Oliveira

PATOLOGIA E PATOGÊNESE DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
***SALMONELLA* GALLINARUM EM PINTINHOS DE CORTE**

Belo Horizonte
2024

Eric Santos Oliveira

**PATOLOGIA E PATOGÊNESE DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
SALMONELLA GALLINARUM EM PINTINHOS DE CORTE**

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.

Área de Concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof.^a Dr.^a Roselene Ecco

Coorientador: Prof. Dr. Oliveiro C. de Freitas Neto

Belo Horizonte
2024

O48p Oliveira, Eric Santos, 1996-
Patologia e patogênese da infecção experimental por *Salmonella Gallinarum* em pintinhos de corte/ Eric Santos Oliveira. – 2024.
83 f: il.

Orientadora: Roselene Ecco
Coorientador: Oliveiro Caetano de Freitas Neto

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.
Bibliografia: F. 78 - 80
Anexos: F. 81 - 82.

1. Ave - Doenças - Teses - 2. Ave - Parasito - Teses - 3. Frango de corte - Teses - I. Ecco, Roselene - II. Freitas Neto, Oliveiro Caetano – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título

CDD – 636.513

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

ERIC SANTOS OLIVEIRA

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 PATOLOGIA ANIMAL.

Aprovado(a) em 04 de abril de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Professora Dra. Roselene Ecco - Orientador(a)

Professor Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto (co-orientador)

Professor Dr. Angelo Berchieri Junior

Professora Dra. Renata Assis Casagrande



Documento assinado eletronicamente por **Roselene Ecco, Professora do Magistério Superior**, em 05/04/2024, às 18:56, 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 **Angelo Berchieri Junior, Usuário Externo**, em 08/04/2024, às 14:44, 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 **Oliveiro Caetano de Freitas Neto, Professor do Magistério Superior**, em 09/04/2024, às 09:24, 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 **Renata Assis Casagrande, Usuário Externo**, em 09/04/2024, às 10:22, 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 **3153316** e o código CRC **25F4B913**.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por tudo o que fez em minha vida. Todos os caminhos que tracei e conquistas alcançadas que me fizeram chegar até aqui, devo a Ele e também a minha família: meus pais, Maria José e José Dias; minha irmã, Nayara; e meu sobrinho, Miguel. Obrigado por sempre apoiarem minhas escolhas e por toda ajuda ao longo desses anos. Se cheguei até aqui foi graças aos esforços de vocês.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMG que me possibilitou a realização do mestrado e de crescimento acadêmico, bem como à CAPES pela concessão da bolsa.

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial a minha orientadora Roselene Ecco. Obrigado por toda a paciência, prontidão para ensinar, convivência, troca de experiências ao longo desses anos e contribuição para o meu crescimento profissional e acadêmico. A realização deste trabalho só foi possível graças a você. Agradeço também ao meu coorientador Oliveira Caetano por todo o aprendizado que pude adquirir, pela ajuda com a realização do experimento e pela oportunidade concedida em participar de outros projetos com experimentação animal.

Agradeço imensamente a Michelle Gabardo que encaminhou as amostras que deram origem a este trabalho. E também aos professores que compuseram a banca examinadora e que contribuíram para melhorar a parte escrita: Renata Assis Casagrande, Ângelo Berchieri Júnior, Nelson Rodrigo da Silva Martins e Roberto Maurício Carvalho Guedes.

Agradeço também a todos que compõem o *Ecco Team*, pós-graduandos e alunos de iniciação científica, em especial a Maira, Marcelo, Dayse, Natália Lara, Camila e Carlos Eduardo. Foi um prazer conviver com vocês. Obrigado por toda a ajuda, momentos de diversão e aprendizado.

A conclusão deste trabalho só foi possível graças aos esforços de muitas pessoas que me ajudaram desde as etapas iniciais do experimento piloto, processamento e análise dos resultados, por isso agradeço imensamente aos alunos de iniciação científica Pedro, Yasmin, Luana, Jordana, Gabriela Ávila, Gabriela Boanerges, Rodrigo e Izadora; aos pós-graduandos Maira, Marcelo, Leticia Cury, Victoria e Carlos Eduardo; aos técnicos Mailson, Leimar e Valéria; e ao professor Raphael Wenceslau.

Agradeço também a todas as pessoas que conheci no período do mestrado, dentro e fora da Universidade, e que me proporcionaram momentos de alegria, em especial a Alexandre. Sem esquecer dos amigos e pessoas importantes que contribuíram na minha vida acadêmica e

pessoal, agradeço a Iolanda, Valter, Alexsander, Marcos, Ludmila, Jenifer, Allef, Flávia, Isabelle, Amanda, Gabriela Medeiros, Daniele, Letícia Campos, Maria Eduarda e Cíntia.

Por fim, agradeço a todos os pós-graduandos e professores do setor de Patologia Animal da UFMG pela convivência, troca de experiências e aprendizado. Um agradecimento especial à professora Lorena, que desde o período da graduação é minha inspiração na Patologia. Se cheguei até aqui, também foi graças a você.

RESUMO

Surtos de *Salmonella* spp. na avicultura têm sido frequentes nos últimos anos, resultando em grandes perdas econômicas e problemas em saúde pública. Dentre os sorovares que infectam as aves, *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum é um dos que tem sido isolado mais frequentemente em surtos em aves jovens. Com o intuito de estudar a patogênese do tifo aviário em pintinhos, o presente trabalho tem como objetivo reproduzir experimentalmente lesões entéricas e sistêmicas por *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum isolada de um surto natural da doença. No experimento, foram utilizados 160 pintinhos de corte da linhagem Ross com dois dias de vida. As aves foram divididas em quatro grupos e receberam inoculação por via oral e intranasal em diferentes doses. Do 3º ao 12º dia pós-inoculação, realizou-se eutanásia e necropsia das aves para colheita de amostras para exames bacteriológico, histopatológico e imuno-histoquímico. Foram encontradas lesões macroscópicas e histológicas clássicas como hepatite, esplenite e miocardite fibrinonecrótica e/ou histiocitária nas aves de todos os grupos. Destaca-se também a ocorrência de lesões incomuns, como quadros severos de enterite histiocitária transmural e não transmural, laringite e traqueíte histiocitárias, pneumonia intersticial histiocitária, glomerulonefrite, trombose glomerular, mielite óssea fibrinosa e/ou histiocitária, bursite necrótica e/ou histiocitária e encefalite necrótica e histiocitária. Essas lesões foram atribuídas a *Salmonella* Gallinarum por meio da marcação *in situ* do agente pela técnica de imuno-histoquímica em todos os tecidos afetados, bem como pela recuperação do agente em tecidos como fígado e baço na bacteriologia. Ainda, pôde-se constatar que, quando inoculada pela via intranasal, a bactéria causou uma apresentação mais patogênica da doença quando comparada a via oral, afetando um maior número de órgãos e segmentos do intestino. Com isso, destaca-se a importância da via respiratória na reprodução da doença em casos experimentais e em surtos espontâneos da doença em pintinhos.

Palavras-chave: patogênese; *Salmonella* Gallinarum; lesões histológicas; pintinhos; intranasal; oral; enterite; pneumonia.

ABSTRACT

Salmonella spp. outbreaks in poultry farming have been frequent in recent years, resulting in significant economic losses and public health issues. Among the serovars that infect birds, *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum is one that has been isolated most frequently in outbreaks in young birds. In an effort to study the pathogenesis of fowl typhoid in chicks, the present study aims to experimentally reproduce enteric and systemic lesions caused by *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum isolated from a natural outbreak of the disease. In the experiment, 160 two-day-old Ross broiler chicks were used. The birds were divided into four groups and received oral and intranasal inoculation in different doses. From the 3rd to the 12th day post-inoculation, euthanasia and necropsy were performed on the birds to collect samples for bacteriological, histopathological, and immunohistochemical examinations. Classic gross and histological lesions such as fibrinonecrotic and/or histiocytic hepatitis, splenitis, and myocarditis were found in birds of all groups. However, the occurrence of unusual lesions was also noted, such as severe cases of transmural and non-transmural histiocytic enteritis, histiocytic laryngitis and tracheitis, histiocytic interstitial pneumonia, glomerulonephritis, glomerular thrombosis, fibrinous and/or histiocytic bone myelitis, necrotic and/or histiocytic bursitis, and necrotic and histiocytic encephalitis. These lesions were attributed to *Salmonella* Gallinarum through the *in situ* labeling of the agent by immunohistochemistry in all affected tissues, as well as by the recovery of the agent in tissues such as liver and spleen in bacteriology. Additionally, it was found that when inoculated via the intranasal route, the bacteria caused a more pathogenic presentation of the disease compared to the oral route, affecting a larger number of organs and segments of the intestine. Therefore, the importance of the respiratory route in the reproduction of the disease in experimental cases and spontaneous outbreaks of the disease in chicks is highlighted.

Keywords: pathogenesis; *Salmonella* Gallinarum; histological lesions; chicks; intranasal; oral; enteritis; pneumonia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens macroscópicas das lesões no fígado no 4º, 5º e 11º dpi e baço no 11º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e intranasal	29
Figura 2 – Imagens macroscópicas das lesões nos pulmões no 4º e 5º dpi e rins no 5º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral	30
Figura 3 – Imagens macroscópicas das lesões no coração no 11º dpi e no intestino no 5º e 10º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e intranasal	31
Figura 4 – Imagens microscópicas das lesões no fígado no 7º dpi e no baço no 6º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo A)	36
Figura 5 – Imagens microscópicas das lesões nos pulmões no 5º dpi de ave inoculada com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo A)	37
Figura 6 – Imagens microscópicas das lesões no fígado e no baço no 5º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)	38
Figura 7 – Imagens microscópicas das lesões nos pulmões no 4º e 5º dpi e no coração no 6º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)	39
Figura 8 – Imagens microscópicas das lesões no íleo no 3º e 4º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)	40
Figura 9 – Imagem microscópica da lesão no íleo no 3º dpi de ave inoculada com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)	41
Figura 10 – Imagem microscópica da lesão no ceco no 4º dpi de ave inoculada com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)	42
Figura 11 – Imagens microscópicas das lesões no ceco no 3º e 4º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)	43
Figura 12 – Imagens microscópicas das lesões nos rins e na medula óssea no 4º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)	44
Figura 13 – Imagens microscópicas das lesões na laringe no 3º dpi de ave inoculada com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)	45
Figura 14 – Imagens microscópicas das lesões na bolsa cloacal no 5º dpi de ave inoculada com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)	46
Figura 15 – Imagem microscópica da lesão no fígado no 7º dpi de ave inoculada com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo C)	47
Figura 16 – Imagens microscópicas das lesões nos pulmões e no coração no 7º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo C)	48
Figura 17 – Imagens microscópicas das lesões nos rins no 5º, 6º, 7º e 9º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo C)	49
Figura 18 – Imagens microscópicas das lesões na medula óssea no 8º dpi, no saco da gema no 7º dpi e no encéfalo no 7º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo C)	50

Figura 19 – Lesões microscópicas no fígado no 8º dpi, no baço no 8º dpi e no coração no 11º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	51
Figura 20 – Imagens microscópicas das lesões nos pulmões no 10º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	52
Figura 21 – Imagens microscópicas das lesões no íleo no 8º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	53
Figura 22 – Imagens microscópicas das lesões no ceco no 10º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	54
Figura 23 – Imagens microscópicas das lesões no cólon no 9º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	55
Figura 24 – Imagens microscópicas das lesões nos rins no 8º dpi e no saco da gema no 11º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	56
Figura 25 – Imagens microscópicas das lesões na medula óssea no 5º e 9º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	57
Figura 26 – Imagens microscópicas das lesões na laringe, no esôfago e na traqueia no 10º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	58
Figura 27 – Imagens microscópicas das lesões no encéfalo no 8º dpi de ave inoculada com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	59
Figura 28 – Imagens microscópicas das lesões na bolsa cloacal no 10º dpi e no saco aéreo no 8º dpi das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)	60
Figura 29 – Imagens imuno-histoquímicas de múltiplos tecidos das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e intranasal	62
Figura 30 – Imagens imuno-histoquímicas dos pulmões das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e intranasal	63
Figura 31 – Imagens imuno-histoquímicas da laringe das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e intranasal	64
Figura 32 – Imagens imuno-histoquímicas da bolsa cloacal e da medula óssea das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e intranasal	65
Figura 33 – Imagens imuno-histoquímicas de múltiplos órgãos das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e intranasal	66
Figura 34 – Imagens imuno-histoquímicas dos rins e da adrenal das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e intranasal	67
Figura 35 – Imagens imuno-histoquímicas do intestino das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e intranasal	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência dos achados macroscópicos nos grupos A e B de aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral	28
Tabela 2 – Frequência dos achados macroscópicos nos grupos C e D de aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal	29
Tabela 3 – Frequência dos achados microscópicos e imuno-histoquímicos nos grupos A e B de aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral	34
Tabela 4 – Frequência dos achados microscópicos e imuno-histoquímicos nos grupos C e D de aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via intranasal	35
Tabela 5 – Intensidade das lesões nos diferentes órgãos das aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e por via intranasal	61
Tabela 6 – Resultado da contagem bacteriana em Log ₁₀ UFC/mL no 3º, 5º e 6º dpi de aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e por via intranasal	69
Tabela 7 – Resultado da contagem bacteriana em Log ₁₀ UFC/mL no 7º, 9º e 12º dpi de aves inoculadas com <i>Salmonella</i> Gallinarum por via oral e por via intranasal	69
Tabela 8 – Resultados da análise estatística para razão de chance de ocorrência das lesões histológicas com efeito significativo	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVB	Ágar verde brilhante
BALT	Tecido linfoide associado a brônquios
CONCEA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	3.3'-diaminobenzidina
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
dpi	Dia(s) pós-inoculação
EV	Escola de Veterinária
HE	Hematoxilina e Eosina
IC	Intervalo de confiança
IHQ	Imuno-histoquímica
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MULTILAB	Unidade Multidisciplinar de Pesquisa Animal
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
SG	<i>Salmonella</i> Gallinarum
SP	<i>Salmonella</i> Pullorum
SIF	Serviço de Inspeção de Federal
SPI	Ilhas de patogenicidade
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VI	Via intranasal
VO	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Etiologia.....	14
2.2 Epidemiologia	15
2.3 Patogênese.....	16
2.4 Sinais clínicos.....	17
2.5 Achados anatomopatológicos.....	17
2.6 Diagnóstico	18
2.7 Prevenção e controle.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Delineamento experimental	20
3.2 Necropsia	22
3.3 Histopatologia	22
3.4 Imuno-histoquímica anti- <i>Salmonella</i>	24
3.5 Bacteriologia	25
3.6 Análise estatística.....	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Experimento piloto	26
4.2 Experimento definitivo	27
4.2.1 Achados clínicos	27
4.2.2 Macroscopia.....	28
4.2.3 Histopatologia.....	33
4.2.4 Imuno-histoquímica anti- <i>Salmonella</i>	62
4.2.5 Bacteriologia.....	69
4.2.6 Análise estatística.....	70
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE A	81

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil ocupa a 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 desse setor exige a criação das aves em altas densidades, facilitando a disseminação de patógenos como as bactérias do gênero *Salmonella*, agente infeccioso que, dependendo do sorovar, possui grande importância sanitária para as aves e seres humanos (Voss-rech *et al.*, 2019). Além disso, na avicultura, a salmonelose causa grandes prejuízos econômicos, principalmente nos países em que as medidas de controle sanitário não são eficientes ou as condições climáticas favorecem a disseminação do agente no ambiente (Barrow *et al.*, 2012; Barrow; Freitas Neto, 2011).

No Brasil, os principais sorovares de *Salmonella* envolvidos em casos de surtos na avicultura são: Gallinarum, Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Minnesota (Kipper *et al.*, 2022). Desses, *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar mais isolado em surtos em humanos 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). Além disso, surtos em granjas causados pelo sorovar Gallinarum foram cada vez mais frequentes nas últimas décadas. Esses casos estão relacionados a falhas nos programas de biossegurança e medidas de controle nas granjas (De Carli *et al.*, 2017).

Diante disso, devido aos impactos econômicos e na saúde pública causados pelas infecções por *Salmonella* na produção avícola, estudos na área são fundamentais para melhor entendimento desse agente. A associação da lesão e a identificação da bactéria *in situ*, como por exemplo por imuno-histoquímica, podem esclarecer a patogênese em relação à distribuição da bactéria e das lesões nos diferentes órgãos. Estudos de patogênese do tifo aviário são necessários para elucidar os mecanismos de interação bactéria e hospedeiro pouco esclarecidos, e, assim, permitir o desenvolvimento de novas medidas de controle e prevenção da doença.

Dessa forma, o presente estudo experimental tem os seguintes objetivos:

- Realizar a reprodução experimental da infecção por *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum em pintinhos de frango de corte, isolada de um surto espontâneo da doença;
- Realizar a caracterização das lesões histológicas de acordo com a via de infecção (oral ou intranasal);

- Caracterizar as lesões histológicas sistêmicas encontradas nos diferentes órgãos e em diferentes dias pós-inoculação;
- Associar as lesões encontradas ao agente por meio da marcação *in situ* na imunohistoquímica e recuperação nos tecidos pelo isolamento bacteriano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

A salmonelose é uma doença causada por bactérias do gênero *Salmonella*, o qual abrange um conjunto de bactérias gram-negativas, em forma de bastonetes, intracelular facultativa, não esporuladas, anaeróbias facultativas, produtoras de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e, em sua maioria, não fermentadoras de lactose. O gênero *Salmonella* faz parte da família Enterobacteriaceae, ao lado de micro-organismos dos gêneros *Proteus*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Escherichia*, entre outros (Garrity *et al.*, 2004). O gênero é composto pelas espécies *Salmonella enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A maioria é móvel, possuindo flagelos petríquios, com exceção de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum e biovar Pullorum (Freitas Neto; Penha Filho; Berchieri Júnior, 2020).

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, desses, 1.586 pertencem à subespécie *enterica* (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014), grupo que desempenha papel importante na infecção de humanos e animais homeotérmicos (Bhunja, 2018).

Dentre os sorovares que acometem as aves domésticas de produção, *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum são os principais agentes envolvidos em casos de infecção. Ambas consideradas biovars do sorotipo Gallinarum, sendo descritos da seguinte maneira: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorotipo Gallinarum biovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum) e *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorotipo Gallinarum biovar Pullorum (*Salmonella* Pullorum) (Barrow; Freitas Neto, 2011).

2.2 Epidemiologia

Em aves, *Salmonella* pode causar três doenças diferentes: a pulorose, causada por *Salmonella Pullorum* (SP); o tifo aviário, cujo agente é *Salmonella Gallinarum* (SG); e o paratifo aviário, que pode ser causado por qualquer outro sorovar, exceto *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, sendo chamadas de salmonelas paratíficas. Muitas bactérias do grupo das paratíficas geralmente não possuem hospedeiro específico e podem causar infecções alimentares em seres humanos (Freitas Neto; Penha Filho; Berchieri Júnior, 2020).

A pulorose provoca sepse, quadro de diarreia, alta mortalidade e morbidade em aves infectadas nos primeiros dias de vida. Pode ser transmitida pelas vias vertical e horizontal, podendo ainda desencadear infecção persistente em algumas aves que se recuperam (Shivaprasad; Barrow, 2013). O tifo aviário é caracterizado por uma infecção septicêmica grave, com morbidade e mortalidade elevadas em aves de qualquer idade, principalmente aves adultas, sendo transmitido horizontalmente (Berchieri Júnior *et al.*, 2000; Celis-Estupiñan *et al.*, 2017). Além disso, aves de linhagens pesadas são mais susceptíveis ao tifo aviário quando comparadas com linhagens leves (Oliveira; Berchieri Júnior; Fernandes, 2005; Smith, 1956). Principalmente em infecções causadas por *Salmonella Pullorum*, aves que não morrem podem desenvolver um estado de persistentemente infectada ou portadora da doença (Chappell *et al.*, 2009). Além das aves de produção, infecções por *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* também são descritas em periquitos, codornas, faisões, canários, patos e pavões (Barrow; Freitas Neto, 2011; Casagrande *et al.*, 2014; Tunca *et al.*, 2012).

O paratifo raramente causa doença sistêmica, mas as aves podem se tornar portadoras, disseminando a bactéria no plantel e levando à contaminação dos alimentos de origem avícola (Gast *et al.*, 2009; Zanetti *et al.*, 2019). Nesse grupo, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis é um dos principais agentes envolvidos em casos de infecção em aves poedeiras. Frequentemente, a bactéria coloniza o sistema reprodutor com consequente transmissão vertical para o plantel e, também, transmissão para seres humanos por meio do consumo de ovos contaminados (Davies; Breslin, 2004). Outro sorovar importante nos casos de transmissão para humanos por ovos e carcaças contaminadas é *Salmonella Typhimurium* (Wales; Davies, 2011).

A persistência de salmonelas paratíficas no ambiente da granja favorece a transmissão horizontal para outras aves, principalmente em locais com alta umidade (Gast; Porter, 2020). *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* também podem persistir em condições ambientais favoráveis, no entanto, são menos resistentes ao calor e desinfetantes quando comparadas ao grupo das salmonelas paratíficas (Gast; Porter, 2020).

2.3 Patogênese

Na literatura, muitos fatores de virulência relacionados à patogênese da infecção por *Salmonella* spp. são bem estabelecidos. Dentre eles, destaca-se o flagelo, a cápsula, o sistema de adesão, os plasmídeos e as ilhas de patogenicidade (em inglês: *Salmonella pathogenicity islands*, SPI) (Gast; Porter, 2020; Jajere, 2019). As SPIs são grupos de genes localizados em certas regiões do cromossomo bacteriano responsáveis pela codificação de diversos fatores de virulência – adesão, invasão e produção de toxinas (Jajere, 2019; Langridge *et al.*, 2015). Das 19 SPIs existentes, a depender do sorovar, algumas serão mais importantes do que outras. No sorovar Gallinarum, as SPIs 1 e 3 têm pouca ou nenhuma importância na patogênese da doença, e foram relacionadas a invasão, lesões e colonização intestinal pela bactéria (Chappell *et al.*, 2009; Shivaprasad; Barrow, 2013). Contudo, para esse sorovar, a SPI-2 tem um papel fundamental na infecção, pois está relacionada com a sobrevivência da bactéria em macrófagos, e conseqüentemente, infecção sistêmica (Chappell *et al.*, 2009).

Diferenças entre a patogenicidade dos sorovares que acometem as aves também foram descritas. Infecções por *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum, por exemplo, provocam altas taxas de mortalidade; no entanto, essas bactérias têm baixa capacidade de colonizar o intestino. Por sua vez, salmonelas do grupo das paratíficas colonizam melhor o intestino e podem migrar para órgãos internos como o sistema reprodutivo, a exemplo da *Salmonella* Enteritidis (Gast; Porter, 2020).

Nos casos de transmissão horizontal, *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum infectam as aves por via oral, que posteriormente ultrapassam as células epiteliais intestinais e alcançam o tecido linfóide, principalmente nas regiões das placas de Peyer e tonsila cecal. Dessa forma, as bactérias infectam macrófagos e migram para outros órgãos linfóides, como baço e fígado, onde ocorre a multiplicação bacteriana (Barrow; Freitas Neto, 2011). Entretanto, lesões intestinais dificilmente são relatadas e os mecanismos patogênicos envolvidos são multifatoriais, e por vezes, não elucidados (Ojima *et al.*, 2021).

Um dos motivos para isso são fatores intrínsecos destas bactérias, como ausência de flagelo em *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum que permite a invasão do sistema digestivo sem promover uma resposta inflamatória importante (Barrow; Freitas Neto, 2011). Ainda, há rápida disseminação dessas biovars para órgãos sistêmicos, o que contribui para o número reduzido de bactérias no intestino, principalmente no ceco. Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e IFN- γ nas fases iniciais da infecção por *Salmonella* Gallinarum, é baixa, sendo relacionada a uma resposta inflamatória fraca nesse órgão. Contudo,

fatores relacionados à interação da *Salmonella* Gallinarum e a resposta inflamatória intestinal do hospedeiro e, conseqüentemente a lesão, são ainda pouco claros em relação à patogênese da doença (Ojima *et al.*, 2021).

Com relação à porta de entrada para infecções por *Salmonella*, além da via oral, experimentalmente, as vias intracloacal, intraocular, intratraqueal e por inalação de aerossóis já foram reproduzidas (Gast; Porter, 2020). Inclusive, a transmissão por via intratraqueal de *Salmonella* Gallinarum já foi reproduzida experimentalmente por Basnet *et al.* (2008) e demonstrou maiores taxas de morbidade e mortalidade quando comparada com a via oral. Acredita-se que estes achados estão relacionados com o tecido linfóide associado ao sistema respiratório menos desenvolvido em aves jovens quando comparado ao tecido linfóide gastrointestinal, e, também, por falhas na depuração mucociliar (Tellez *et al.*, 2014).

2.4 Sinais clínicos

Nos casos de infecções por salmonelas paratíficas, geralmente os sinais clínicos são observados em aves jovens e podem resultar em mortalidade elevada (Gast; Porter, 2020). Em aves adultas, os sinais clínicos podem ser brandos ou ausentes (Gorham *et al.*, 1991). Em poedeiras infectadas por *Salmonella* Enteritidis, sinais de anorexia, diarreia e redução na produção de ovos foram relatados (Gast; Porter, 2020).

Os principais sinais clínicos observados em aves infectadas por *Salmonella* são sonolência, apatia, penas eriçadas, desidratação e diarreia aquosa, principalmente entre a segunda e a terceira semana de vida (Gast; Porter, 2020; Shivaprasad, 2000). Nos casos de *Salmonella* Pullorum, por haver transmissão vertical, quadros de diarreia branca são comuns nos primeiros dias de vida ou morte com manifestação de sinais clínicos mínimos, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade (Gast; Porter, 2020).

2.5 Achados anatomopatológicos

Em muitos surtos de salmonelose em aves jovens, frequentemente ocorre sepse e os achados macroscópicos podem ser mínimos ou ausentes (Gast; Porter, 2020). No entanto, em muitos casos de tifo aviário e pulorose, esplenomegalia e hepatomegalia com pontos esbranquiçados distribuídos aleatoriamente pelo parênquima que caracterizam áreas de necrose são achados frequentes (Shivaprasad, 2000). Nos casos de transmissão vertical, outros achados incluem onfalite e inflamação do saco da gema com conteúdo repleto de material sanguinolento ou fibrinoso (Gast; Porter, 2020).

Em infecções por *Salmonella* Gallinarum, no coração, comumente são encontrados nódulos branco-amarelados que podem se estender do epicárdio até o miocárdio e se

caracterizam por áreas de necrose e inflamação (Shivaprasad, 2000). Embora seja um achado incomum nas infecções por SG e SP, nas infecções por salmonelas paratíficas, enterite necrótica pode ser observada e se apresenta por deposição de material caseoso ou sanguinolento na mucosa, principalmente do ceco (Gast; Porter, 2020).

Microscopicamente, em infecções agudas por SG e SP, áreas de necrose e exsudação de fibrina são achados histológicos frequentes em múltiplos órgãos (Shivaprasad, 2000). As alterações hepáticas são caracterizadas por quadros de hepatite necrosante e fibrinosa, com infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos e heterófilos (Freitas Neto *et al.*, 2007). Em casos crônicos, as lesões cardíacas são mais frequentes e são caracterizadas por necrose e perda de cardiomiócitos, associadas a infiltrado inflamatório composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos (Shivaprasad; Barrow, 2013).

Nas infecções por SG e SP, lesões histológicas entéricas são menos frequentes. Entretanto, em infecções experimentais por *Salmonella Gallinarum*, lesões entéricas foram caracterizadas por infiltrado inflamatório heterofílico na lâmina própria entre um e três dias pós-inoculação por via oral, com depleção dos folículos linfoides entre três e cinco dias pós-inoculação (Ojima *et al.*, 2021). Já em relação às lesões histológicas pulmonares, em estudos prévios encontrados na literatura elas são pouco caracterizadas e, quando presentes, são associadas à forma septicêmica com quadros de pneumonia (Basnet *et al.*, 2008).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de salmonelose requer cultivo, isolamento e identificação do agente. Além disso, informações de histórico, sinais clínicos, mortalidade e associação com as lesões macroscópicas e histológicas são fundamentais para obter o diagnóstico definitivo (Shivaprasad, 2000). Assim, devido à semelhança de sinais clínicos e lesões com casos de infecções por outras bactérias, para o diagnóstico definitivo é necessário o isolamento do agente (Gast; Porter, 2020). Outro método empregado no diagnóstico definitivo é a marcação *in situ* do agente nos tecidos, por meio da técnica de imuno-histoquímica (Gast; Porter, 2020).

Um dos métodos rotineiramente empregados para o diagnóstico é a cultura bacteriana, através da colheita de amostras como fezes, tecidos e ovos. Posteriormente, há enriquecimento em meios seletivos para salmonela, como o caldo tetrionato e o ágar verde brilhante, que promovem o crescimento de colônias sugestivas do agente, com identificação por meio de testes bioquímicos, como o *Triple Sugar Iron* (TSI), e sorológicos, por meio de teste de aglutinação com anticorpos para antígenos somáticos O e H (Shivaprasad, 2000).

Além disso, testes moleculares como a PCR são cada vez mais utilizados para detecção de DNA bacteriano em amostras, assim como a diferenciação dos biovars Pullorum e Gallinarum por meio de PCR multiplex (Batista *et al.*, 2016). Testes sorológicos como ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) são utilizados como teste de triagem para monitoramento de granjas e identificação da exposição de aves ao agente (Barrow *et al.*, 2012).

2.7 Prevenção e controle

Uma ferramenta eficaz e muito utilizada para a prevenção das salmoneloses aviárias é a vacinação (Shivaprasad, 2000). Com relação à proteção e eficiência, tanto vacinas vivas quanto vacinas inativadas são utilizadas (Barrow; Freitas Neto, 2011), pois induzem boa resposta imune humoral e celular (Gast; Porter, 2020). Um dos exemplos de sucesso para controle do tifo aviário em áreas endêmicas foi o uso da vacina viva 9R para *Salmonella* Gallinarum (Gast; Porter, 2020). Ela produz boas respostas humorais e celulares, com redução da mortalidade de aves e infecções sistêmicas mais brandas (Lee; Mo; Kang, 2007).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece as ações de monitoramento de controle de salmoneloses nas granjas comerciais, bem como nos estabelecidos de abate com registro no Serviço de Inspeção de Federal (SIF). Além disso, por meio do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) são estabelecidos critérios mínimos de biossegurança que as granjas precisam adotar para prevenir a entrada de patógenos, dentre eles, *Salmonella* spp. Para isso, é estabelecido um conjunto de normas por meio de instruções normativas, que devem ser seguidas para controle e prevenção das salmoneloses na produção avícola (MAPA, 2020).

A respeito das instruções normativas relacionadas a salmoneloses, destaca-se a Instrução Normativa (IN) 20/2016 que estabelece as medidas de controle e monitoramento de *Salmonella* spp. em estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e reprodução, bem como em estabelecimentos de abate de aves com registro no SIF, com o intuito de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer uma proteção ao consumidor. Há, também, a IN 18/2017, que estabelece os procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução, comerciais e de ensino. Por fim, a IN 41/2017 estabelece normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e livres ou controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium (MAPA, 2020).

Dentre as principais medidas de controle da doença, é fundamental a aquisição de aves e ovos de locais com certificação livre de *Salmonella*, bem como boas práticas de manejo para

evitar que aves infectadas ou reservatórios entrem em contato com as aves da granja, abate de aves em galpões com isolamento bacteriano positivo realizando o vazio sanitário e desinfecção das instalações (Shivaprasad, 2000). Ademais, manejo sanitário rigoroso, com boas práticas de biossegurança, como, por exemplo, restrição do número de pessoas externas à granja, limpeza e desinfecção dos galpões entre um lote e outro, e controle de roedores e insetos (Gast; Porter, 2020).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Realizou-se um estudo experimental de inoculação de *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum em pintinhos de corte. Como inóculo, foi utilizado um isolado de *Salmonella* Gallinarum recuperado de um surto natural de tifo aviário em pintinhos de corte com cinco dias de vida diagnosticado em janeiro de 2022, estirpe SG 02/2022 (SISGEN: AD960DA). Nas aves desse surto, foram constatadas lesões histológicas em múltiplos órgãos, incluindo intestino e pulmão, além de fígado e baço. No surto espontâneo, os principais achados macroscópicos foram áreas multifocais de hemorragia na mucosa do ceco, hiperemia e hemorragia pulmonar, hepatomegalia e esplenomegalia. Microscopicamente, as lesões foram caracterizadas como tiflite histiocitária e hemorrágica focalmente extensa moderada a acentuada e nos pulmões havia pneumonia intersticial moderada a acentuada. As lesões histológicas esplênicas e hepáticas foram as mesmas encontradas em surtos de SG, como hepatite fibrinonecrótica e histiocitária e esplenite fibrinosa.

Dessa forma, procedeu-se inicialmente com um experimento piloto para definição da dose do inóculo nas aves e avaliação da evolução da doença e da taxa de mortalidade. Nesse experimento, foram infectados 20 pintinhos de corte da linhagem Ross com um dia de vida, 10 por via oral e 10 por via intranasal, na dose de 1×10^8 UFC/mL, sendo avaliada a taxa de mortalidade no período de uma semana, com realização das necropsias e exame histopatológico. A inoculação por via oral foi realizada com auxílio de uma sonda de gavagem e a intranasal com uma pipeta de Pasteur. Durante todo o período do experimento, as aves receberam água e ração à vontade e cuidados com a ambiência, com cada grupo permanecendo alojado em uma gaiola.

Para o experimento definitivo, foram adquiridos 160 pintinhos de corte machos com um dia de vida da linhagem Ross de um incubatório comercial livre de *Salmonella*. As aves foram divididas em quatro grupos experimentais (grupos A, B, C e D) e cada grupo continha 35 aves inoculadas. Além disso, houve um grupo controle não infectado com 20 aves (grupo E). Nos

grupos A e B, a inoculação ocorreu por via oral, com 0,5 mL do inóculo nas concentrações $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (grupo A) e $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (grupo B). Nos grupos C e D, a inoculação ocorreu por via intranasal, com 30 μ l de inóculo nas concentrações de $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (grupo C) e $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (grupo D). No grupo controle, 10 aves receberam, por via oral, caldo de cultivo sem a bactéria e as outras 10 receberam, por via intranasal, 30 μ l de solução salina tamponada (PBS).

As aves foram alojadas em gaiolas no biotério de experimentação animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), e os grupos ficaram em salas separadas com controle sanitário rigoroso. Receberam ração preparada na fazenda experimental de Igarapé, água à vontade e cuidados em relação à ambiência durante todo o período do experimento. No momento da chegada das aves, as fezes nas caixas foram colhidas e realizou-se cultura bacteriana para pesquisa de *Salmonella*, para assegurar que as aves eram negativas. Após isso, no segundo dia de vida das aves, foi realizada a inoculação do agente. A inoculação por via oral ocorreu com auxílio de uma sonda de gavagem e, por via intranasal, com uma pipeta de Pasteur. Durante o procedimento, na inoculação via oral, o inóculo foi aspirado em uma seringa e acoplado à sonda. Em seguida, introduziu-se a sonda até o ingluvío e o inóculo foi ejetado. Na via intranasal, uma das narinas da ave foi obstruída com o dígito do pesquisador, e, na outra, três gotas do inóculo foram pingadas, sempre se certificando que as aves aspiraram completamente o conteúdo. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo 252/2022.

Após inoculação, os grupos foram acompanhados diariamente e os sinais clínicos anotados, como, por exemplo, diarreia, prostração, penas arrepiadas e anorexia. Diariamente, realizou-se a limpeza e desinfecção das instalações com desinfectante à base de amônia quaternária, as fezes foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos específicos e devidamente descartadas como material com risco de contaminação biológica. Durante todo o experimento, os pesquisadores que realizaram o manejo das aves do grupo controle não infectado não tiveram contato com os grupos infectados e vice-versa.

Do terceiro até o décimo segundo dia pós-inoculação, foram eutanasiadas e necropsiadas diariamente três aves de cada grupo infectado e duas aves do grupo controle. Além disso, aves que morreram naturalmente também foram necropsiadas e avaliadas, desde que o tempo entre a morte e a realização da necropsia não fosse superior a seis horas e elas fossem mantidas sob refrigeração até o momento da necropsia, com o intuito de evitar alto grau de autólise.

Nas aves vivas, a eutanásia foi realizada por deslocamento cervical, seguindo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CONCEA, 2019). Aves que apresentavam sinais clínicos mais graves foram priorizadas no momento da eutanásia e, em caso de ausência de aves doentes, a escolha dos animais para a eutanásia foi feita de forma aleatória.

3.2 Necropsia

Todas as aves foram necropsiadas no Laboratório de Doenças das Aves do DMVP da Escola de Veterinária (EV) da UFMG. Realizou-se a avaliação macroscópica dos órgãos com descrição detalhada das lesões encontradas e fotodocumentação. Em seguida, amostras de órgãos foram coletadas e fixadas em formalina tamponada a 10%, dentre elas, diferentes porções do intestino (incluindo duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon), fígado, baço, coração, pulmões, traqueia, laringe, rins, encéfalo, pâncreas, saco aéreo, testículo, adrenal, saco da gema, bolsa cloacal e medula óssea.

O escore das lesões macroscópicas foi realizado de forma subjetiva, levando em consideração o aumento do tamanho de órgãos, principalmente em casos de hepatomegalia e esplenomegalia, bem como pela distribuição das lesões como focos brancos e/ou vermelhos nos órgãos. Devido ao tempo *post mortem* prolongado, uma ave do grupo A, oito aves do grupo B e uma ave do grupo C, que morreram naturalmente, foram excluídas do experimento.

3.3 Histopatologia

Após a fixação em formalina tamponada neutra a 10% durante 48 horas, foi realizado o processamento de lâminas histológicas no laboratório de técnicas histológicas da Unidade Multidisciplinar de Pesquisa Animal (MULTILAB) da EV/UFMG. No laboratório, as lâminas foram submetidas à técnica de processamento histológico de rotina, conforme Luna (1968) que inicialmente consiste em desidratação em séries crescentes de álcool (70%, 80% e 90%), sendo duas vezes no álcool 90% e, posteriormente, três vezes no álcool absoluto.

Em seguida, os tecidos foram mergulhados em xilol por duas vezes para que ocorresse a diafanização e, em seguida, foram embebidos duas vezes em recipientes contendo parafina líquida. Posteriormente, o tecido foi emblocado, sendo colocado em pequenas formas quadradas de aço contendo parafina líquida em alta temperatura. O tecido foi mantido na forma, em temperatura ambiente, por no máximo 24 horas.

Após esse período, foi realizada a microtomia em secções de cerca de 3 a 5 µm de espessura e os cortes teciduais dispostos em lâmina de vidro com auxílio de banho-maria. Em sequência, as lâminas de vidro contendo o tecido foram colocadas em uma estufa a 50 °C por 30 minutos, sendo posteriormente submersas em dois recipientes contendo xilol, permanecendo

5 minutos em cada para que ocorresse a retirada completa de parafina. Após passagem em xilol, a lâmina foi transferida para recipientes contendo álcool absoluto, álcool 90% e álcool 80%, permanecendo 3 minutos em cada, sendo, então, realizada a hidratação com água destilada.

Por fim, iniciou-se o processo de coloração da lâmina contendo os cortes histológicos utilizando primeiramente o corante hematoxilina. As lâminas ficaram imersas no recipiente contendo esse corante por 30 segundos e, em sequência, foram lavadas em água corrente por 15 minutos. O mesmo processo de coloração foi realizado em seguida, mas nessa etapa utilizou-se o corante eosina.

Após a última lavagem com água corrente, para que ocorresse a desidratação do tecido, as lâminas foram colocadas em recipientes contendo álcool 95% (dois recipientes, com duas repetições), álcool absoluto (três recipientes, sendo assim três repetições) e xilol (dois recipientes, duas repetições). Na etapa final de processamento, retirou-se o xilol com água, realizou-se a secagem e imergiu-se as lâminas novamente no xilol. Por fim, preparou-se o meio de montagem, com lamínula e bálsamo do Canadá. Após a secagem das lâminas, essas estavam prontas para serem lidas em microscopia.

As amostras das 150 aves necropsiadas resultaram, ao final do processamento, em 1.150 lâminas de vidro que foram analisadas criteriosamente por dois patologistas em microscópio de luz comum com visualização simultânea de mais de um observador. Em todas as aves, todos os órgãos coletados durante a necropsia foram avaliados individualmente, com exceção da medula óssea. Após a leitura das lâminas e identificação das aves com lesões histológicas sistêmicas de maior distribuição e intensidade, 110 das 150 medulas ósseas coletadas foram processadas para o exame histopatológico. Algumas das medulas ósseas foram avaliadas junto com o tecido ósseo e, para isso, as amostras foram descalcificadas em solução de ácido fórmico a 18% por 48 horas.

As lesões microscópicas foram graduadas seguindo os seguintes critérios: em órgãos parenquimatosos, para até cinco campos de lesão no aumento de 400x, considerou-se como lesão discreta; entre seis e quinze campos, moderada; e, acima de quinze, como lesão acentuada. Para os órgãos tubulares, entre um e três focos de lesão ou uma área focalmente extensa, graduou-se como lesão discreta; áreas multifocais a coalescentes ou entre duas e cinco áreas focalmente extensas como moderada; e toda a circunferência ou acima de cinco áreas focalmente extensas como lesão acentuada.

3.4 Imuno-histoquímica anti-*Salmonella*

A imuno-histoquímica para identificação *in situ* do gênero *Salmonella* foi realizada no laboratório de imuno-histoquímica do MULTILAB da EV/UFMG, com um anticorpo policlonal *Salmonella* polivalente grupo D (Probac do Brasil, São Paulo, SP). A técnica foi realizada em órgãos com lesões histológicas compatíveis com o agente, principalmente no intestino, fígado, baço e pulmões, bem como em órgãos com lesões ainda não descritas na literatura como causadas pela *Salmonella Gallinarum*, tais como laringe, traqueia e medula óssea.

Em 21 aves com lesões histológicas ausentes, discretas ou com resultado bacteriológico negativo, a técnica também foi empregada. No total, a imuno-histoquímica foi realizada em 252 lâminas. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de fígado e baço das aves infectadas no experimento piloto. Para controle negativo, foram utilizadas amostras de baço e fígado das aves do grupo controle do experimento.

A diluição do anticorpo utilizada foi de 1:800. Cortes histológicos de 3 μ m dispostos em lâminas silanizadas foram desparafinados em estufa a 60 °C por 30 minutos, seguidos por dois banhos de xilol, com 15 minutos cada. Em sequência, foi realizada reidratação com dois banhos em álcool absoluto, um banho em álcool 90% e em álcool 80%, de cinco minutos cada e, por fim, em água destilada por 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com 250 mL do tampão citrato em uma panela de vapor, a 95 °C, por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram resfriadas a temperatura ambiente por 30 minutos.

Na etapa de bloqueio da peroxidase endógena, diluiu-se 0,42 mL de peróxido de hidrogênio na concentração de 37% em 5,8 mL de metanol. Em seguida, cobriu-se os cortes com a solução de peróxido a 3% por 40 minutos. Procedeu-se, então, com o bloqueio de ligações inespecíficas, diluindo 0,5 g de leite em pó desnatado em 20 mL de PBS, aquecendo em micro-ondas por 10 segundos. As lâminas foram colocadas em câmara úmida, cobrindo todo o corte com o soro bloqueio, mantendo em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada a diluição do anticorpo primário, o qual foi disposto sobre a lâmina cobrindo todo o tecido, e incubação a 4 °C por 18 horas (*overnight*).

Após essa etapa, realizou-se a incubação com anticorpo secundário com o sistema comercial EnVision® Dual Link (Leica Biosystems), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Para a revelação, foi diluído 60 μ L de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em 1 mL de substrato, cobrindo todo o tecido com a solução, deixando as lâminas na câmara úmida em temperatura ambiente por 3 minutos. Tais lâminas foram lavadas com água destilada por 10

minutos, contracoradas com hematoxilina por 15 segundos e, posteriormente, desidratadas e montadas com Entellan[®] para serem lidas em microscópio de luz comum.

3.5 Bacteriologia

Aos 3, 5, 7, 9 e 12 dias pós-inoculação (dpi), três aves de cada grupo infectado foram eutanasiadas e, imediatamente após a abertura da cavidade celomática, secções do fígado e baço foram coletadas de forma asséptica. Após a colheita, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em solução salina. A contagem de *Salmonella* nas amostras foi conduzida por meio do plaqueamento das alíquotas decimais da diluição em ágar verde brilhante (AVB) com ácido nalidíxico em uma concentração de 25 µg/mL.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e, em seguida, a contagem das colônias foi realizada, com os resultados sendo apresentados em logaritmo decimal (log UFC/g). A presença de colônias na contagem foi considerada como detecção direta de *Salmonella*. A primeira diluição de cada amostra foi adicionada em um volume igual de caldo tetracionato (dupla concentração), incubada a 37 °C por 24 horas e semeadas em ágar verde brilhante (AVB) quando o resultado da contagem foi negativo e, portanto, considerado como detecção indireta (Berchieri Júnior *et al.*, 2001). No terceiro dpi, devido ao tamanho pequeno do baço e priorizando o exame histopatológico, não houve colheita desse órgão para a bacteriologia.

3.6 Análise estatística

Os resultados são apresentados por meio de frequências absolutas e relativas para a presença de lesões nos diferentes tecidos, por meio da média e desvio-padrão para as variáveis de bacteriologia e por meio da mediana, valor mínimo e máximo para o número de segmentos do intestino e órgãos com lesão.

Para avaliar o efeito de via de infecção, dose, dia pós-inoculação e interação via e dose, um modelo de regressão logística foi ajustado para cada variável qualitativa. A estimativa do efeito das variáveis explicativas, a razão de chance e o seu intervalo de confiança de 95% foram descritos. As contagens bacterianas foram transformadas em logaritmos e foi realizada a análise de variância considerando as mesmas variáveis explicativas. A comparação das vias e doses para o número de segmentos de intestino e órgãos afetados foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. O nível de significância considerado em todas as análises foi de 5%. Todas as avaliações foram realizadas por meio do software R 4.3.1 (R Core Team, 2023).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento piloto

Nos grupos inoculados com SG por via oral (VO) e via intranasal (VI), as aves apresentaram, a partir do 4º dpi, sinais clínicos de letargia, sonolência, penas eriçadas e fezes hemorrágicas. No 7º dpi, 100% das aves do grupo de inoculação por VO morreram naturalmente pela infecção e, no grupo de inoculação por VI, morreram 80% das aves.

Macroscopicamente, as lesões encontradas em ambos os grupos estavam concentradas principalmente em órgãos como fígado, baço, intestino, pulmão e coração. No fígado, foi visualizada hepatomegalia em diferentes intensidades, por vezes com pontos esbranquiçados ou hemorragia na forma de petéquias. Essas lesões estavam presentes em seis (6/10) aves do grupo VO e em nove (9/10) do grupo VI.

No baço, havia esplenomegalia, com pontos esbranquiçados e/ou hemorragia no parênquima e superfície subcapsular. Essa alteração estava presente em três (3/10) aves do grupo VO e em cinco (5/10) do grupo VI.

As lesões entéricas foram visualizadas principalmente nos segmentos do íleo e ceco, caracterizadas por múltiplas petéquias na mucosa, além de conteúdo hemorrágico. Áreas esbranquiçadas e irregulares foram visualizadas na camada muscular e serosa de algumas aves do grupo VO. No total, as lesões macroscópicas ocorreram em nove (9/10) aves do grupo VO e em três (3/10) do grupo VI.

As lesões pulmonares foram caracterizadas por hiperemia difusa do parênquima, com áreas multifocais de hemorragia e hipocrepitação. Essas lesões foram encontradas em três (3/10) aves do grupo VO e em cinco (5/10) aves do grupo VI.

No coração de quatro aves, duas em cada grupo, nódulos branco-amarelados foram observados na superfície do epicárdio, com extensão para o miocárdio. Adicionalmente, em uma ave do grupo de inoculação por VO foram encontrados pontos amarelados multifocais na bolsa cloacal.

Microscopicamente, os principais achados foram hepatite, esplenite, miocardite, enterite, pneumonia e bursite, semelhante em ambos os grupos das vias intranasal e oral. A hepatite foi encontrada em seis (6/10) aves do grupo VO e em todas as aves do grupo VI e era microscopicamente caracterizada por áreas de necrose de hepatócitos, exsudação de fibrina e infiltrado de macrófagos, por vezes com microtrombos. Esplenite histiocitária e/ou fibrinosa foi visualizada em sete (7/10) aves do grupo VO e em nove (9/10) do grupo VI.

Enterite foi encontrada em oito (8/10) aves do grupo VO e em sete (7/10) do grupo VI. As lesões eram concentradas no íleo e no ceco e raramente em algumas porções do cólon. Essas lesões foram caracterizadas por hemorragia acentuada na lâmina própria e infiltrado inflamatório histiocitário, que por vezes se estendia até a camada muscular e serosa.

Quadros de pneumonia estavam presentes em sete (7/10) aves do grupo VO e em todas (10/10) do grupo VI. As lesões pulmonares foram caracterizadas por pneumonia intersticial em diferentes intensidades. Houve predominância de infiltrado de macrófagos e formação de alguns microtrombos em vasos de pequeno e médio calibre.

Bursite foi encontrada em seis (6/10) aves do grupo de inoculação VO e em quatro (4/10) do grupo inoculado por VI. As lesões na bolsa cloacal foram caracterizadas por áreas focalmente extensas de necrose nos folículos linfoides, com infiltrado de macrófagos, por vezes com hemorragia e rarefação linfoide.

Miocardite foi visualizada em seis (6/10) aves do grupo VO e em sete (7/10) do VI. As lesões eram caracterizadas por perda e necrose de cardiomiócitos com infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos. Além disso, em uma (1/10) ave do grupo VO e em três (3/10) da VI, havia alterações no saco da gema caracterizado por saculite necrótica e histiocitária. Em uma (1/10) ave do grupo VO havia laringite histiocitária e necrótica.

4.2 Experimento definitivo

4.2.1 Achados clínicos

As aves não apresentaram sinais clínicos no 1º e 2º dpi. No 3º dpi, cinco aves do grupo D ficaram letárgicas. No 4º e 5º dpi, houve casos de morte repentina em todos os grupos. No grupo B, foram visualizadas fezes hemorrágicas no chão da gaiola e algumas aves estavam apáticas. Havia ainda aves letárgicas nos grupos C e D. No 6º dpi, houve morte repentina nos grupos A, C e D. Em todos os grupos havia aves letárgicas e algumas com penas eriçadas. No 7º, 8º, 9º e 10º dpi, havia aves letárgicas nos grupos C e D. No 11º e 12º dpi, as aves remanescentes do grupo A e D não apresentavam sinais clínicos. Nas aves do grupo controle não houve alterações clínicas durante o período do experimento.

Com relação à taxa de mortalidade, no grupo A houve a morte de uma ave no 4º dpi, duas no 5º dpi e duas no 6º dpi, totalizando cinco mortes que corresponderam à taxa de mortalidade de 14,3% para esse grupo. No grupo B, morreram 15 aves no 4º dpi e sete no 5º dpi, totalizando 22 mortes que corresponderam à taxa de mortalidade de 62,85% para o grupo. No grupo C, houve a morte de uma ave no 4º dpi, cinco no 5º dpi e 6º dpi e quatro no 7º dpi, totalizando 15 mortes que corresponderam a 42,85% de mortalidade. No grupo D, duas aves

morreram no 4º dpi, quatro no 5º dpi e uma no 6º, 7º e 8º dpi, totalizando nove mortes com uma taxa de mortalidade de 25,7% para o grupo. Dessa forma, a taxa de mortalidade foi maior em ambos os grupos de aves inoculadas por via intranasal.

4.2.2 Macroscopia

De modo geral, as lesões foram caracterizadas por fígado aumentado, com pontos esbranquiçados ou hemorragia no parênquima ou estavam difusamente esverdeados a amarronzados (Figuras 1A, 1B e 1C). Em outros órgãos, como no baço, havia esplenomegalia com áreas multifocais de hemorragia na superfície capsular (Figura 1D). Os pulmões estavam difusamente hiperêmicos e hipocrepitantes, por vezes com áreas multifocais de hemorragia (Figuras 2A, 2B e 2C). Nos rins, havia quadros de hemorragia em diferentes intensidades (Figura 2D). No coração, havia áreas multifocais esbranquiçadas, irregulares e nodulares na superfície do epicárdio que se estendiam para o miocárdio (Figura 3A). Por fim, no intestino, principalmente em segmentos do íleo e ceco, havia áreas multifocais com petéquias na mucosa, por vezes com conteúdo alaranjado ou hemorrágico e áreas multifocais esbranquiçadas e espessadas que se estendiam da mucosa até a serosa (transmural) (Figuras 3B, 3C e 3D). Os resultados com os principais achados macroscópicos e as frequências nos diferentes dpi e grupos estão reunidos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Frequência dos achados macroscópicos nos grupos A e B de aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral

Lesão	Grupo A											Grupo B				
	dpi										Total	dpi				Total
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		3	4	5	6	
Hepatite	0/3	2/3	3/5	3/5	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	10/34	0/3	10/10	8/10	2/4	20/27
Esplenite	0/3	0/3	3/5	3/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	6/34	2/3	8/10	8/10	3/4	21/27
Pneumonia	0/3	0/3	2/5	3/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	5/34	0/3	2/10	6/10	0/4	8/27
Enterite	0/3	0/3	0/5	2/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/34	0/3	0/10	4/10	0/4	4/27
Miocardite	0/3	0/3	0/5	0/5	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/34	0/3	0/10	0/10	0/4	0/27
Saculite*	1/3	0/3	1/5	0/5	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	4/34	0/3	0/10	0/10	0/4	0/27

A: inoculação via oral 10⁵ UFC/mL
dpi = dia(s) pós-inoculação

B: inoculação via oral 10⁸ UFC/mL
*Inflamação do saco da gema

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Frequência dos achados macroscópicos nos grupos C e D de aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal

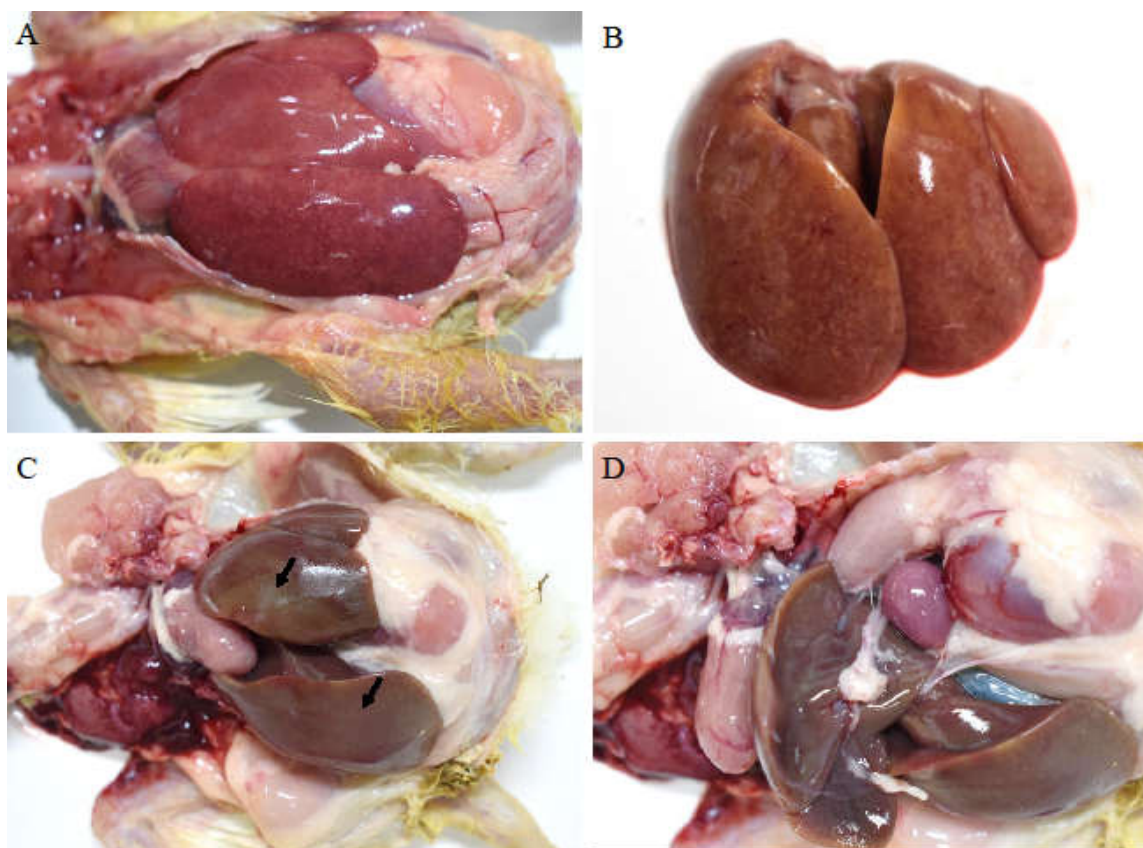
Lesão	Grupo C								Total	Grupo D											Total
	dpi									dpi											
	3	4	5	6	7	8	9	3		4	5	6	7	8	9	10	11				
Hepatite	0/3	1/3	6/8	7/8	6/7	2/2	3/3	25/34	1/3	4/5	5/7	4/4	4/4	3/4	2/3	2/3	2/2	27/35			
Esplenite	0/3	1/3	6/8	7/8	3/7	2/2	0/3	19/34	2/3	5/5	4/7	2/4	2/4	4/4	1/3	2/3	2/2	24/35			
Pneumonia	0/3	1/3	3/8	3/8	3/7	0/2	1/3	11/34	0/3	0/5	4/7	2/4	1/4	2/4	1/3	3/3	1/2	14/35			
Enterite	0/3	0/3	0/8	2/8	2/7	0/2	0/3	4/34	0/3	0/5	0/7	0/4	1/4	0/4	0/3	2/3	0/2	3/35			
Miocardite	0/3	0/3	0/8	0/8	4/7	1/2	0/3	5/34	0/3	0/5	1/7	0/4	3/4	3/4	2/3	3/3	2/2	14/35			
Saculite*	0/3	0/3	1/8	0/8	1/7	0/2	0/3	2/34	0/3	0/5	0/7	1/4	1/4	2/4	0/3	0/3	0/2	4/35			

C: inoculação via intranasal 10^5 UFC/mL
dpi = dia(s) pós-inoculação

D: inoculação via intranasal 10^8 UFC/mL
*Inflamação do saco da gema

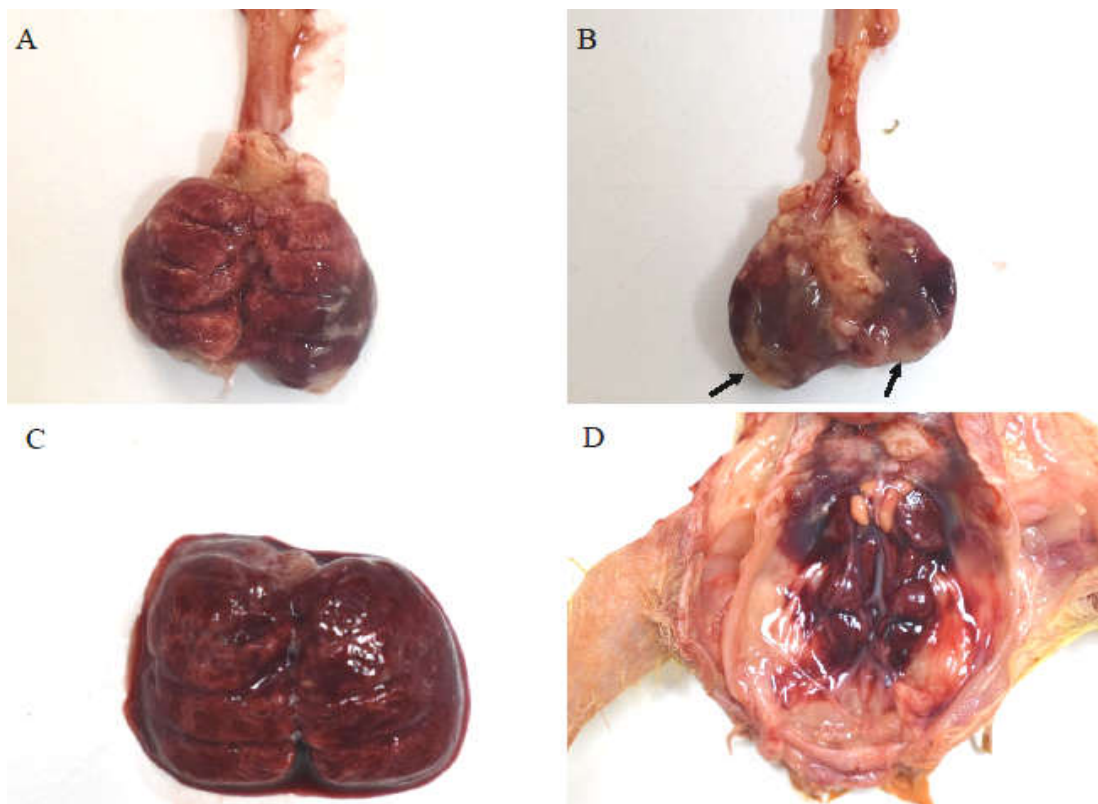
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1 – Imagens macroscópicas das lesões no fígado no 4º, 5º e 11º dpi e baço no 11º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e intranasal



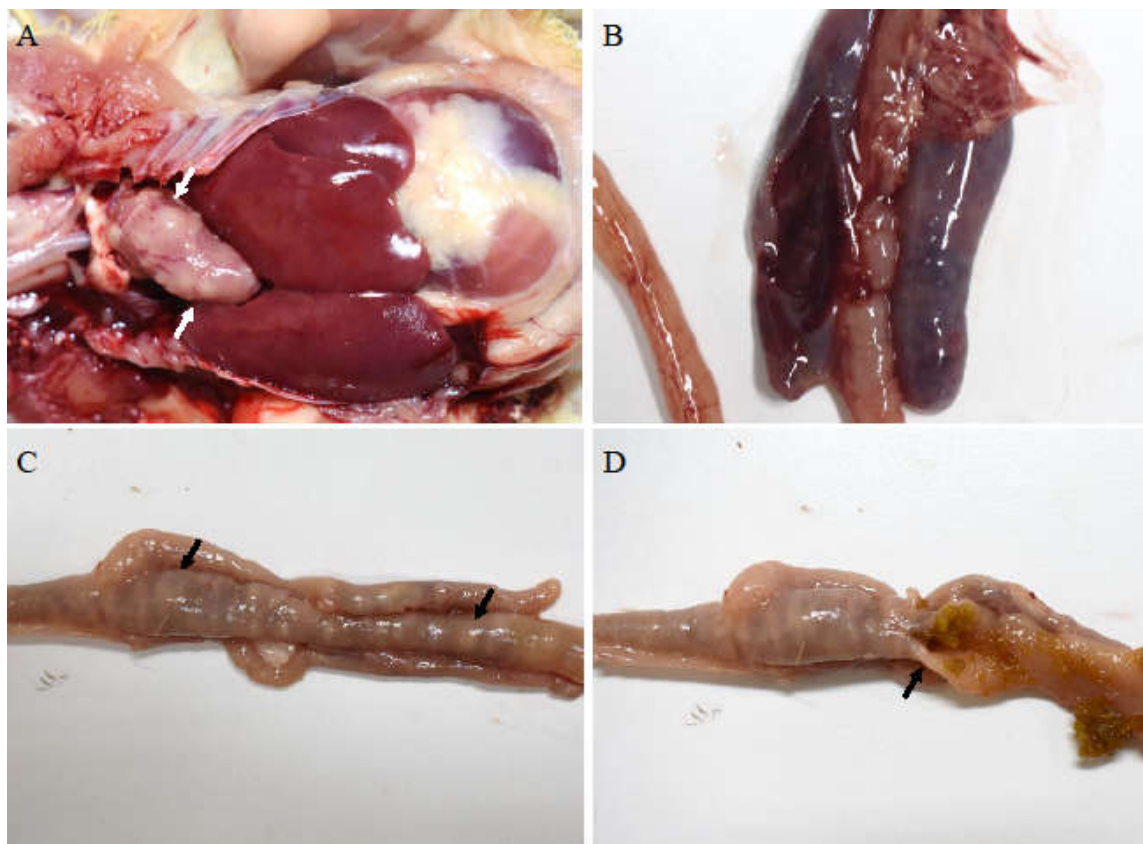
A: Fígado: ave infectada por via oral na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL no 5º dpi, com hepatomegalia e múltiplos pontos esbranquiçados na superfície subcapsular. **B:** Fígado: ave infectada por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL no 4º dpi, com hepatomegalia e múltiplos pontos esbranquiçados entremeados por múltiplas petéquias. **C:** Fígado: ave infectada por via intranasal na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL no 11º dpi com hepatomegalia e áreas focalmente extensas esverdeadas (setas). **D:** Baço: mesma ave da imagem anterior com esplenomegalia. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – Imagens macroscópicas das lesões nos pulmões no 4° e 5° dpi e rins no 5° dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral



A: Pulmão: ave infectada por via oral na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL no 5° dpi, vista dorsal de ambos os lobos com áreas focalmente extensas vermelho-escuras e não colapsados. **B:** Pulmão: vista ventral do pulmão da ave anterior com espessamento e irregularidade da pleura (setas). **C:** Pulmão: ave infectada por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL no 4° dpi que morreu naturalmente, com lobos difusamente brilhantes, vermelho-escuros e não colapsados. **D:** Rim: ave infectada por via oral na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL no 4° dpi com hemorragia renal difusa. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Imagens macroscópicas das lesões no coração no 11º dpi e no intestino no 5º e 10º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e intranasal



A: Coração: ave infectada por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL no 11º dpi, com múltiplos nódulos esbranquiçados na superfície do epicárdio (setas). **B:** Ceco: ave infectada por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL no 5º dpi, mucosa do ceco com hemorragia difusa e intensa. **C:** Íleo e ceco: ave infectada por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL no 10º dpi, camadas serosa e muscular com múltiplas áreas milimétricas circulares levemente elevadas e estrias esbranquiçadas (setas). **D:** Íleo e ceco: imagem da ave anterior, evidenciando espessamento moderado da parede intestinal do íleo e múltiplos pontos brancos (seta). Fonte: Elaborado pelo autor.

No grupo A, houve dez (10/34) casos de hepatite (cinco foram discretos, quatro foram moderados e um foi intenso); seis (6/34) casos de esplenite (um foi discreto e cinco foram moderados); e cinco (5/34) casos de pneumonia (dois foram discretos e três foram moderados) e, nessas aves, os pulmões estavam difusamente hiperêmicos e hipocrepitantes, por vezes com áreas multifocais de hemorragia. Um dos pulmões estava com consolidação difusa (afundou completamente na solução fixadora de formol).

Ainda para o grupo A, foram visualizados dois (2/34) casos de miocardite, classificados como discretos. Em ambos havia áreas multifocais esbranquiçadas e irregulares no coração (epicárdio e miocárdio). Em duas aves (2/34) com enterite as lesões encontradas foram classificadas como intensas, sendo visualizadas no jejuno e íleo como áreas segmentares esbranquiçadas com espessamento da camada muscular e serosa.

Também no grupo A houve quatro (4/34) casos de saculite, isto é, inflamação do saco da gema (um discreto e três intensos). Nestes casos, o saco da gema não estava envolvido e apresentava conteúdo caseoso amarelo ou liquefeito e hemorrágico. Houve outros achados nas aves desse grupo, tais como hidropericárdio em diferentes intensidades e hemorragia no parênquima renal.

No grupo B, houve 20 (20/27) casos de hepatite (três foram classificados como discretos, sete como moderados e dez como intensos) e, macroscopicamente, as lesões eram semelhantes aos achados gerais descritos acima.

Nas 21 (21/27) aves com esplenite (em oito aves foi discreta, em sete foi moderada e em seis foi intensa) do grupo B, não houve diferença na apresentação macroscópica quando comparada aos demais grupos.

Também foram identificados quatro (4/27) casos de enterite (dois moderados e dois intensos) no grupo B. Macroscopicamente havia, em segmentos do jejuno, íleo, ceco e cólon, áreas multifocais com petéquias na mucosa, por vezes com conteúdo alaranjado ou hemorrágico e áreas multifocais esbranquiçadas e espessadas que se estendiam da mucosa até a serosa.

A macroscopia de oito aves (8/27), cujas lesões pulmonares foram caracterizadas como pneumonia (dois discretos, um moderado e cinco intensos), do grupo B foi semelhante à do grupo A e dois deles estavam difusamente consolidados (afundaram completamente na solução fixadora de formol). Outros achados para esse grupo incluíram hidropericárdio em diferentes intensidades, hemorragia renal e pulmonar.

No grupo C, houve 25 (25/34) casos de hepatite (onze foram discretos, oito foram moderados e seis foram intensos). Macroscopicamente, havia hepatomegalia similar aos grupos anteriores e, adicionalmente, quatro fígados estavam difusamente esverdeados.

Dezenove (19/34) aves foram diagnosticadas com esplenite (em três foi discreta, em onze moderada e em cinco intensa). As alterações macroscópicas encontradas eram semelhantes aos demais grupos.

Nos quatro (4/34) casos de enterite (um discreto, um moderado e dois intensos), as lesões foram encontradas em regiões segmentares do jejuno, íleo e ceco. Elas eram semelhantes às alterações do grupo B.

Nos 11 (11/34) casos com lesões de pneumonia (quatro tiveram lesões discretas, quatro moderadas e três intensas), dois pulmões afundaram quando colocados no formol. Em cinco aves (5/34) com miocardite, as lesões foram classificadas como discretas, macroscopicamente sendo caracterizadas por áreas multifocais esbranquiçadas, irregulares e milimétricas no miocárdio e epicárdio.

Nas duas aves (2/34) com inflamação do saco da gema, a lesão foi classificada como intensa. Macroscopicamente, as lesões eram caracterizadas por não involução do saco da gema e conteúdo repleto de material liquefeito e hemorrágico. Outros achados macroscópicos nesse grupo incluíram hidropericárdio em diferentes intensidades, hemorragia renal e pulmonar.

No grupo D, houve 27 (27/35) aves com hepatite (em nove foi discreta, em onze foi moderada e em sete foi intensa). Macroscopicamente, havia hepatomegalia similar aos grupos anteriores e, adicionalmente, em sete aves os fígados estavam com áreas difusas ou focalmente extensas esverdeadas.

Houve ainda 24 (24/35) aves com esplenite (em sete foi discreta, em quatorze foi moderada e em três foi intensa) e três (3/35) com enterite, sendo as três identificadas macroscopicamente e classificadas como intensas, pois os segmentos acometidos eram áreas focalmente extensas do jejuno, íleo e ceco, com achados semelhantes aos das aves do grupo B.

Dos 14 (14/35) casos de pneumonia (quatro discretos, quatro moderados e seis intensos), macroscopicamente as lesões eram semelhantes aos achados dos demais grupos. Além disso, nas três aves do 10º dpi, havia, também, na superfície pleural e no parênquima pulmonar, pontos multifocais esbranquiçados e milimétricos. Outros três pulmões estavam difusamente consolidados (afundaram completamente na solução fixadora de formol).

Nos 14 (14/35) casos de miocardite (cinco foram discretos, cinco foram moderados e quatro foram intensos), os achados encontrados eram semelhantes aos dos demais grupos. Adicionalmente, havia também, na superfície do epicárdico de duas aves do 10º dpi, áreas multifocais a coalescente nodulares, esbranquiçadas e de até 0,5 cm de diâmetro que aprofundavam ao corte.

A inflamação do saco da gema foi classificada como caseosa e intensa em quatro (4/35) aves. Outros achados macroscópicos nesse grupo incluíram hidropericárdio em diferentes intensidades, hemorragia renal e pulmonar.

Em nenhuma das aves do grupo controle ocorreram lesões macroscópicas relacionadas a infecção por *Salmonella*.

4.2.3 Histopatologia

Os resultados com os principais achados microscópicos e as frequências das lesões nos pintinhos em diferentes dpi e grupos estão reunidos nas tabelas 3 e 4 a seguir.

Tabela 3 – Frequência dos achados microscópicos e imuno-histoquímicos nos grupos A e B de aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral

Lesão	Classificação histológica	Grupo A											Grupo B						
		dpi										Total	IHQ	dpi				Total	IHQ
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			3	4	5	6		
Hepatite	Fibrinonecrótica	1/3	1/3	4/5	3/5	3/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	13/34	1/3	2/3	10/10	10/10	4/4	26/27	1/1
Esplenite	Fibrinonecrótica	0/3	1/3	4/5	3/5	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	10/34	1/11	1/3	10/10	10/10	3/4	24/27	7/8
Pneumonia Intersticial	Histiocitária	0/3	0/3	2/5	4/5	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3	21/34	8/13	0/3	2/10	8/10	4/4	14/27	6/7
Miocardite	Necrótica/histiocitária	0/3	0/3	0/5	2/5	3/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	7/34	1/6	0/3	0/10	8/10	4/4	12/27	6/7
Duodenite	-	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	0/1	0/3	0/10	0/10	0/4	0/27	1/2
Jejunite	Transmural	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	0/1	0/3	0/10	0/10	0/4	0/27	0/2
	Não transmural	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34		1/3	2/10	0/10	0/4	3/27	
Ileíte	Transmural	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	0/4	0/3	3/10	0/10	0/4	3/27	5/7
	Não transmural	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34		2/3	4/10	0/10	0/4	6/27	
Tiflíte	Transmural	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	0/4	1/3	5/10	3/10	0/4	9/27	7/7
	Não transmural	0/3	0/3	0/5	0/5	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/34		1/3	4/10	3/10	2/4	10/27	
Colite	Transmural	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	1/11	1/3	0/10	0/10	0/4	1/27	5/8
	Não transmural	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34		0/3	4/10	1/10	0/4	5/27	
Renal	Nefrite intersticial	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34		0/3	0/10	0/10	1/4	1/27	
	Trombose glomerular	0/3	0/3	2/5	2/5	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	5/34	1/6	0/3	4/10	5/10	4/4	13/27	6/7
	Glomerulonefrite	0/3	0/3	0/5	0/5	1/3	0/3	1/3	3/3	2/3	2/3	9/34		0/3	0/10	0/10	1/4	1/27	
Mielite	Fibrinosa/histiocitária	NA	0/1	3/4	0/3	0/3	0/1	0/2	0/2	0/2	0/2	3/20	2/3	2/3	4/6	1/7	2/4	9/17	5/7
Laringite	Histiocitária	0/3	0/3	0/4**	0/5	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/33	0/13	1/3	1/9**	2/10	0/4	4/26	3/7
Traqueíte	Histiocitária	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	0/13	1/3	0/10	0/9**	0/4	1/26	1/7
Saculite*	Necrótica/ histiocitária	1/3	0/3	2/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3	6/34	1/1	0/3	1/10	2/10	3/4	6/27	1/2
Bursite	Necrótica/histiocitária	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	1/11	1/3	2/9**	3/10	2/4	8/26	5/8
Encefalite	Necrótica/histiocitária	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	NA	0/3	0/10	0/10	0/4	0/27	0/2
Adrenalite	Histiocitária	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	1/6	0/3	0/10	0/10	0/4	0/27	0/7
Aerossaculite	Linfo-histiocitária	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	NA	0/3	0/10	0/10	0/4	0/27	NA
Pancreatite	-	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	0/1	0/3	0/10	0/10	0/4	0/27	0/2
Orquite	-	0/3	0/3	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34	0/6	0/3	0/10	0/10	0/4	0/27	2/7

A: inoculação via oral 10⁵ UFC/mL

IHQ = imuno-histoquímica

B: inoculação via oral 10⁸ UFC/mL

*Inflamação do saco da gema

dpi = dia(s) pós-inoculação

**Um órgão não avaliado no grupo

NA = não avaliado

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Frequência dos achados microscópicos e imuno-histoquímicos nos grupos C e D de aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal

Lesão	Classificação histológica	Grupo C									Grupo D												
		dpi								Total	IHQ	dpi										Total	IHQ
		3	4	5	6	7	8	9	3			4	5	6	7	8	9	10	11				
Hepatite	Fibrinonecrótica	0/3	2/3	7/8	8/8	7/7	2/2	2/3	28/34	4/4	3/3	5/5	7/7	4/4	4/4	4/4	3/3	3/3	2/2	35/35	6/6		
Esplenite	Fibrinonecrótica	0/3	1/3	8/8	8/8	5/7	2/2	3/3	27/34	5/8	0/3	5/5	5/7	4/4	3/4	2/4	3/3	3/3	0/2	25/35	5/9		
Pneumonia Intersticial	Histiocitária	1/3	0/3	8/8	8/8	7/7	2/2	3/3	29/34	9/11	0/3	5/5	7/7	4/4	4/4	4/4	3/3	3/3	2/2	32/35	16/16		
Miocardite	Necrótica/histiocitária	0/3	0/3	7/8	8/8	6/7	2/2	2/3	25/34	9/9	0/3	1/5	7/7	4/4	4/4	3/3**	3/3	3/3	2/2	27/34	15/18		
Duodenite	-	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34	0/2	0/3	0/5	0/7	0/4	0/4	0/4	0/3	0/3	0/2	0/35	6/13		
Jejunite	Transmural	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34	0/2	0/3	0/5	0/7	2/4	0/4	0/4	0/3	0/3	0/2	2/35	5/13		
	Não transmural	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34		0/3	0/5	0/7	0/4	0/4	0/4	0/3	0/3	0/2	0/35			
Ileíte	Transmural	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34	3/5	0/3	0/5	0/7	1/4	1/4	2/4	2/3	2/3	0/2	8/35	15/17		
	Não transmural	0/3	0/3	0/8	0/8	1/7	0/2	0/3	1/34		2/3	3/5	2/7	2/4	1/4	1/4	1/3	1/3	1/2	14/35			
Tiflite	Transmural	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34	4/5	0/3	0/5	0/7	1/4	1/4	0/4	2/3	2/3	0/2	6/35	17/17		
	Não transmural	0/3	0/3	0/8	4/8	4/7	1/2	3/3	12/34		3/3	3/5	3/7	3/4	3/4	4/4	1/3	1/3	2/2	23/35			
Colite	Transmural	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34	1/8	0/3	0/5	0/7	0/4	0/4	0/4	2/3	1/3	1/2	4/35	8/9		
	Não transmural	0/3	0/3	0/8	0/8	1/7	0/2	1/3	2/34		0/3	1/5	0/7	0/4	1/4	1/4	0/3	1/3	0/2	4/35			
Renal	Nefrite intersticial	0/3	0/3	0/8	4/8	1/7	1/2	0/3	6/34		0/3	0/5	0/7	2/4	0/4	3/4	2/3	1/3	2/2	10/35			
	Trombose glomerular	0/3	1/3	8/8	5/8	5/7	0/2	1/3	20/34		0/3	2/5	5/7	2/4	2/4	1/4	0/3	0/3	0/2	12/35	12/19		
	Glomerulonefrite	0/3	0/3	0/8	5/8	2/7	0/2	2/3	9/34	7/9	0/3	0/5	0/7	1/4	2/4	2/4	1/3	1/3	2/2	9/35			
Mielite	Fibrinosa/histiocitária	0/2	0/1	1/7	0/7	1/7	2/2	3/3	7/29	8/10	2/2	2/3	5/6	4/4	3/4	4/4	3/3	3/3	1/2	27/31	19/22		
Laringite	Histiocitária	1/3	0/3	1/8	0/8	1/7	0/2	0/3	3/34	0/11	0/3	1/5	2/7	3/4	2/4	4/4	3/3	3/3	1/2	19/35	13/16		
Traqueíte	Histiocitária	0/3	0/3	1/8	0/8	0/7	0/2	0/3	1/34	1/11	0/3	0/5	0/7	0/4	1/4	2/4	0/3	0/3	1/2	4/35	3/16		
Saculite*	Necrótica/histiocitária	0/2	0/1	0/7	1/7	4/7	2/2	1/3	8/34	2/2	0/3	0/5	5/7	3/4	4/4	4/4	3/3	2/3	1/2	22/35	12/13		
Bursite	Necrótica/histiocitária	0/3	0/3	1/8	2/8	2/6**	0/2	0/3	5/33	2/8	0/3	0/5	0/7	2/4	1/4	1/3**	1/3	1/3	1/2	7/34	5/8		
Encefalite	Necrótica/histiocitária	0/3	0/3	0/8	0/8	1/7	0/2	0/3	1/34	1/3	0/3	0/5	0/7	0/4	1/4	1/4	0/3	0/3	0/2	2/35	1/1		
Adrenalite	Histiocitária	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34	0/9	0/3	0/5	0/7	1/4	0/4	1/4	0/3	0/3	0/2	2/35	2/18		
Aerossaculite	Linfocitocitária	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34	NA	0/3	0/5	0/7	0/4	0/4	2/4	0/3	0/3	0/2	2/35	3/3		
Pancreatite	-	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34	0/2	0/3	0/5	0/7	0/4	0/4	0/4	0/3	0/3	0/2	0/35	2/13		
Orquite	-	0/3	0/3	0/8	0/8	0/7	0/2	0/3	0/34	0/9	0/3	0/5	0/7	0/4	0/4	0/4	0/3	0/3	0/2	0/35	2/18		

C: inoculação via intranasal 10⁵ UFC/mL

D: inoculação via intranasal 10⁸ UFC/mL

dpi = dia(s) pós-inoculação

NA = não avaliado

IHQ = imuno-histoquímica

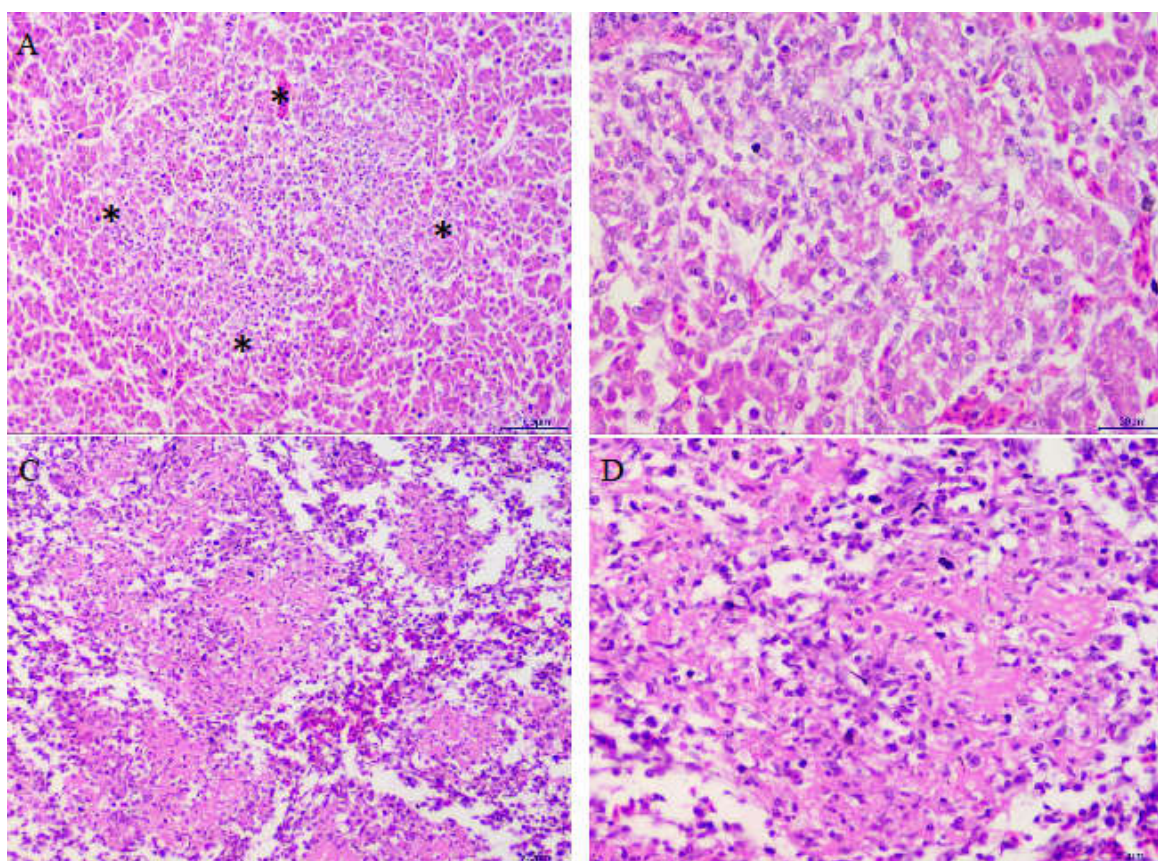
*Inflamação do saco da gema

**Um órgão não avaliado no grupo

Fonte: Elaborado pelo autor.

No grupo A, nas aves com hepatite, as alterações no parênquima eram caracterizadas por áreas multifocais de necrose e exsudação de fibrina, por vezes com infiltrado de macrófagos e formação de microtrombos (Figuras 4A e 4B). Nas aves com esplenite, havia exsudação de fibrina na área elipsoide (Figuras 4C e 4D). Hiperplasia de células reticulares no baço de algumas aves sem processo inflamatório foi também visualizada.

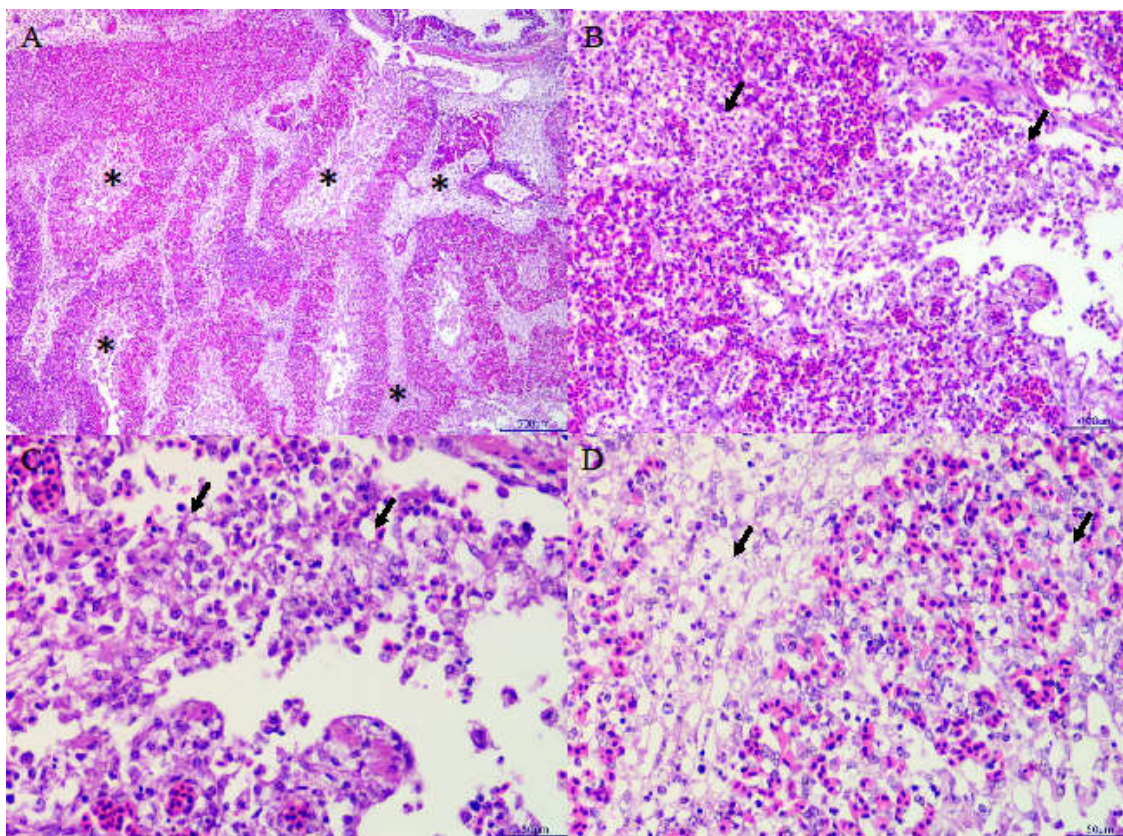
Figura 4 – Imagens microscópicas das lesões no fígado no 7º dpi e no baço no 6º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo A)



A: Fígado: parênquima com área focalmente extensa de perda de hepatócitos e infiltrado inflamatório (asteriscos), Hematoxilina e Eosina (HE), objetiva 20x. **B:** Fígado: imagem anterior aproximada evidenciando o infiltrado de macrófagos no parênquima hepático, HE, objetiva 40x. **C:** Baço: área elipsoide com deposição intensa de material fibrilar e eosinofílico (fibrina), HE, objetiva 20x. **D:** Baço: imagem anterior aproximada evidenciando a fibrina na área elipsoide, HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos casos de pneumonia, as alterações eram caracterizadas por infiltrado de macrófagos no interstício, principalmente nos capilares aéreos, entre os lóbulos e na região subpleural. Apenas em uma ave eutanasiada no 5º dpi havia extensão do infiltrado inflamatório para o interior dos brônquios e parabrônquios (Figuras 5A, 5B, 5C e 5D).

Figura 5 – Imagens microscópicas das lesões nos pulmões no 5º dpi de ave inoculada com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo A)



A: Pulmão: interior de parabrônquios, interstício e septos interlobulares com aumento difuso da celularidade (asteriscos), HE, objetiva 4x. **B:** Pulmão: interior de parabrônquio e interstício com infiltrado inflamatório intenso (setas), HE, objetiva 20x. **C:** Pulmão: imagem anterior aproximada evidenciando no interior dos parabrônquios infiltrado de macrófagos (setas), HE, objetiva 40x. **D:** Pulmão: região de septo interlobular e interstício com infiltrado de macrófagos (setas), HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas aves com miocardite, as lesões foram caracterizadas por áreas multifocais de infiltrado de macrófagos e alguns linfócitos entre os cardiomiócitos. Nos casos de tiflites não transmural, havia áreas multifocais de infiltrado de macrófagos na lâmina própria.

Com relação às lesões renais, havia nos glomérulos aumento da celularidade do mesângio, frequentemente associada a espessamento da membrana basal, caracterizando um quadro de glomerulonefrite membrano-proliferativa e, em outros casos, presença de trombos no interior dos capilares glomerulares. Nos rins de algumas aves havia também quadros de hemorragia intersticial.

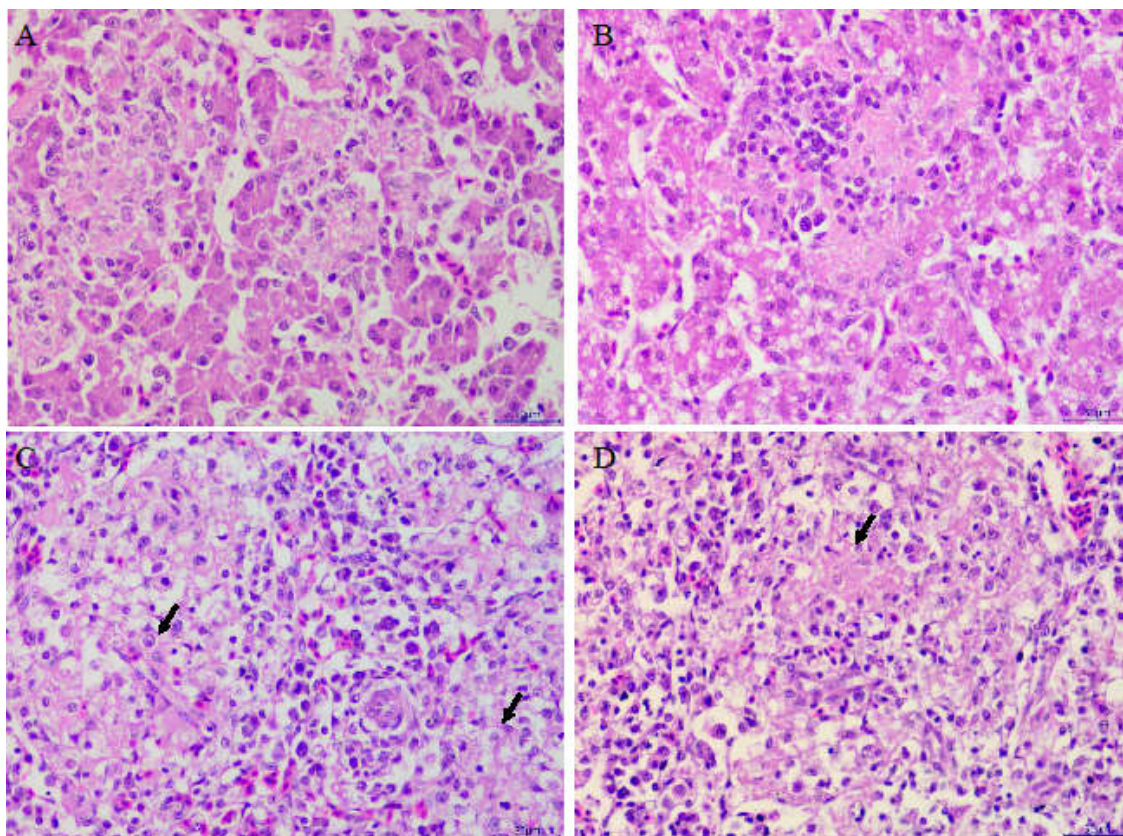
Os casos de lesão na medula óssea foram caracterizados por áreas multifocais de infiltrado de macrófagos e exsudação de fibrina na medula óssea, com compressão e substituição do tecido normal (mieloptise).

Nos casos de saculite (inflamação do saco da gema), as lesões foram caracterizadas por necrose e perda do epitélio de revestimento e deposição de material necrótico no lúmen do saco da gema, com infiltrado de macrófagos, alguns heterófilos e, associado ao processo, havia agregados bacterianos de bastonetes intralesionais.

O único caso de laringite encontrado nesse grupo foi discreto e caracterizado por infiltrado de macrófagos em áreas multifocais da lâmina própria.

Para o grupo B, nos casos de hepatite, microscopicamente as lesões eram semelhantes aos achados do grupo A. Adicionalmente, havia também, em alguns fígados, hiperplasia do tecido linfoide associado ao espaço porta (Figuras 6A e 6B). Nas aves com esplenite, as lesões eram caracterizadas por esplenite fibrinosa e/ou histiocitária, por vezes com hiperplasia de células reticulares (Figuras 6C e 6D).

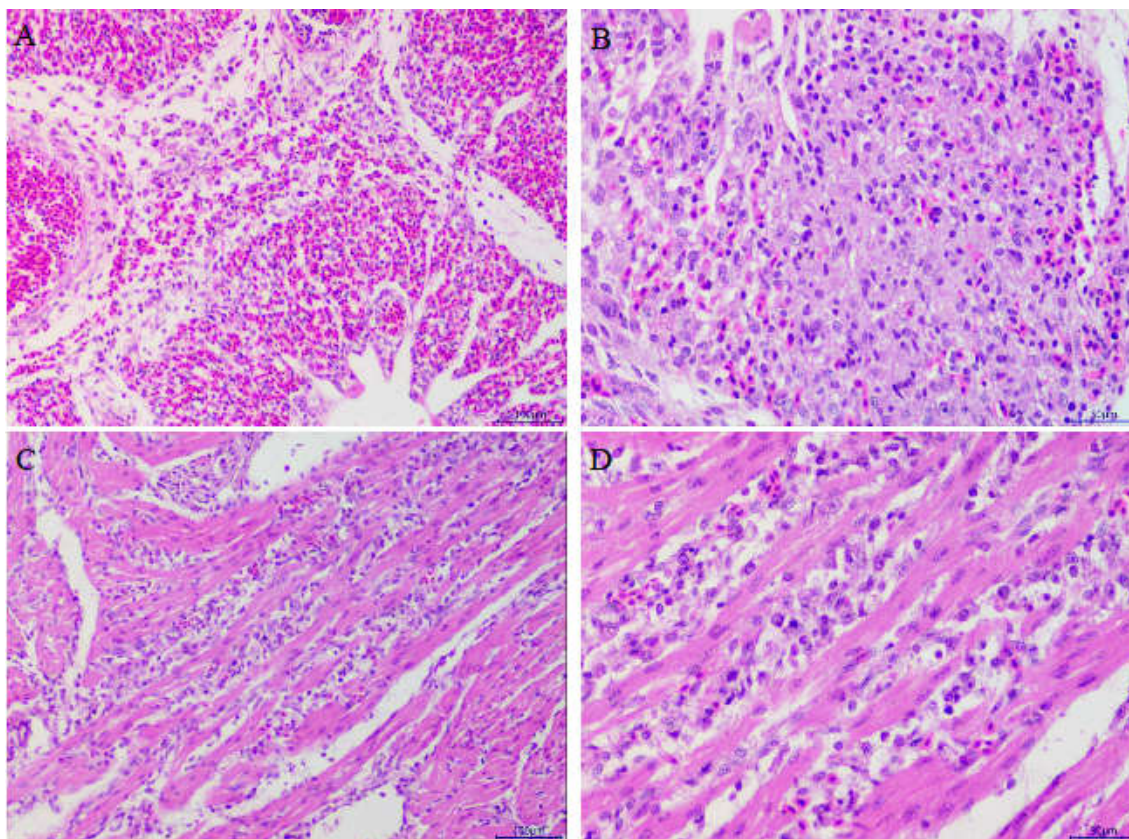
Figura 6 – Imagens microscópicas das lesões no fígado e no baço no 5º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)



A: Fígado: parênquima com áreas multifocais de necrose e infiltrado de macrófagos, HE, objetiva 40x. **B:** Fígado: parênquima com área focal de necrose com infiltrado inflamatório composto por linfócitos, macrófagos e plasmócitos, HE, objetiva 40x. **C:** Baço: área elipsoide com exsudação de material fibrilar eosinofílico (fibrina) e infiltrado de macrófagos (setas), HE, objetiva 40x. **D:** Baço: área elipsoide com exsudação intensa de fibrina (seta), HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Além dos achados semelhantes ao do grupo A, nos casos de pneumonia intersticial, havia também, em alguns pulmões, microtrombos e hemorragia em diferentes intensidades (Figuras 7A e 7B). Nos casos de miocardite, as lesões eram caracterizadas por infiltrado de macrófagos e alguns linfócitos e plasmócitos, por vezes associado a perda e necrose de fibras cardíacas (Figuras 7C e 7D).

Figura 7 – Imagens microscópicas das lesões nos pulmões no 4º e 5º dpi e no coração no 6º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)

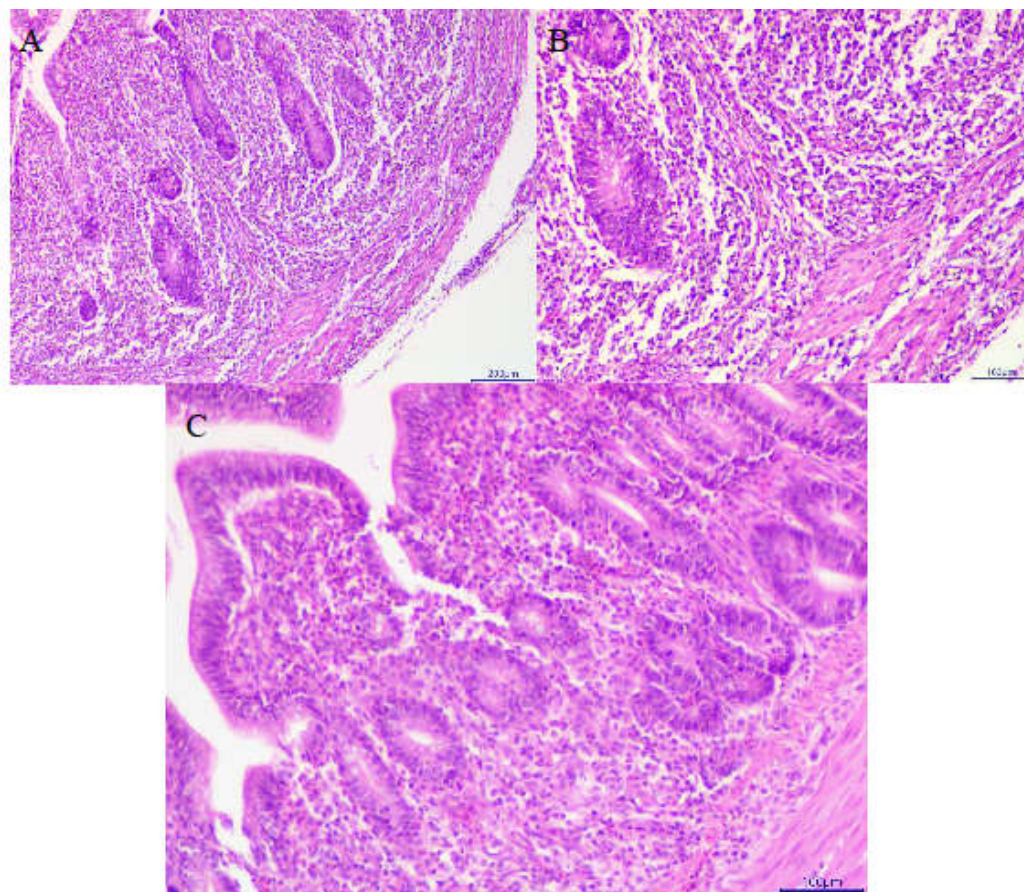


A: Pulmão: região entre os lóbulos com aumento de celularidade por infiltrado inflamatório, HE, objetiva 20x. **B:** Pulmão: interstício intensamente espessado por infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos e exsudação de fibrina, HE, objetiva 40x. **C:** Coração: miocárdio com áreas focalmente extensas de distensão e fragmentação de cardiomiócitos por infiltrado inflamatório, HE, objetiva 40x. **D:** Coração: imagem anterior aproximada evidenciando infiltrado de macrófagos entre as fibras cardíacas fragmentadas, HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação aos intestinos, houve jejunitis discreta, caracterizada por áreas multifocais de infiltrado de macrófagos e heterófilos na lâmina própria. Nos casos de ileíte transmural, as lesões foram caracterizadas por infiltrado de macrófagos e heterófilos na lâmina própria, frequentemente associadas a áreas multifocais de hemorragia e extensão do infiltrado inflamatório para a camada muscular e serosa (Figuras 8A, 8B e 8C). Por outro lado, nos casos

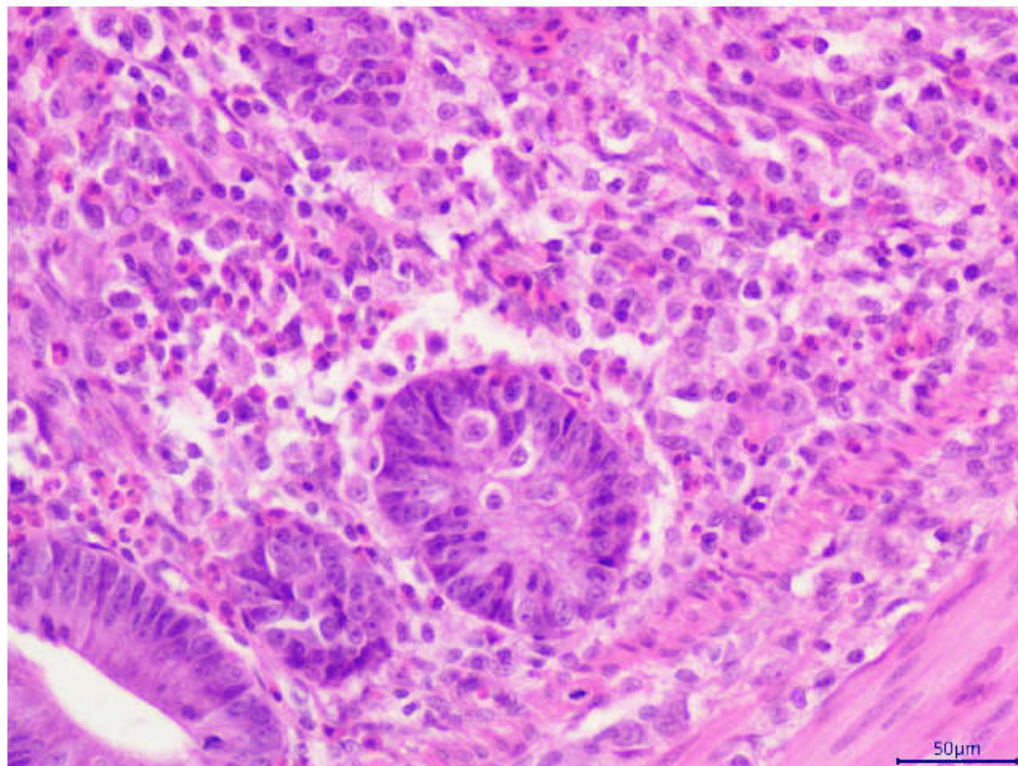
não transmural, o processo inflamatório estava restrito à lâmina própria e havia áreas multifocais de hemorragia (Figura 9).

Figura 8 – Imagens microscópicas das lesões no íleo no 3º e 4º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)



A: Íleo: lâmina própria intensamente expandida por infiltrado inflamatório transmural que se estende até a serosa, HE, objetiva 10x. **B:** Íleo: imagem anterior aproximada evidenciando o infiltrado inflamatório predominantemente histiocitário, HE, objetiva 20x. **C:** Íleo: lâmina própria com aumento intenso da celularidade por infiltrado inflamatório, HE, objetiva 20x. Fonte: Elaborado pelo autor.

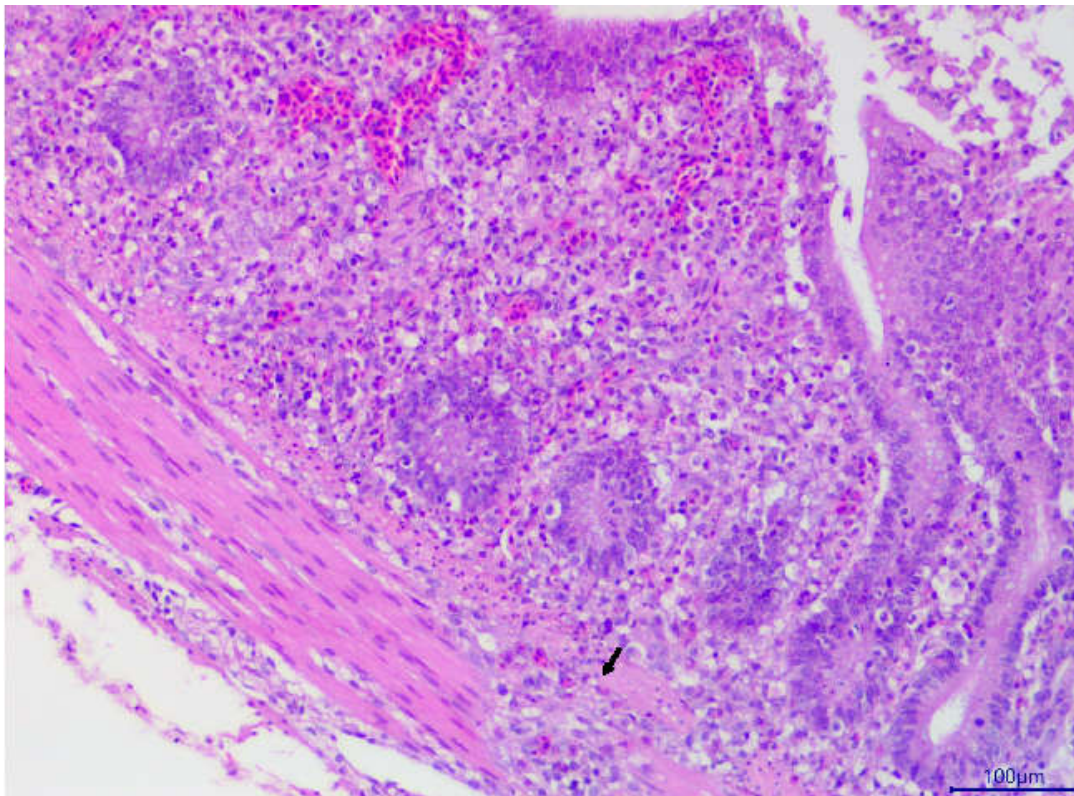
Figura 9 – Imagem microscópica da lesão no íleo no 3º dpi de ave inoculada com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)



Íleo: lâmina própria com infiltrado inflamatório intenso composto por macrófagos e heterófilos, HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

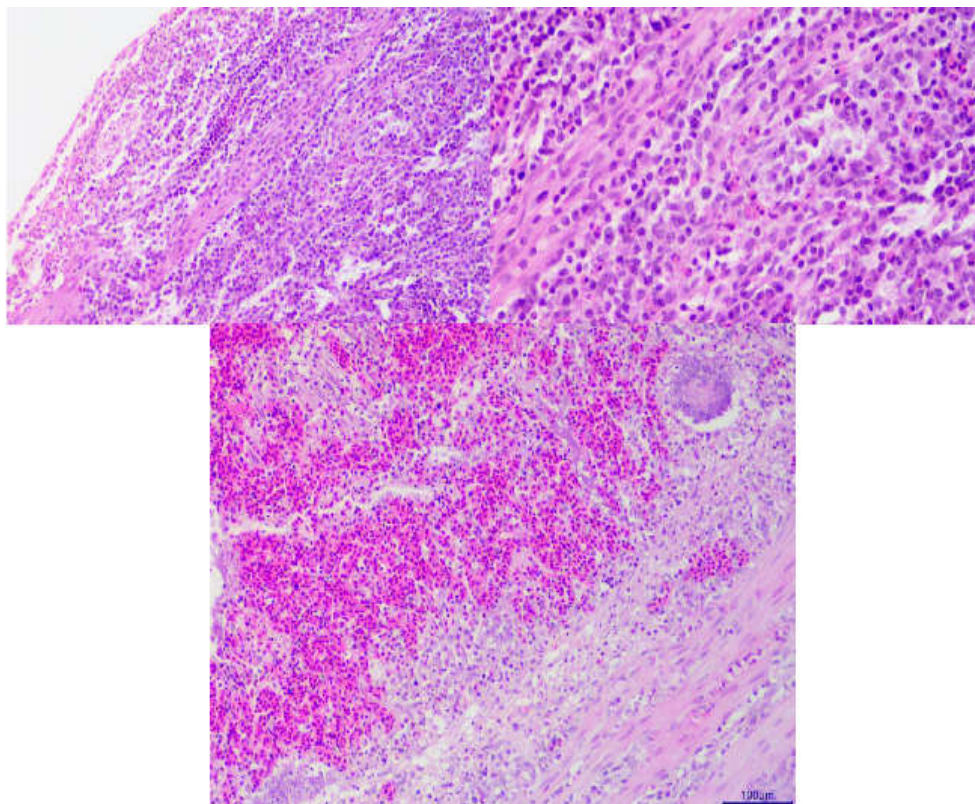
Nas aves com tífite transmural, as lesões eram semelhantes aos achados do íleo e incluíam também infiltrado de macrófagos na tonsila cecal (Figuras 10 e 11A, 11B e 11C). Para o único caso de colite transmural, os achados histológicos no cólon eram idênticos aos do íleo e do ceco.

Figura 10 – Imagem microscópica da lesão no ceco no 4º dpi de ave inoculada com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)



Ceco: lâmina própria com infiltrado inflamatório intenso de macrófagos e áreas multifocais de hemorragia, em uma área focal, há extensão da inflamação para a camada muscular (seta), HE, objetiva 20x.
Fonte: Elaborado pelo autor.

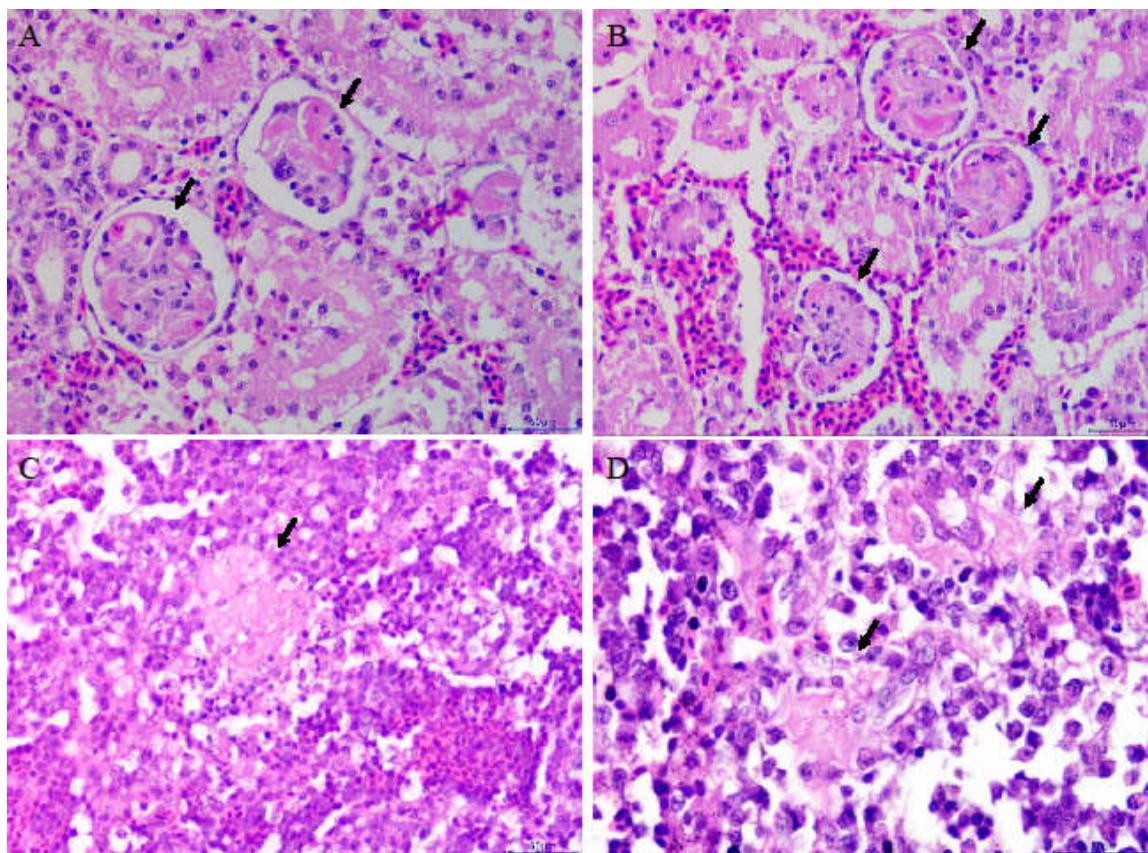
Figura 11 – Imagens microscópicas das lesões no ceco no 3º e 4º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)



A: Ceco: camada muscular e serosa com infiltrado inflamatório mononuclear intenso com perda de fibras musculares lisas, HE, objetiva 20x. **B:** Imagem anterior aproximada evidenciando o infiltrado inflamatório na camada muscular, HE, objetiva 40x. **C:** Ceco: lâmina própria e submucosa com áreas focalmente extensas de hemorragia, HE, objetiva 20x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação às lesões renais, o único caso de nefrite intersticial foi classificado como nefrite intersticial linfo-histiocitária multifocal. Nos casos de trombos glomerulares, frequentemente o lúmen dos capilares glomerulares afetados estavam completamente obliterados por trombos de fibrina (Figuras 12A e 12B). O único caso de glomerulonefrite foi classificado como glomerulonefrite proliferativa multifocal. Havia também hemorragia renal intersticial em algumas aves, principalmente nas que morreram naturalmente.

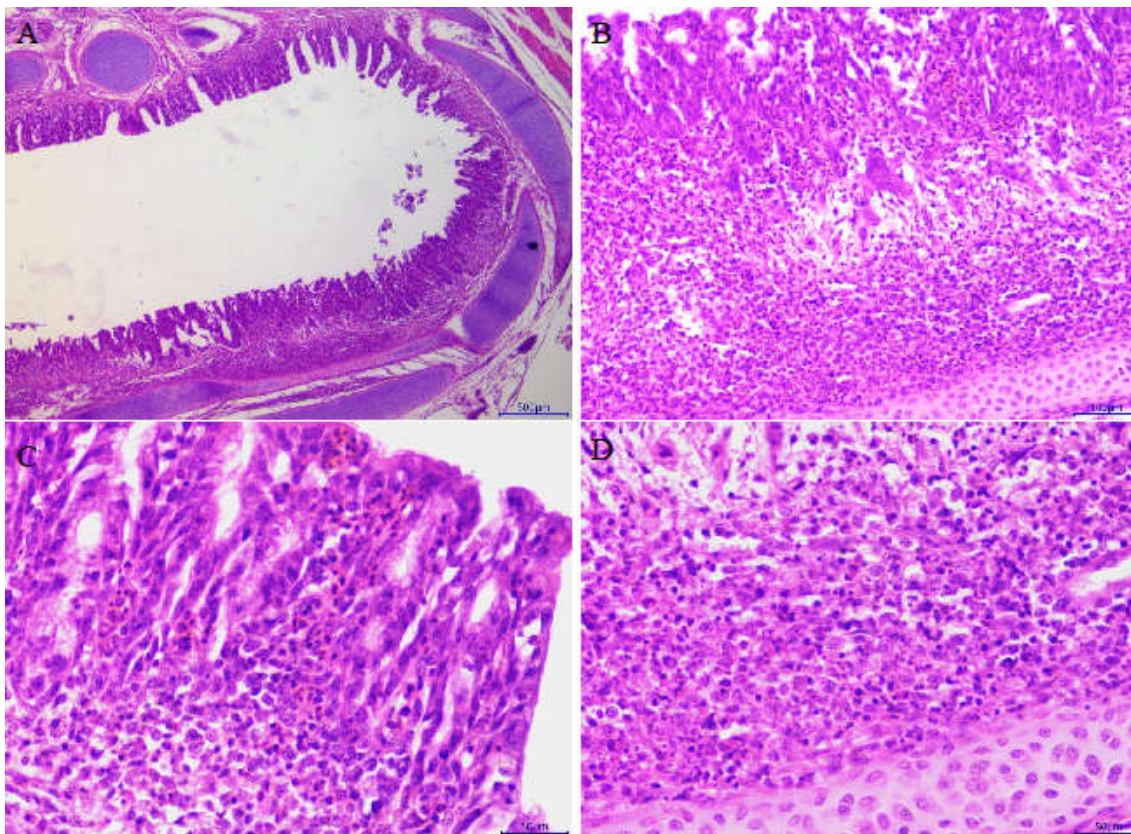
Figura 12 – Imagens microscópicas das lesões nos rins e na medula óssea no 4º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)



A: Rim: capilares glomerulares com múltiplos trombos de fibrina (setas), HE, objetiva 40x. **B:** Rim: capilares glomerulares com múltiplos trombos de fibrina (setas) e interstício com áreas multifocais de hemorragia, HE, objetiva 40x. **C:** Medula óssea: área focal com deposição de fibrina entre os componentes celulares da medula (seta), HE, objetiva 40x. **D:** Medula óssea: áreas multifocais com deposição de fibrina e infiltrado discreto por macrófagos (setas), HE, objetiva 60x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos casos de mielite óssea, as lesões eram semelhantes aos achados do grupo A (Figuras 12C e 12D). Nas aves com laringite, as lesões eram caracterizadas por infiltrado inflamatório na lâmina própria composto predominantemente por macrófagos e heterófilos (Figuras 13A, 13B, 13C e 13D). O único caso de traqueíte foi classificado como traqueíte histiocitária e heterofílica difusa.

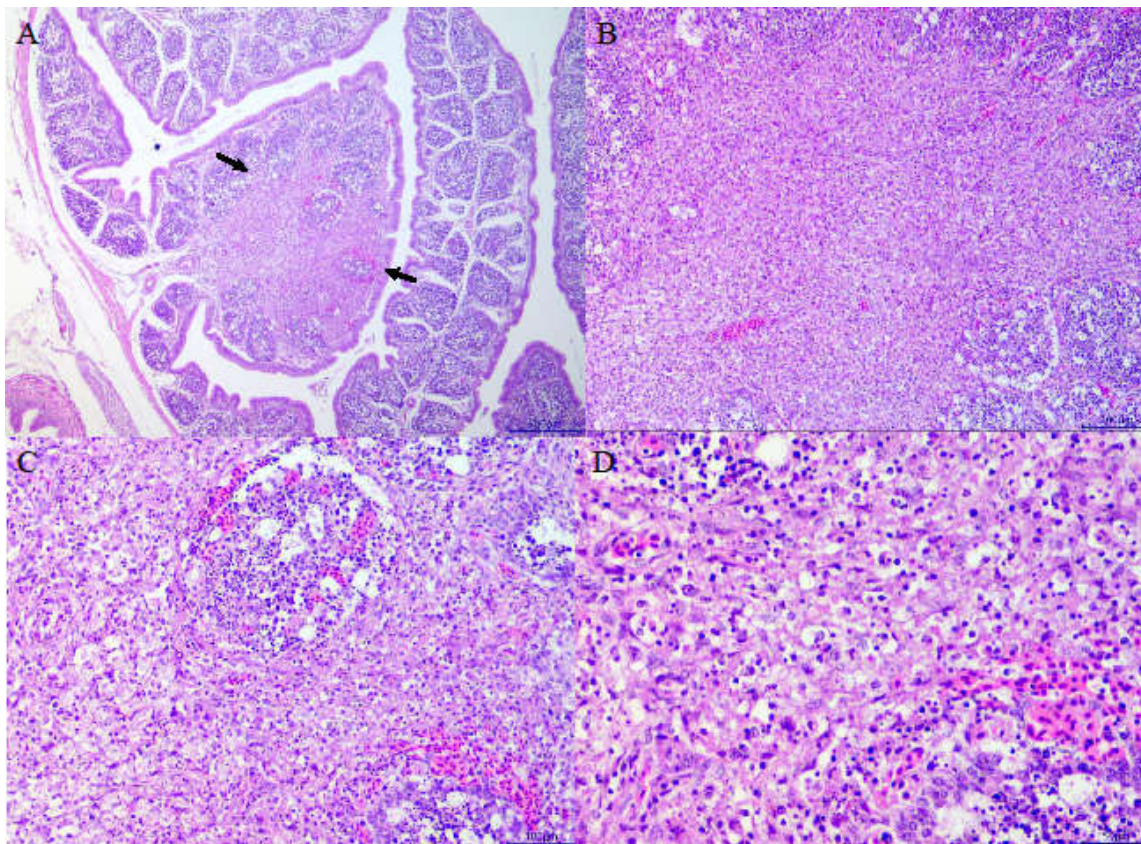
Figura 13 – Imagens microscópicas das lesões na laringe no 3º dpi de ave inoculada com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)



A: Laringe: mucosa com espessamento difuso e intenso por infiltrado inflamatório, HE, objetiva 4x. **B:** Laringe: lâmina própria intensamente expandida pelo infiltrado inflamatório, HE, objetiva 20x. **C:** Laringe: lâmina própria com infiltrado de macrófagos e alguns heterófilos. **D:** Laringe: lâmina própria com infiltrado intenso de macrófagos entremeados por restos celulares necróticos, HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos casos de inflamação do saco da gema, as lesões encontradas eram semelhantes às do grupo A. Em dois casos havia processo inflamatório sem visualização de bactérias. Nas aves com bursite, histologicamente as lesões eram caracterizadas por infiltrado de macrófagos e heterófilos no interior e entre os folículos linfóides, por vezes associado a áreas extensas de necrose dos folículos linfóides e depleção linfóide (Figuras 14A, 14B, 14C e 14D).

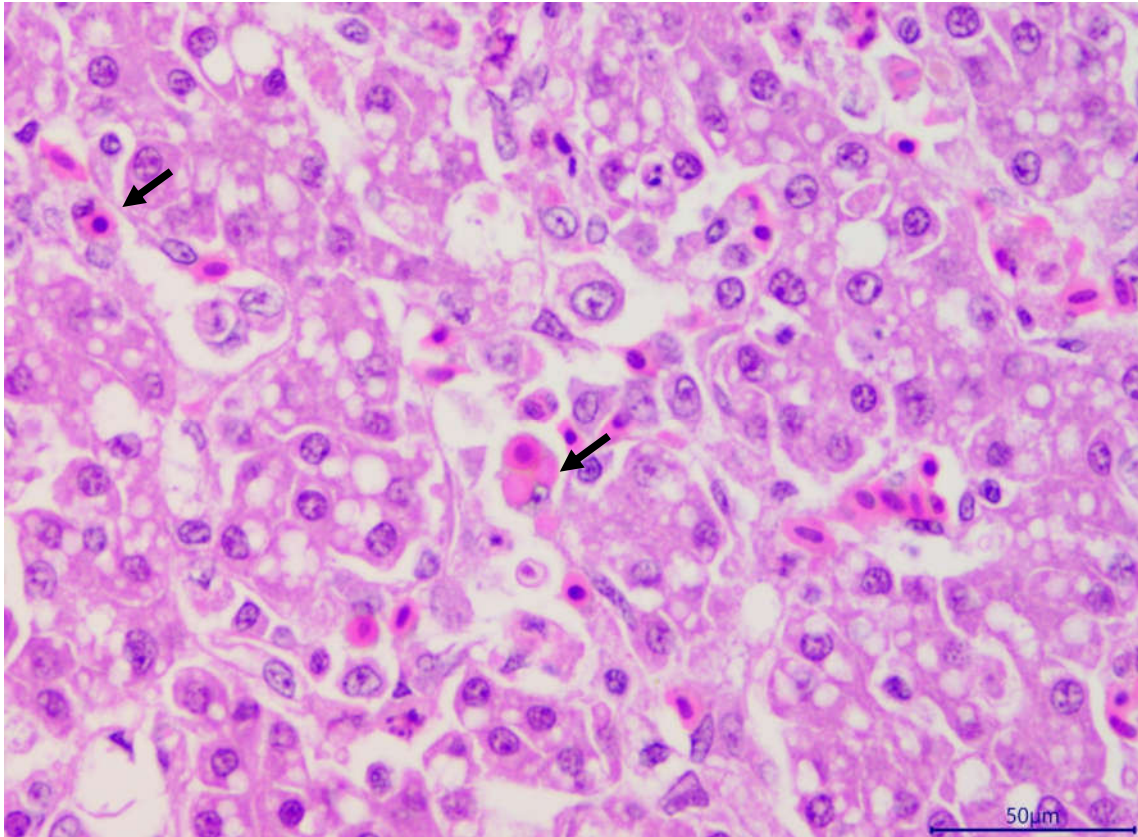
Figura 14 – Imagens microscópicas das lesões na bolsa cloacal no 5º dpi de ave inoculada com *Salmonella Gallinarum* por via oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo B)



A: Bolsa cloacal: prega com área focalmente extensa de perda dos folículos linfoides (setas), HE, objetiva 4x. **B:** Bolsa cloacal: imagem anterior aproximada evidenciando perda dos folículos linfoides e deposição de material necrótico, HE, objetiva 10x. **C:** Bolsa cloacal: área focalmente extensa de necrose do tecido linfoide, associado a infiltrado inflamatório. Foliculo remanescente entremeado por área de necrose com depleção linfoide intensa, HE, objetiva 20x. **D:** Bolsa cloacal: imagem anterior aproximada evidenciando predomínio de infiltrado de macrófagos nas áreas de necrose, HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

No grupo C, nos casos de hepatite, além das lesões descritas anteriormente nos grupos A e B, havia também, em uma ave que morreu naturalmente no 6º dpi e outra no 7º dpi, eritrofagocitose caracterizada por vários macrófagos nos sinusoides com hemácias no citoplasma (Figura 15). Houve também, em uma ave no 7º dpi, um quadro de colecistite necrótica histiocitária e heterofílica discreta. Nas aves com esplenite, o processo inflamatório era semelhante aos achados dos demais grupos, por vezes com depleção linfoide ou hiperplasia de células reticulares.

Figura 15 – Imagem microscópica da lesão no fígado no 7º dpi de ave inoculada com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo C)

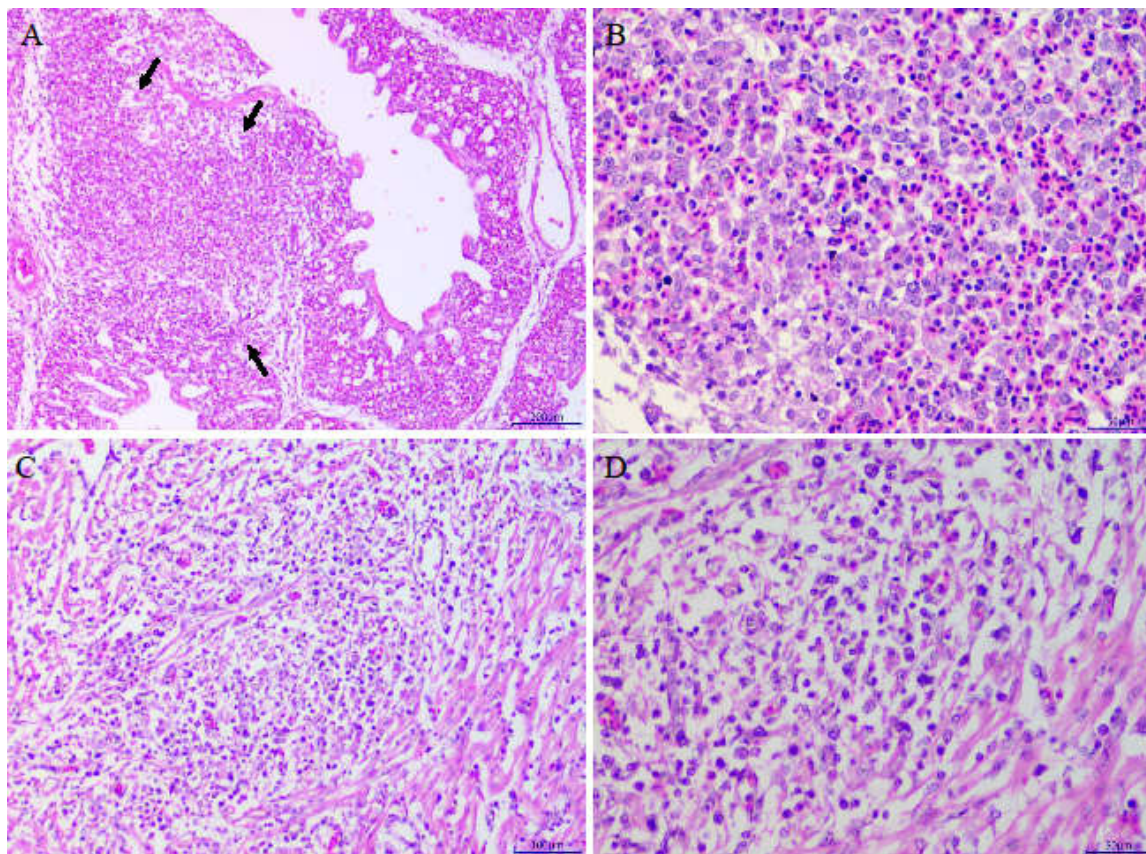


Fígado: macrófago no sinusoide com hemácias no citoplasma (eritrofagocitose) (setas), HE, objetiva 60x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos casos de pneumonia intersticial, além das alterações descritas nos demais grupos (Figuras 16A e 16B), outros achados incluíram hemorragia, vasculite, trombos, aumento de monócitos intravasculares e eritrofagocitose, com esse último achado aparecendo em uma só ave desse grupo.

Nos casos de miocardite, as lesões eram semelhantes aos achados do grupo A e B (Figuras 16C e 16D). A única ileíte não transmural foi classificada como histiocitária. Nos casos de tiflíte não transmural, as lesões eram caracterizadas por infiltrado de macrófagos na lâmina própria e na região da tonsila. As colites não transmurais foram classificadas como histiocitárias.

Figura 16 – Imagens microscópicas das lesões nos pulmões e no coração no 7º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo C)



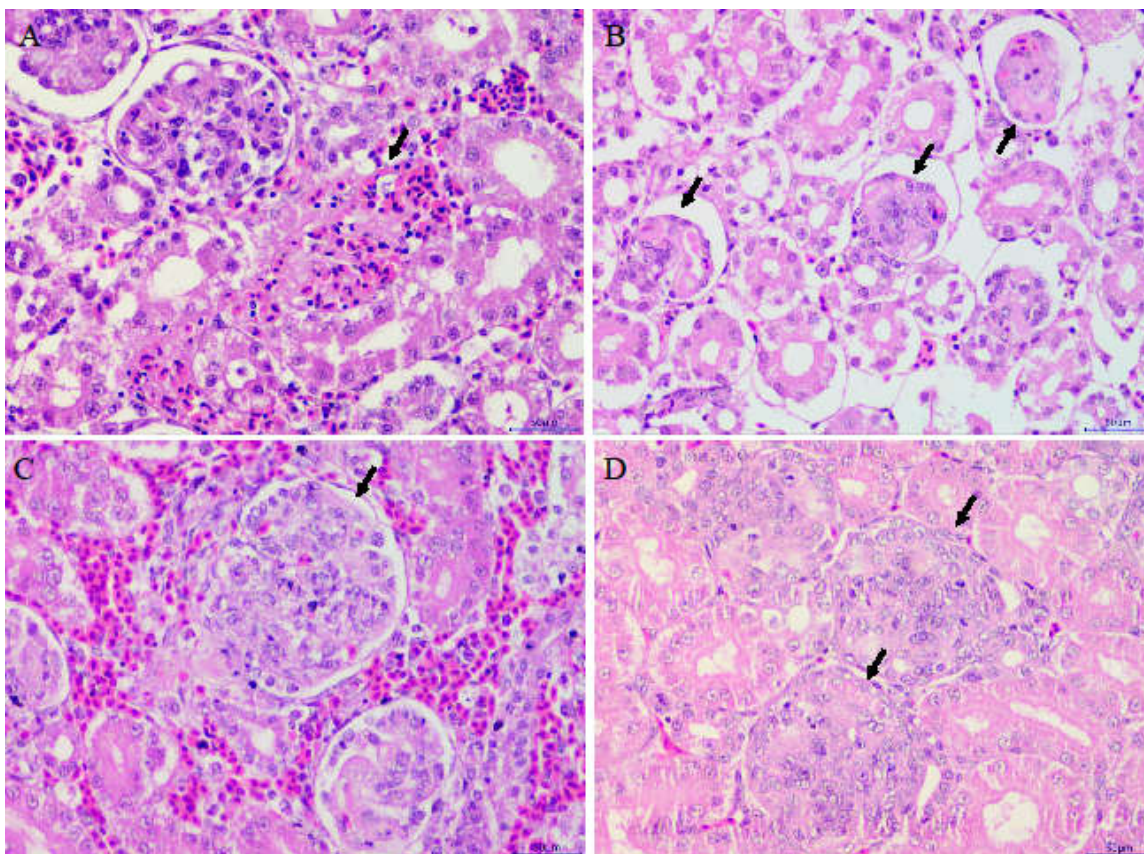
A: Pulmão: interstício com área focalmente extensa nodular de celularidade por infiltrado inflamatório (setas), HE, objetiva 10x. **B:** Pulmão: imagem anterior aproximada evidenciando infiltrado por macrófagos no interstício (pneumonia intersticial), HE, objetiva 40x. **C:** Coração: miocárdio com área focalmente extensa de perda de cardiomiócitos associado a infiltrado inflamatório intenso, HE, objetiva 20x. **D:** Coração: imagem anterior aproximada evidenciando infiltrado por macrófagos e linfócitos nas áreas de perdas de fibras cardíacas, HE, objetiva 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos casos de miocardite, as lesões eram semelhantes aos achados do grupo A e B (Figuras 16C e 16D). A única ileíte não transmural foi classificada como histiocitária. Nos casos de tiflite não transmural, as lesões eram caracterizadas por infiltrado de macrófagos na lâmina própria e na região da tonsila. As colites não transmural foram classificadas como histiocitárias.

Nas lesões renais, os casos de nefrite intersticial foram classificados como histiocitárias ou linfo-histiocitárias. Nos casos de glomerulonefrite, as lesões eram semelhantes aos achados do grupo A. Além dessas alterações, havia também, em alguns casos, trombose, hemorragia e vasculite em vasos do interstício (Figuras 17A, 17B, 17C e 17D).

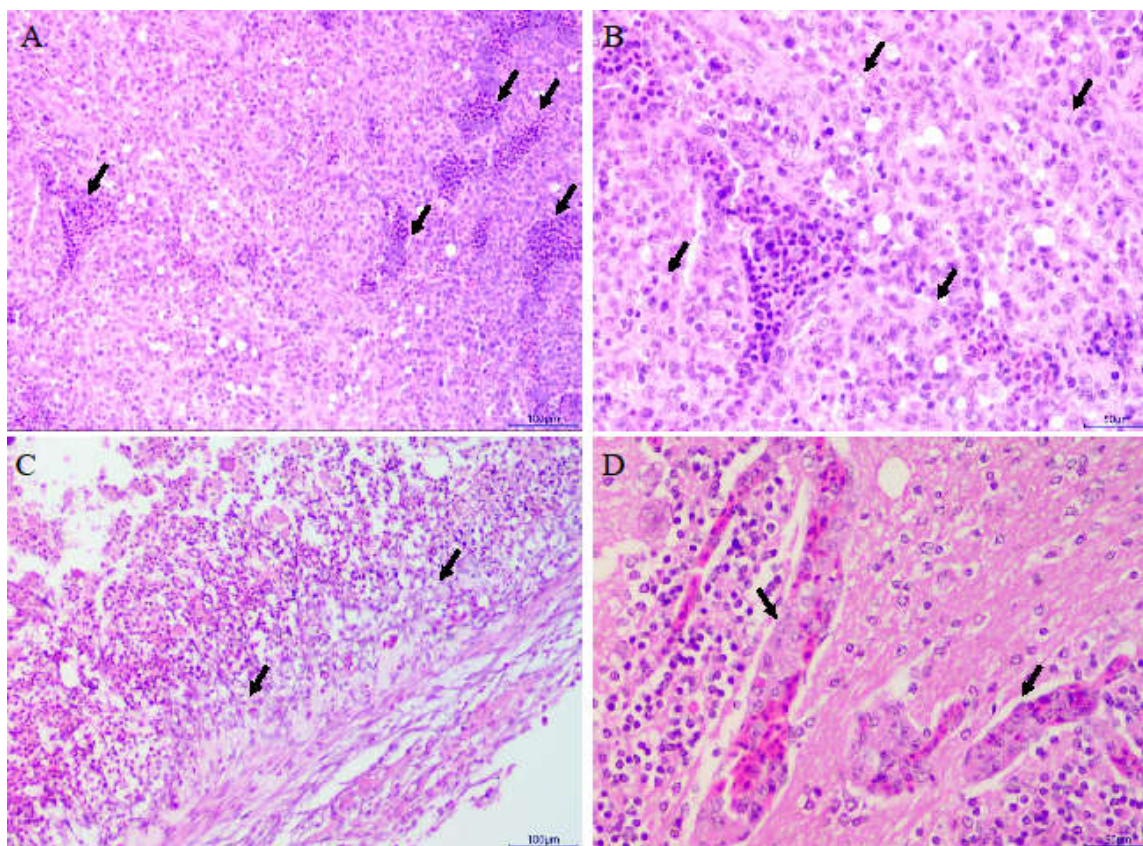
Figura 17 – Imagens microscópicas das lesões nos rins no 5º, 6º, 7º e 9º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo C)



A: Rim: vaso intersticial com trombo de fibrina (seta), HE, objetiva 40x. **B:** Rim: capilares glomerulares repletos de trombos de fibrina (setas), HE, objetiva 40x. **C:** Rim: glomérulo com aumento intenso da celularidade do mesângio (glomerulonefrite proliferativa) (seta). Interstício com áreas multifocais de hemorragia, HE, objetiva 40x. **D:** Rim: glomérulos com aumento da celularidade do mesângio e espessamento da membrana basal (glomerulonefrite membrano-proliferativa) (setas), HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas aves com mielite da medula óssea, além das lesões descritas no grupo A, havia também, nas aves do 9º dpi, áreas de mieloptise devido à substituição intensa das linhagens celulares da medula óssea por macrófagos (Figuras 18A e 18B). Os casos de laringite e a única traqueíte nesse grupo foram classificados como histiocitários.

Figura 18 – Imagens microscópicas das lesões na medula óssea no 8º dpi, no saco da gema no 7º dpi e no encéfalo no 7º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,6 \times 10^5$ UFC/mL (Grupo C)



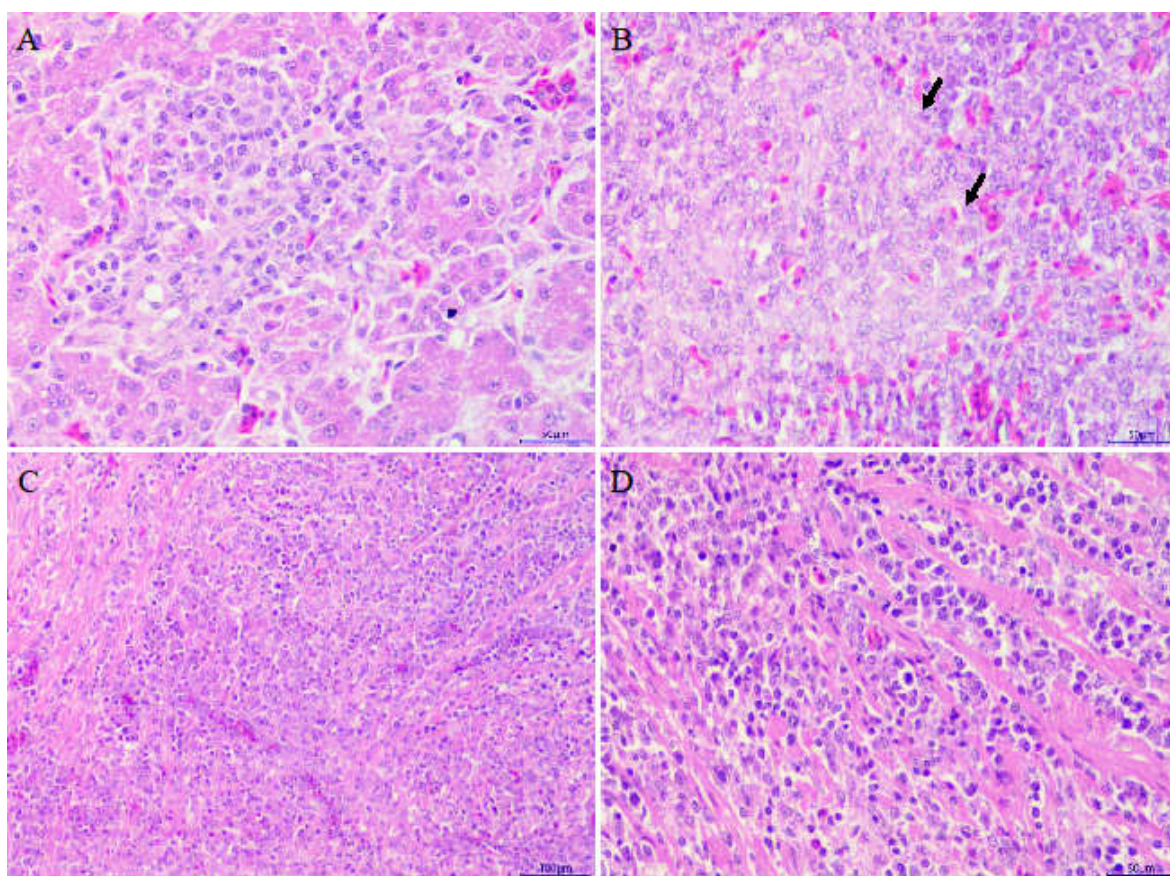
A: Medula óssea: área extensa de perda das linhagens celulares granulocíticas e linfóide com substituição por infiltrado inflamatório intenso composto por macrófagos. Áreas multifocais com tecido linfóide remanescente normal (setas) HE, objetiva 20x. **B:** Medula óssea: imagem anterior aproximada evidenciando o infiltrado de macrófagos (setas), HE, objetiva 40x. **C:** Saco da gema: parede com infiltrado intenso de macrófagos (setas) e lúmen com restos celulares necróticos, HE, objetiva 20x. **D:** Encéfalo: camada molecular do cerebelo, parede dos vasos com infiltrado inflamatório por macrófagos (setas), presentes também no lúmen, HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos casos de inflamação do saco da gema, as lesões encontradas eram semelhantes às do grupo A. O infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos estava localizado tanto no lúmen quanto na parede do saco da gema e em duas aves não foram visualizadas bactérias intralesionais (Figura 18C). As lesões dos casos de bursite foram semelhantes às do grupo B.

O único caso de encefalite nesse grupo foi caracterizado por um quadro de vasculite multifocal com infiltrado de macrófagos na parede dos vasos do tronco encefálico, cerebelo e cérebro, por vezes associado a alguns trombos (Figura 18D). Houve também, em outros três encéfalos, áreas focais de microgliose.

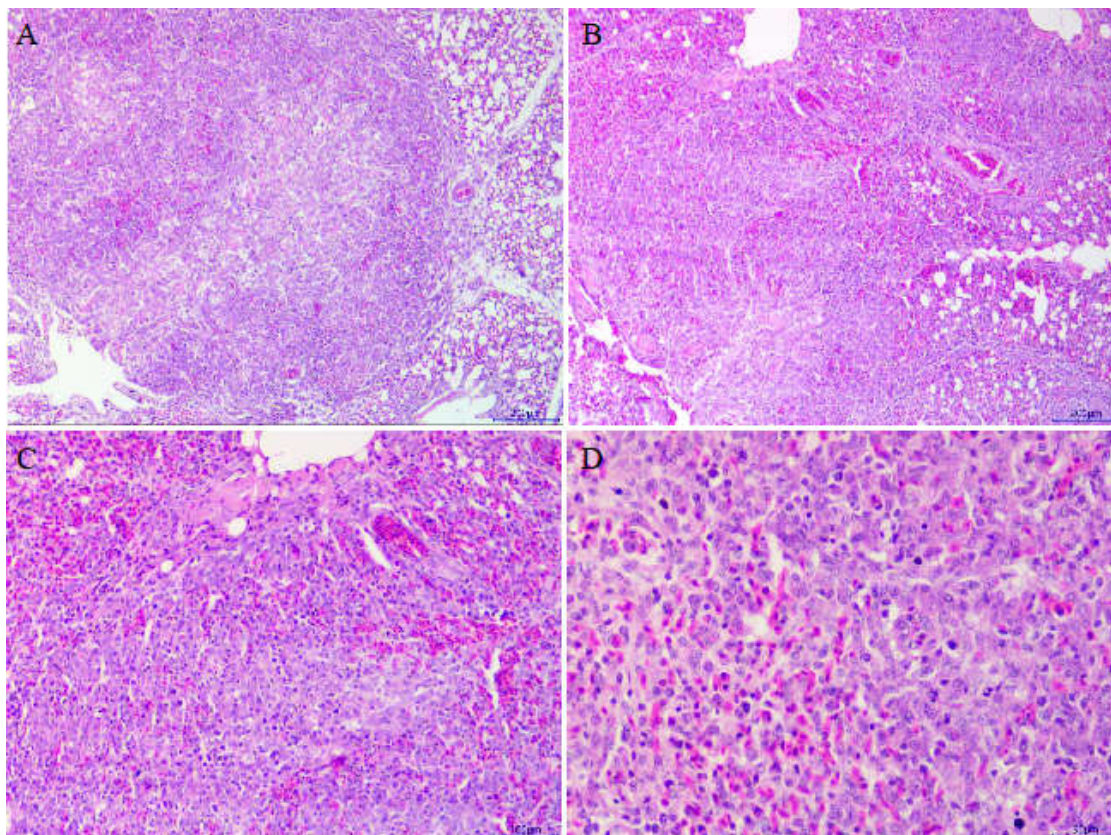
No grupo D, dos casos de hepatite, as lesões encontradas incluíram os achados descritos nos demais grupos (Figura 19A), inclusive um caso de eritrofagocitose em uma ave que morreu naturalmente no 8º dpi. Nas aves com esplenite, não houve diferença ao comparar com os achados dos demais grupos (Figura 19B). Dos casos de miocardite, não houve diferença com os achados dos demais grupos (Figuras 19C e 19D). Nos casos de pneumonia intersticial, os achados foram semelhantes aos demais grupos, incluindo hemorragia e microtrombos em alguns casos (Figuras 20A, 20B, 20C e 20D).

Figura 19 – Lesões microscópicas no fígado no 8º dpi, no baço no 8º dpi e no coração no 11º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)



A: Fígado: área focalmente extensa com perda de hepatócitos e infiltrado inflamatório composto por macrófagos e linfócitos, HE, objetiva 40x. **B:** Baço: polpa branca com área focalmente extensa de infiltrado de macrófagos (setas), HE, objetiva 40x. **C:** Coração: miocárdio com área focalmente extensa de perda, necrose e fragmentação de fibras cardíacas associada a infiltrado inflamatório intenso, HE, objetiva 20x. **D:** Coração: imagem anterior aproximada evidenciando infiltrado de macrófagos e linfócitos no miocárdio, HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Imagens microscópicas das lesões nos pulmões no 10º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)

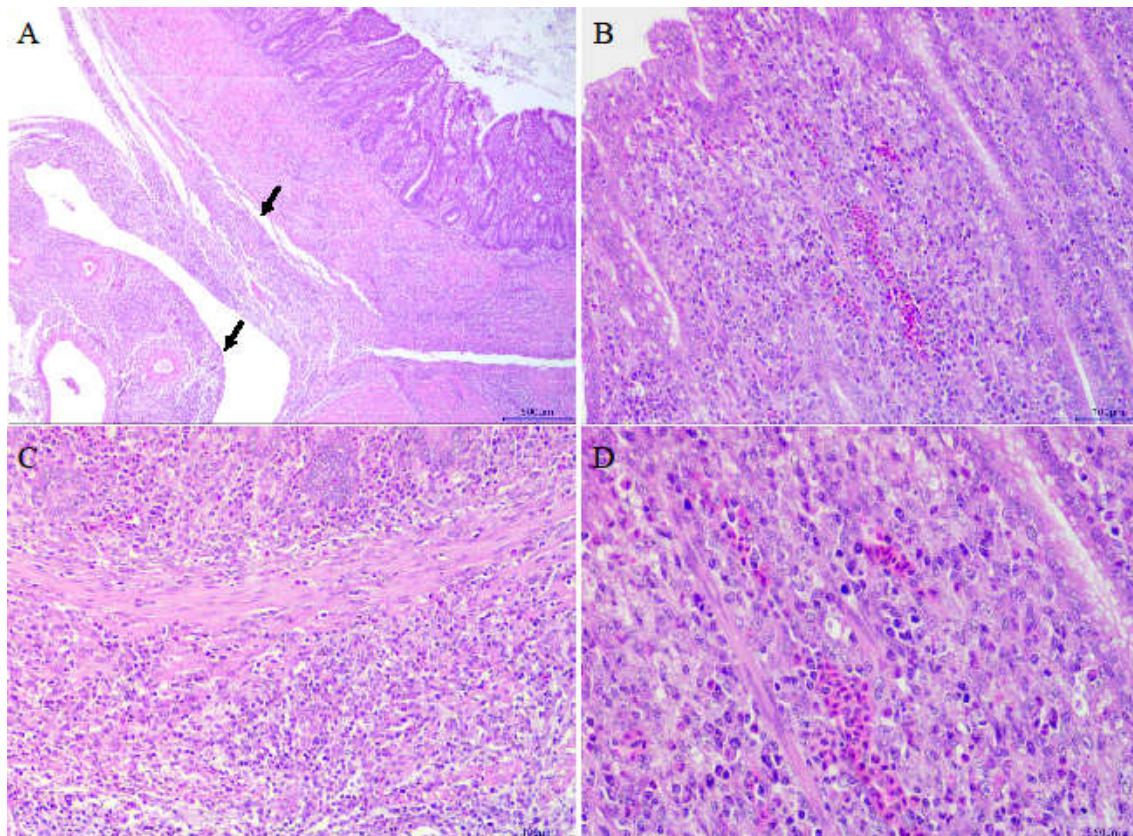


A: Pulmão: interstício com área focalmente extensa nodular, composta por infiltrado inflamatório que comprime o parênquima adjacente e obstrui parcialmente as vias aéreas, HE, objetiva 10x. **B:** Pulmão: lóbulos com áreas difusas de espessamento por infiltrado inflamatório intenso, HE, objetiva 10x. **C:** Pulmão: lóbulo com área focalmente extensa de infiltrado inflamatório composto por macrófagos, HE, objetiva 20x. **D:** Pulmão: imagem anterior aproximada evidenciando o infiltrado de macrófagos no interstício, HE, objetiva 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

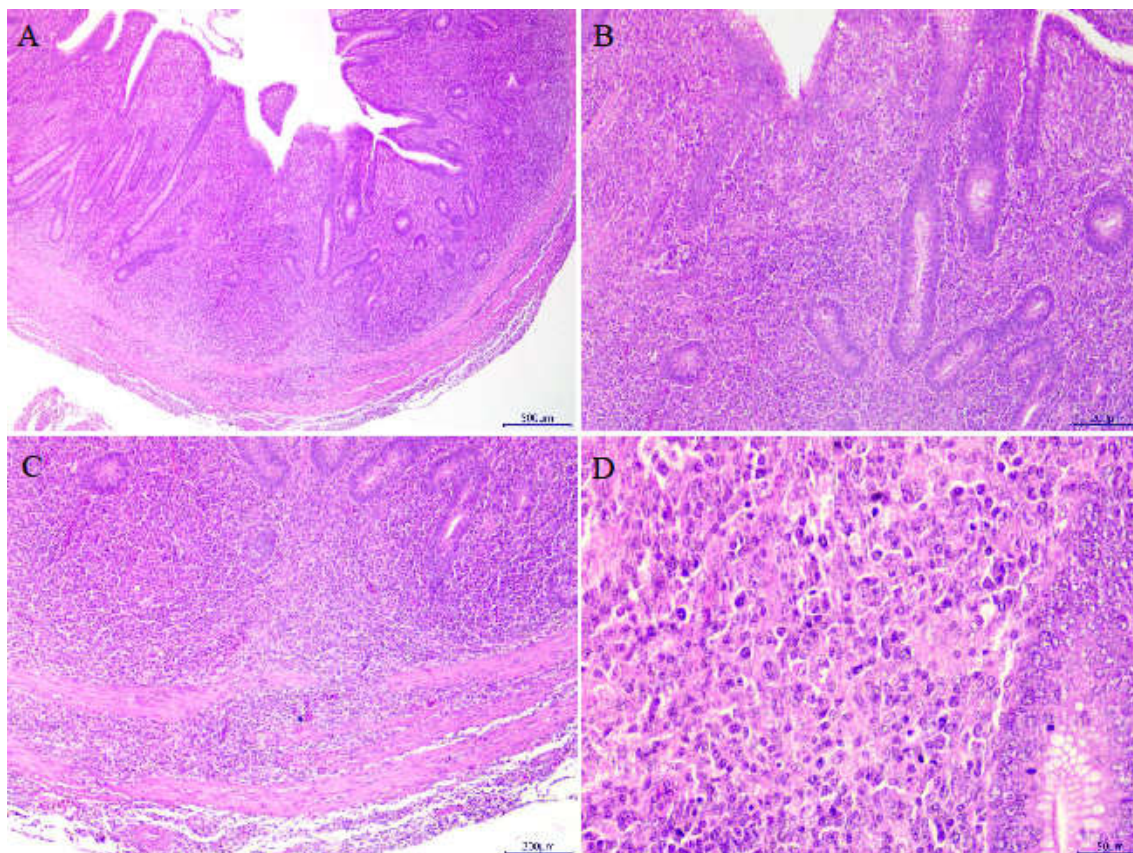
Os casos de jejunitis transmurais nesse grupo foram classificados como histiocitários. Nos casos de ileíte transmural, as lesões eram semelhantes aos achados do grupo B. No entanto, em aves do 8º ao 11º dpi havia extensão do processo inflamatório para o mesentério (Figuras 21A, 21B, 21C e 21D). Nos casos de tiflites transmurais, as lesões foram as mesmas do íleo e incluíam extensão do processo inflamatório para o mesentério (Figuras 22A, 22B, 22C e 22D).

Figura 21 – Imagens microscópicas das lesões no íleo no 8º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)



A: Íleo: infiltrado inflamatório intenso que se estende da lâmina própria até serosa, com acometimento do mesentério (setas), HE, objetiva 4x. **B:** Íleo: lâmina própria intensamente expandida por infiltrado inflamatório composto por macrófagos, HE, objetiva 20x. **C:** Íleo: submucosa e camada muscular com infiltrado inflamatório intenso, composto por macrófagos, HE, objetiva 20x. **D:** Íleo: imagem aproximada evidenciando infiltrado intenso de macrófagos na lâmina própria com perda de criptas e hemorragia discreta, HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Imagens microscópicas das lesões no ceco no 10º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)

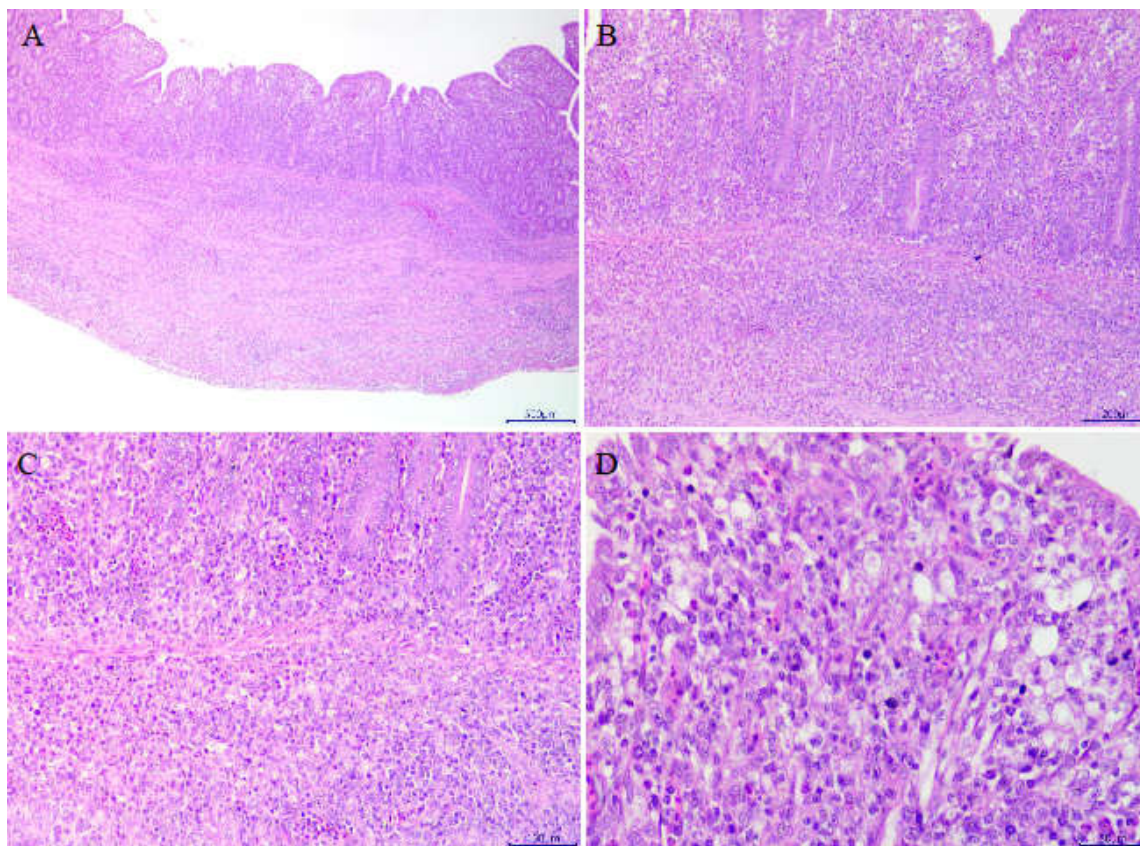


A: Ceco: espessamento difuso e intenso do segmento intestinal por infiltrado inflamatório que se estende da lâmina própria até a serosa, HE, objetiva 4x. **B:** Ceco: imagem aproximada evidenciando intensa expansão da lâmina própria na região da tonsila cecal por infiltrado inflamatório, HE, objetiva 10x. **C:** Ceco: lâmina própria com infiltrado inflamatório intenso que se estende para camada muscular e serosa, HE, objetiva 10x. **D:** Ceco: lâmina própria com infiltrado inflamatório predominantemente histiocitário, HE, objetiva 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos casos de colites transmurais e não transmurais, as lesões eram caracterizadas por infiltrado de macrófagos e heterófilos na lâmina própria, frequentemente associada com áreas de hemorragia. Nos casos transmurais, havia extensão do processo inflamatório para as camadas muscular e serosa e até o mesentério nas aves do 9º e 10º dpi (Figuras 23A, 23B, 23C e 23D).

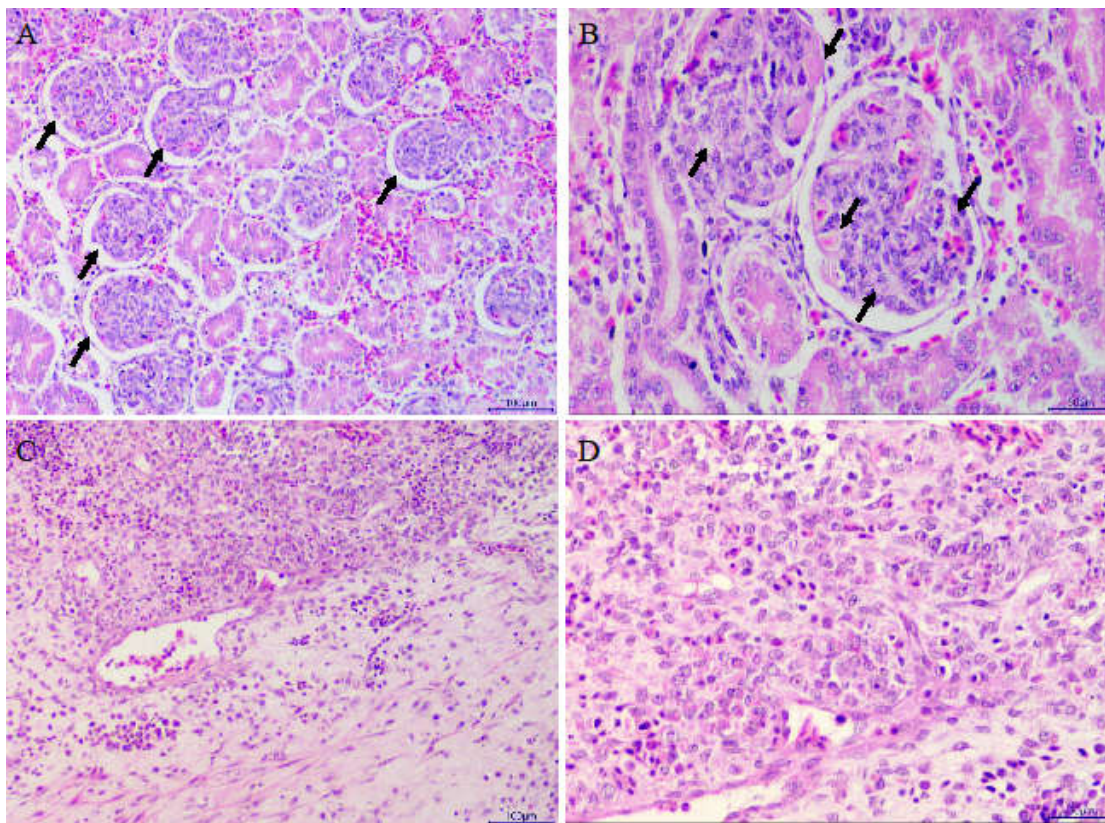
Figura 23 – Imagens microscópicas das lesões no cólon no 9º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)



A: Cólon: espessamento difuso e intenso do segmento intestinal por infiltrado inflamatório que se estende da lâmina própria até a serosa, HE, objetiva 4x. **B:** Cólon: imagem anterior aproximada evidenciando infiltrado inflamatório com expansão da lâmina própria e perda de fibras musculares lisas, HE, objetiva 10x. **C:** Cólon: imagem aproximada evidenciando infiltrado de macrófagos na região de criptas, submucosa e camada muscular, HE, objetiva 20x. **D:** Cólon: lâmina própria com infiltrado inflamatório intenso de macrófagos, alguns vacuolizados. HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação às lesões renais, os casos de nefrite intersticial, conforme o infiltrado inflamatório presente, foram classificados como linfo-histiocitários ou histiocitários. Para os casos de glomerulonefrite, as lesões eram semelhantes aos achados dos demais grupos (Figuras 24A e 24B). Além disso, em alguns rins havia quadro de hemorragia com trombose em vasos do interstício e eritrofagocitose em uma ave que morreu naturalmente no 8º dpi.

Figura 24 – Imagens microscópicas das lesões nos rins no 8° dpi e no saco da gema no 11° dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)

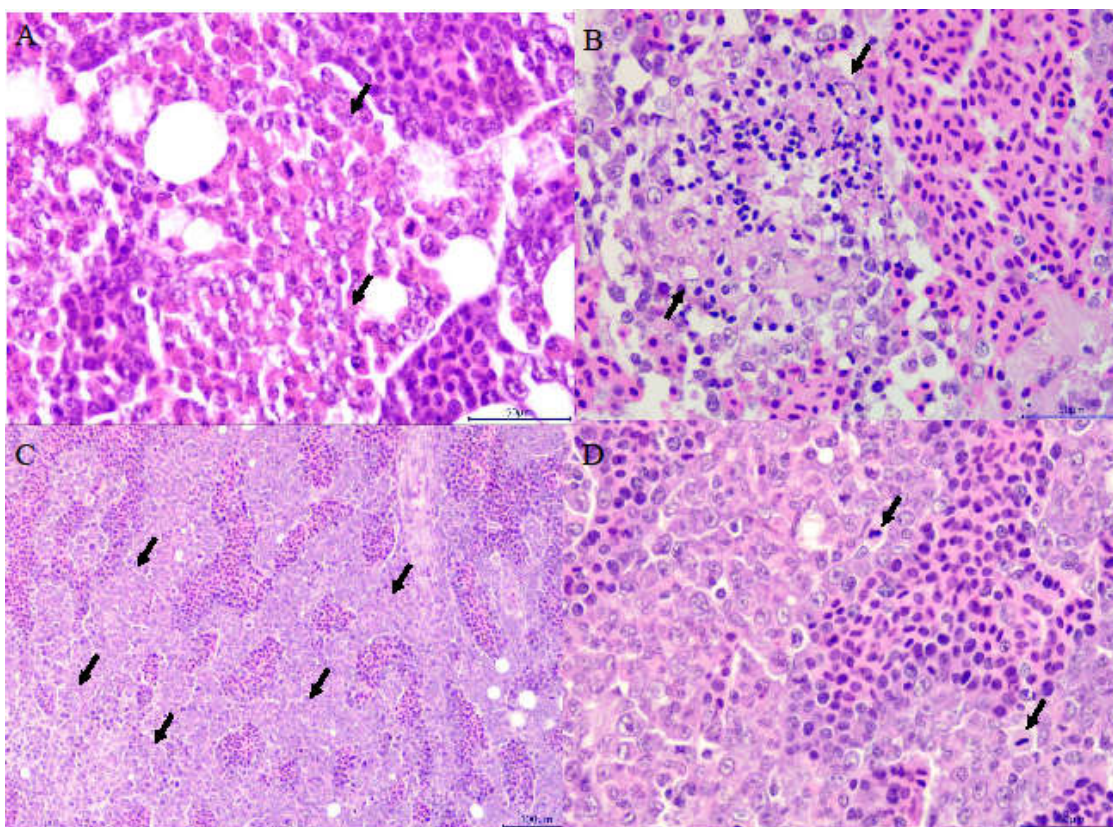


A: Rim: glomérulos com aumento intenso da celularidade do mesângio (glomerulonefrite proliferativa) (setas) e áreas multifocais de hemorragia no interstício, HE, objetiva 20x. **B:** Rim: imagem aproximada da figura A evidenciando trombos de fibrina nos glomérulos com aumento de celularidade do mesângio (setas), HE, objetiva 40x. **C:** Saco da gema: região subepitelial e parede intensamente espessada por infiltrado inflamatório, HE, objetiva 20x. **D:** Saco da gema: imagem aproximada da figura C evidenciando infiltrado inflamatório composto por macrófagos e alguns heterófilos, HE, objetiva 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Das aves com mielite óssea, além das lesões anteriormente descritas, havia, em uma ave eutanasiada no 5° dpi, áreas multifocais de necrose e exsudação de fibrina e, nas aves do 10° e 11° dpi, um quadro de hiperplasia reacional caracterizado por aumento nas linhagens celulares de origem monocítica na medula óssea (Figuras 25A, 25B, 25C e 25D).

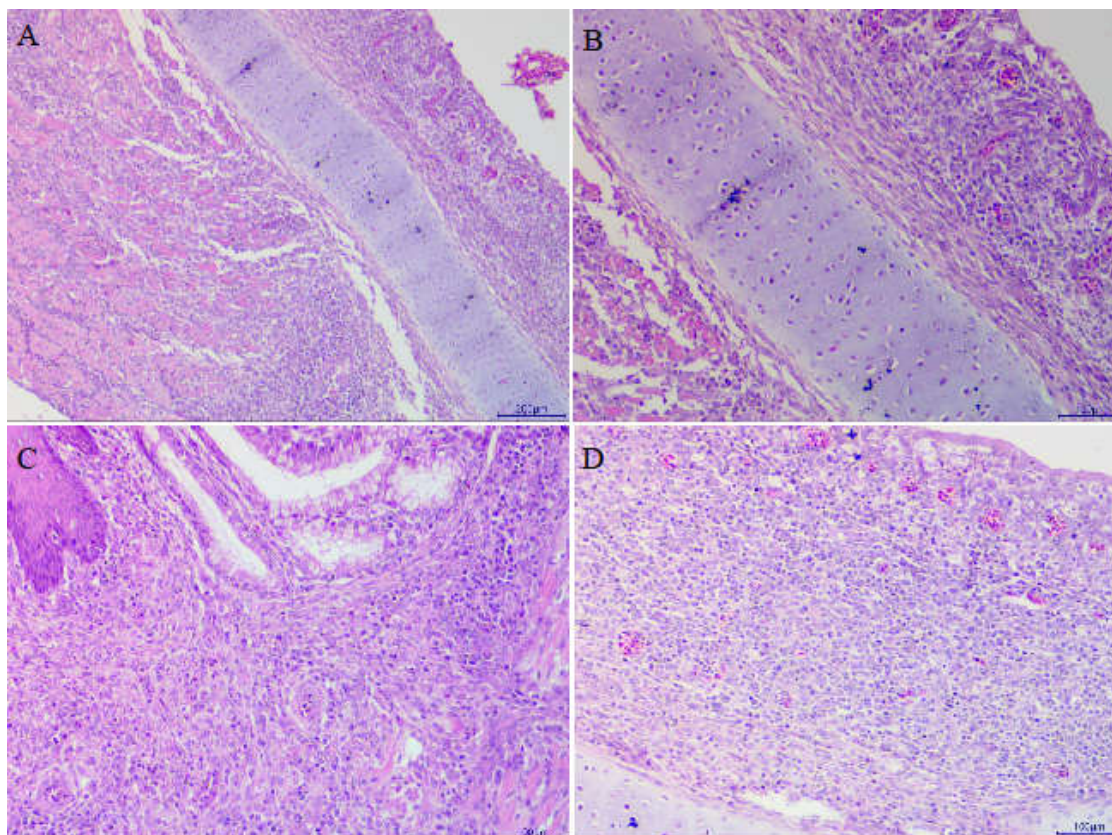
Figura 25 – Imagens microscópicas das lesões na medula óssea no 5° e 9° dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)



A: Medula óssea: ave do grupo controle, medula óssea normal com predomínio de células granulocíticas (setas), HE, objetiva 60x. **B:** Medula óssea: área focal de necrose, com exsudação de fibrina e infiltrado discreto de macrófagos (setas), HE, objetiva 60x. **C:** Medula óssea: perda difusa dos precursores e células granulocíticas, com proliferação e substituição por células de origem monocítica (setas) em meio tecido linfoide normal remanescente, HE, objetiva 20x. **D:** Medula óssea: imagem aproximada evidenciando intensa proliferação e infiltração celular, frequentemente com figuras de mitose (setas), HE, objetiva 60x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas aves com laringite, as lesões eram caracterizadas por infiltrado de macrófagos e heterófilos na lâmina própria, por vezes com hemorragia, exocitose de heterófilos e/ou macrófagos e necrose do epitélio. Havia também, em cinco aves do 7°, 8°, 9° e 10° dpi, extensão do processo inflamatório para a musculatura da laringe e camada muscular do esôfago. Dos casos de traqueíte, as lesões eram idênticas às da laringe e, em um dos casos, o processo inflamatório se estendia até a camada muscular (Figuras 26A, 26B, 26C e 26D).

Figura 26 – Imagens microscópicas das lesões na laringe, no esôfago e na traqueia no 10º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)

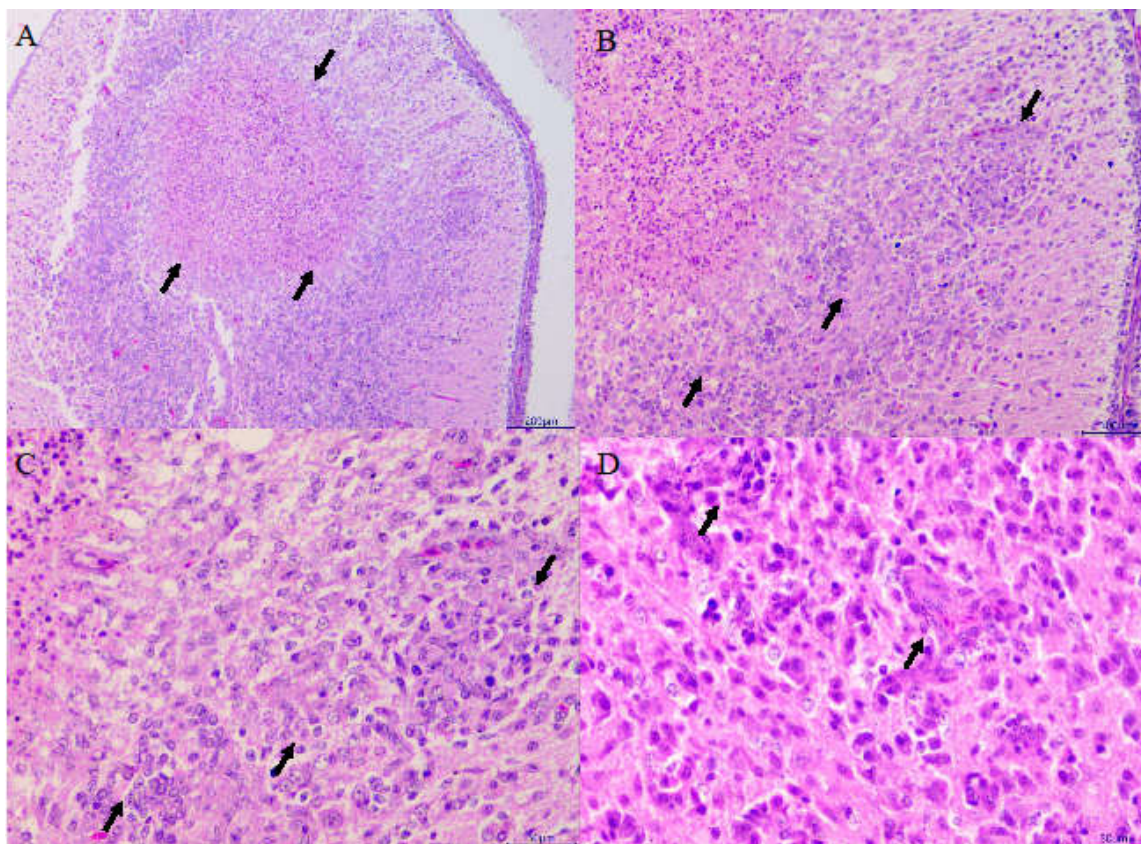


A: Laringe: mucosa e camada muscular com infiltrado inflamatório intenso, HE, objetiva 10x. **B:** Laringe: imagem aproximada evidenciando infiltrado inflamatório de macrófagos na mucosa e camada muscular, HE, objetiva 20x. **C:** Esôfago: camada muscular com infiltrado inflamatório intenso, associado a perda de fibras musculares, HE, objetiva 20x. **D:** Traqueia: mucosa intensamente espessada por infiltrado inflamatório na lâmina própria composto por macrófagos, HE, objetiva 20x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos casos de inflamação do saco da gema, as lesões encontradas foram semelhantes aos achados dos demais grupos (Figuras 28C e 28D).

O caso de encefalite foi caracterizado por duas lesões focais, uma na região do córtex cerebelar, caracterizada por necrose central margeada por infiltrado inflamatório de macrófagos, gliose intensa e gemistócitos; e outra no cérebro, com manguitos perivascularares compostos por macrófagos, linfócitos e alguns plasmócitos e gliose (Figuras 27A, 27B, 27C e 25D). Por fim, os casos de bursite foram classificados como histiocitários (Figuras 28A e 28B).

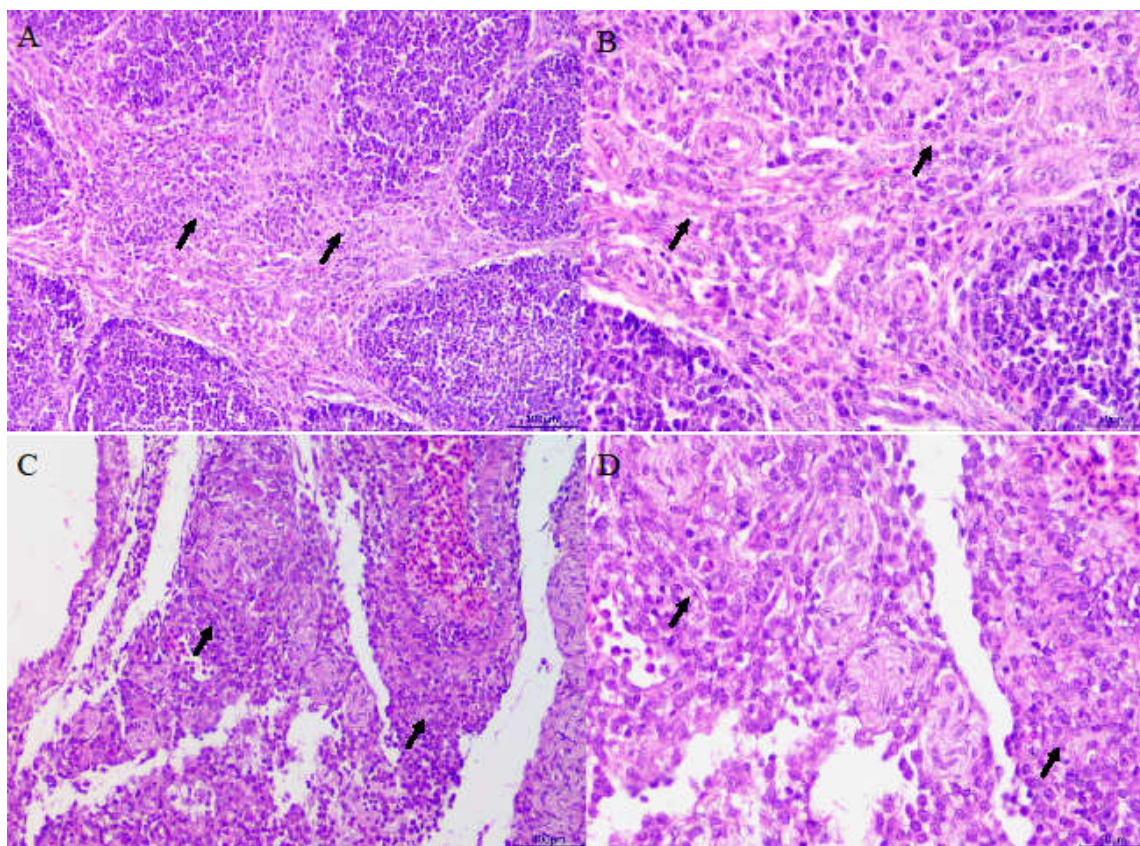
Figura 27 – Imagens microscópicas das lesões no encéfalo no 8º dpi de ave inoculada com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)



A: Cerebelo: região de córtex cerebelar com área focalmente extensa de necrose (setas), HE, objetiva 10x. **B:** Cerebelo: imagem anterior aproximada evidenciando infiltrado inflamatório margeando as áreas de necrose com microgliose intensa (setas). **C:** Cerebelo: imagem aproximada evidenciando infiltrado de macrófagos margeando as áreas de necrose e adjacente microgliose e gemistócitos (setas), HE, objetiva 40x. **D:** Cérebro: região de tronco com formação de mangitos perivascularres compostos por plasmócitos e macrófagos (setas) e neurópilo adjacente com gliose, HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dois casos de adrenalite foram classificados morfológicamente como histiocitários. Os dois casos de aerossaculite envolviam os sacos aéreos ao redor do pâncreas e dos rins, que microscopicamente estavam espessados por infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos (Figuras 28C e 28D).

Figura 28 – Imagens microscópicas das lesões na bolsa cloacal no 10º dpi e no saco aéreo no 8º dpi das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via intranasal na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (Grupo D)



A: Bolsa cloacal: entre os folículos linfoides área focalmente extensa de infiltrado inflamatório (setas), HE, objetiva 20x. **B:** Bolsa cloacal: imagem anterior aproximada evidenciando entre os folículos linfoides infiltrado de macrófagos (setas), HE, objetiva 40x. **C:** Saco aéreo: região subepitelial intensamente espessada por infiltrado inflamatório (setas), HE, objetiva 20x. **D:** Saco aéreo: imagem anterior aproximada evidenciando infiltrado inflamatório composto por macrófagos e linfócitos (setas), HE, objetiva 40x. Fonte: Elaborado pelo autor.

A quantificação e intensidades das lesões nos diferentes grupos estão reunidos na Tabela 5. De modo geral, lesões moderadas a acentuadas no coração, intestino, fígado, baço, rim, pulmão, laringe, traqueia, medula óssea e bolsa cloacal foram encontradas entre o 5º e 10º dpi em todos os grupos de aves do experimento, com predomínio no grupo de infecção por via intranasal na dose $4,6 \times 10^8$ UFC/mL (grupo D) e oral na dose $4,7 \times 10^8$ UFC/mL (grupo B).

Tabela 5 – Intensidade das lesões nos diferentes órgãos das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e por via intranasal

Lesão	Classificação histológica	Grupo A				Grupo B				Grupo C				Grupo D			
		Intensidade			Total	Intensidade			Total	Intensidade			Total	Intensidade			Total
		D	M	A		D	M	A		D	M	A		D	M	A	
Hepatite	Fibrinonecrótica	3	5	5	13/34	10	7	9	26/27	5	10	13	28/34	6	8	21	35/35
Esplenite	Fibrinonecrótica	3	1	6	10/34	8	7	9	24/27	2	11	14	27/34	4	13	8	25/35
Pneumonia intersticial	Histiocitária	16	4	1	21/34	5	9	0	14/27	14	14	1	29/34	9	21	2	32/35
Miocardite	Necrótica/histiocitária	7	0	0	7/34	8	4	0	12/27	20	4	1	25/34	9	8	10	27/34
Jejunite	Transmural	0	0	0	0/34	0	0	0	0/27	0	0	0	0/34	2	0	0	2/35
	Não transmural	0	0	0	0/34	3	0	0	3/27	0	0	0	0/34	0	0	0	0/35
Ileíte	Transmural	0	0	0	0/34	2	1	0	3/27	0	0	0	0/34	1	2	5	8/35
	Não transmural	0	0	0	0/34	4	2	0	6/27	1	0	0	1/34	11	3	0	14/35
Tiflíte	Transmural	0	0	0	0/34	5	3	1	9/27	0	0	0	0/34	1	5	0	6/35
	Não transmural	2	1	0	3/34	8	1	1	10/27	11	1	0	12/34	14	9	0	23/35
Colite	Transmural	0	0	0	0/34	1	0	0	1/27	0	0	0	0/34	1	1	2	4/35
	Não transmural	0	0	0	0/34	4	1	0	5/27	2	0	0	2/34	3	1	0	4/35
Renal	Nefrite intersticial	0	0	0	0/34	1	0	0	1/27	5	1	0	6/34	7	2	1	10/35
	Trombose glomerular	4	0	1	5/34	8	4	1	13/27	9	3	8	20/34	3	5	4	12/35
	Glomerulonefrite	7	1	1	9/34	1	0	0	1/27	7	2	0	9/34	5	3	1	9/35
Mielite	Fibrinosa/histiocitária	3	0	0	3/20	8	1	0	9/17	3	1	3	7/29	15	2	10	27/31
Laringite	Histiocitária	1	0	0	1/33	2	0	2	4/26	3	0	0	3/34	6	2	11	19/35
Traqueíte	Histiocitária	0	0	0	0/34	0	0	1	1/26	1	0	0	1/34	2	0	2	4/35
Saculite*	Necrótica/histiocitária	0	1	5	6/34	3	3	0	6/27	0	1	7	7/34	0	5	17	22/35
Bursite	Necrótica/histiocitária	0	0	0	0/34	7	1	0	8/27	5	0	0	5/33	7	0	0	7/34
Encefalite	Necrótica/histiocitária	0	0	0	0/34	0	0	0	0/27	0	1	0	1/34	2	0	0	2/35
Adrenalite	Histiocitária	0	0	0	0/34	0	0	0	0/27	0	0	0	0/34	2	0	0	2/35
Aerossaculite	Linfocitocitária	0	0	0	0/34	0	0	0	0/27	0	0	0	0/34	1	0	1	2/35

Grupo A: inoculação via oral 10⁵ UFC/mLGrupo D: inoculação via intranasal 10⁸ UFC/mL

Fonte: Elaborado pelo autor.

Grupo B: inoculação via oral 10⁸ UFC/mL

Intensidade: D = discreta, M = moderada e A = acentuada

Grupo C: inoculação via intranasal 10⁵ UFC/mL

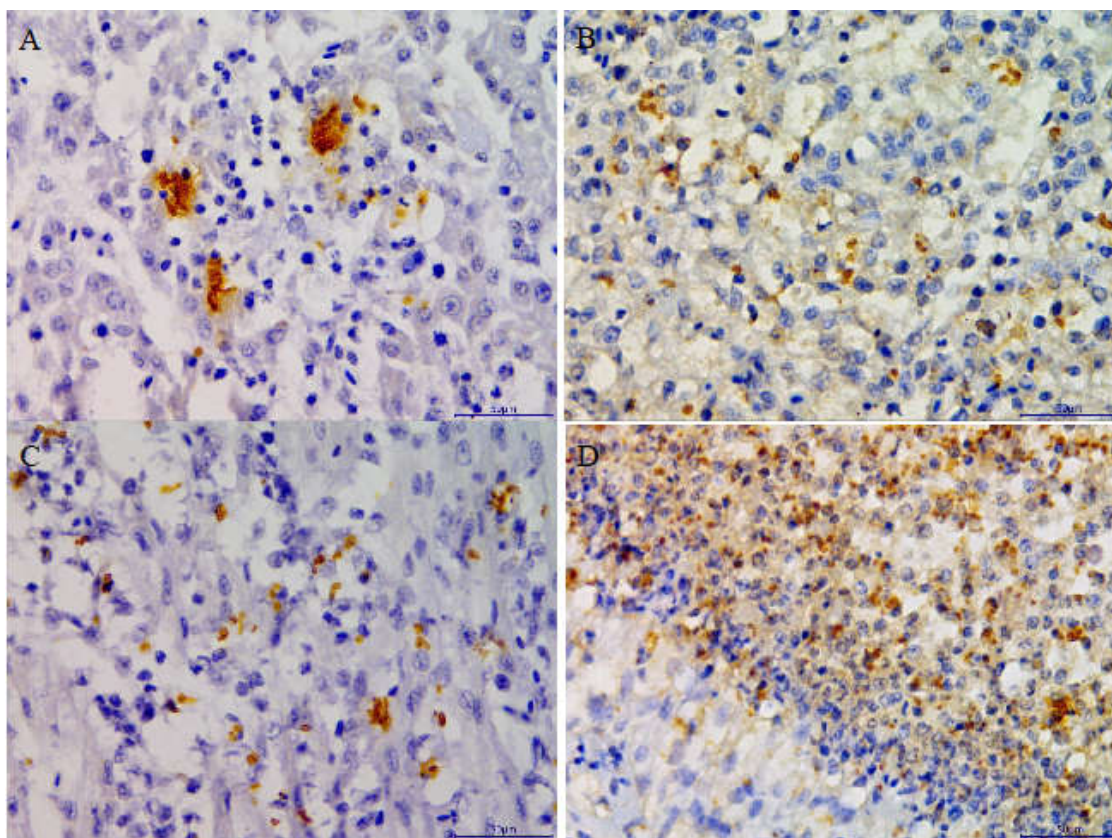
* Inflamação do saco da gema

4.2.4 Imuno-histoquímica anti-*Salmonella*

Por meio da imuno-histoquímica (IHQ) foi possível marcar *in situ* a bactéria nas áreas de lesões nos diferentes órgãos acometidos. Os casos positivos estão quantificados e separados entre os diferentes grupos nas tabelas 3 e 4, já apresentadas.

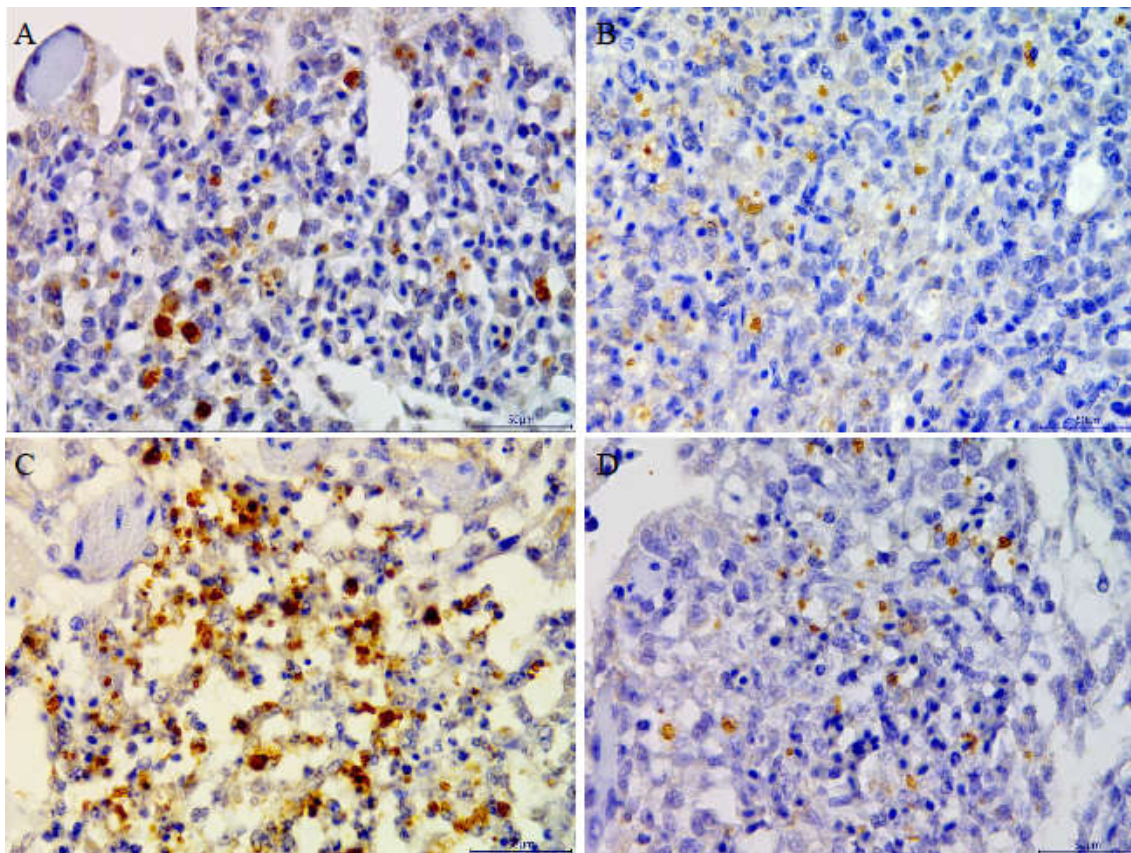
Em todos os órgãos com lesões intensas ou moderadas houve imunomarcação para *Salmonella*. Nos diferentes órgãos, a marcação foi encontrada principalmente no citoplasma de macrófagos ou livre nas áreas de lesão (Figuras 29, 30, 31, 32 e 33). Especificamente para as lesões renais, houve marcação para o agente em macrófagos no interstício e no citoplasma de células no tufo glomerular (Figuras 34A e 34B). Em alguns casos também houve marcação para a bactéria no citoplasma de monócitos/macrófagos intravasculares no pulmão e nos rins (Figura 34C). Nas lesões intestinais, a marcação estava presente em todas as regiões acometidas – lâmina própria, submucosa, camada muscular, serosa e mesentério (Figura 35).

Figura 29 – Imagens imuno-histoquímicas de múltiplos tecidos das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e intranasal



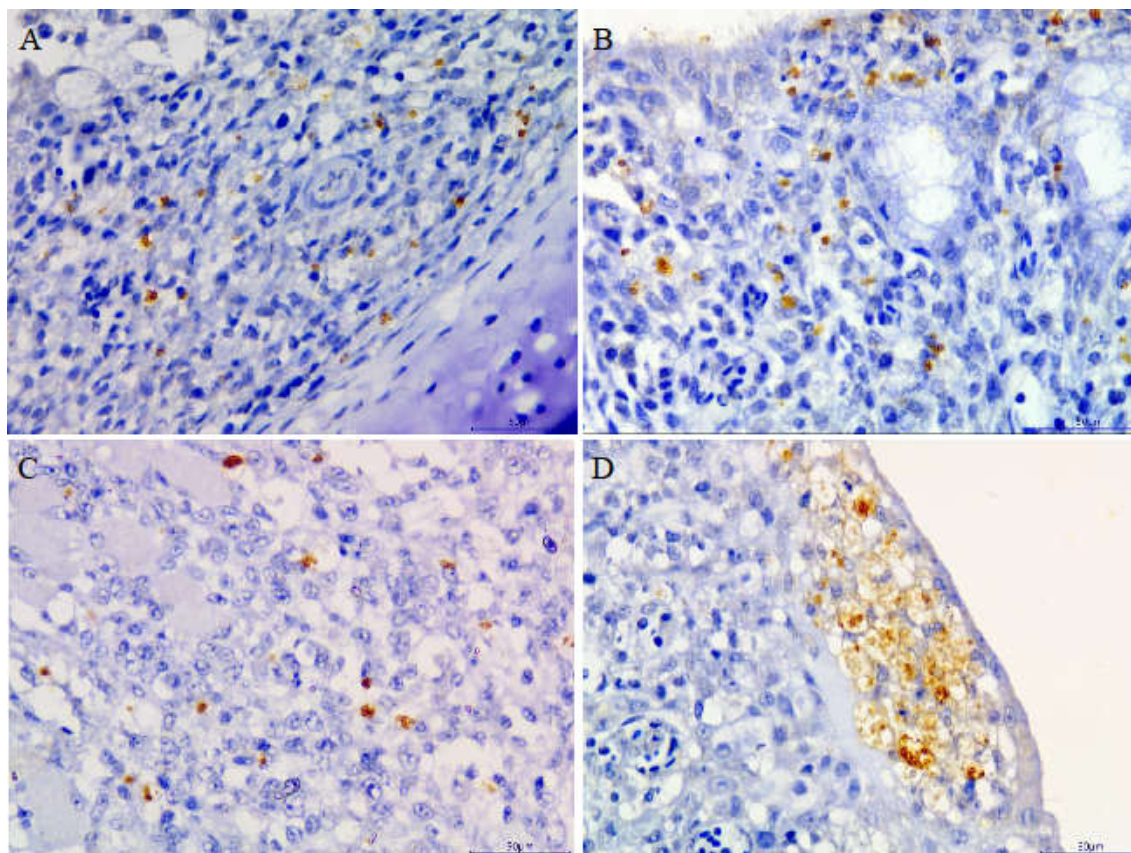
A: Fígado: marcação marrom no citoplasma de macrófagos e livres na área com lesão. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **B:** Baço: área elipsoide com marcação marrom no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **C:** Coração: marcação marrom no citoplasma de macrófagos entremeados às fibras cardíacas. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **D:** Saco da gema: marcação marrom no citoplasma de macrófagos da parede e no lúmen. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 – Imagens imuno-histoquímicas dos pulmões das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e intranasal



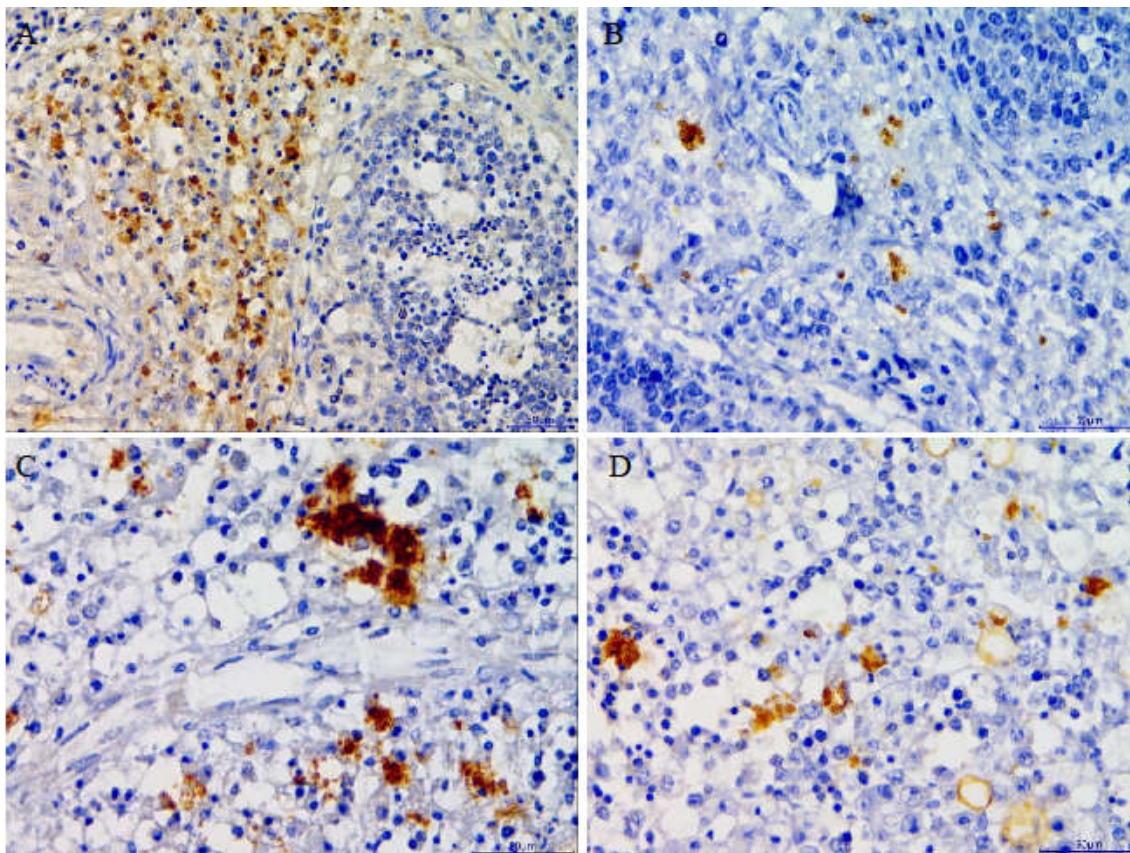
A: Pulmão: interstício com marcação marrom no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **B:** Pulmão: região entre os lóbulos com marcação marrom no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **C:** Pulmão: interior de parabrônquio com marcação marrom no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **D:** Pulmão: interstício com marcação marrom no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 – Imagens imuno-histoquímicas da laringe das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e intranasal



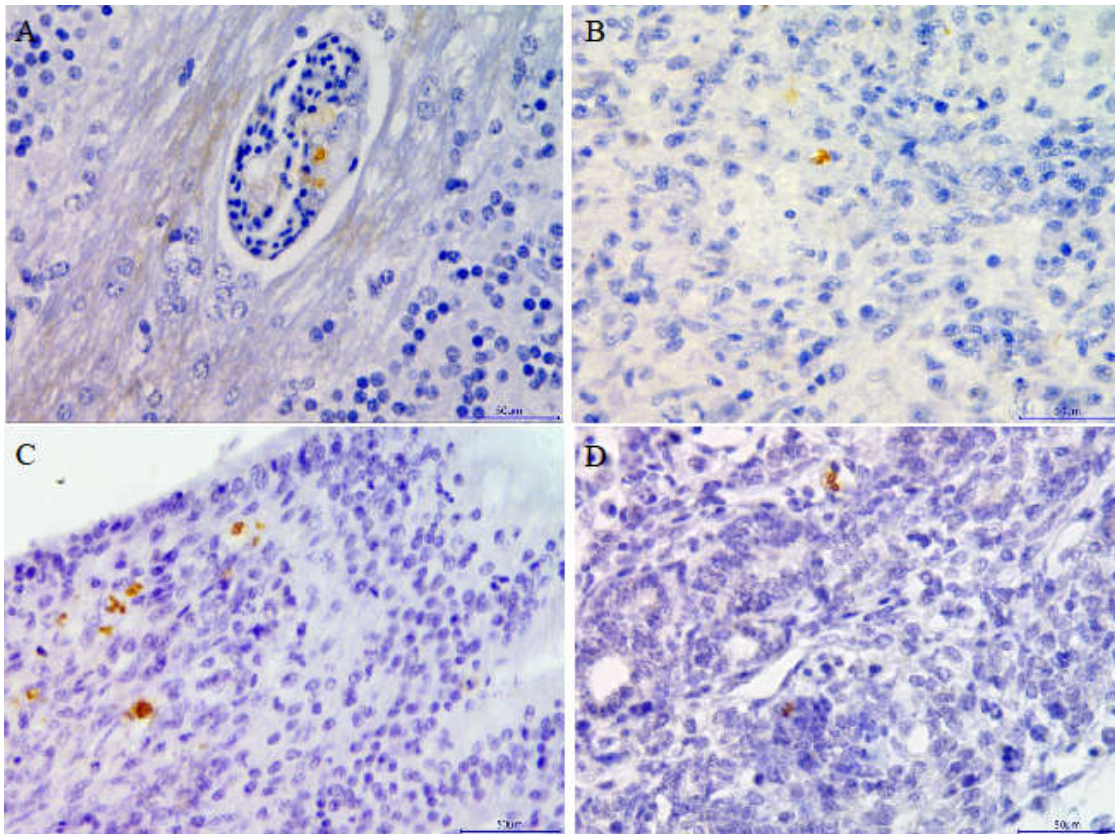
A: Laringe: lâmina própria com marcação marrom no citoplasma de macrófagos no interstício. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **B:** Laringe: lâmina própria e região subepitelial com marcação marrom no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **C:** Laringe: camada muscular com marcação marrom no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **D:** Laringe: marcação marrom no citoplasma de macrófagos intraepiteliais. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 – Imagens imuno-histoquímicas da bolsa cloacal e da medula óssea das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e intranasal



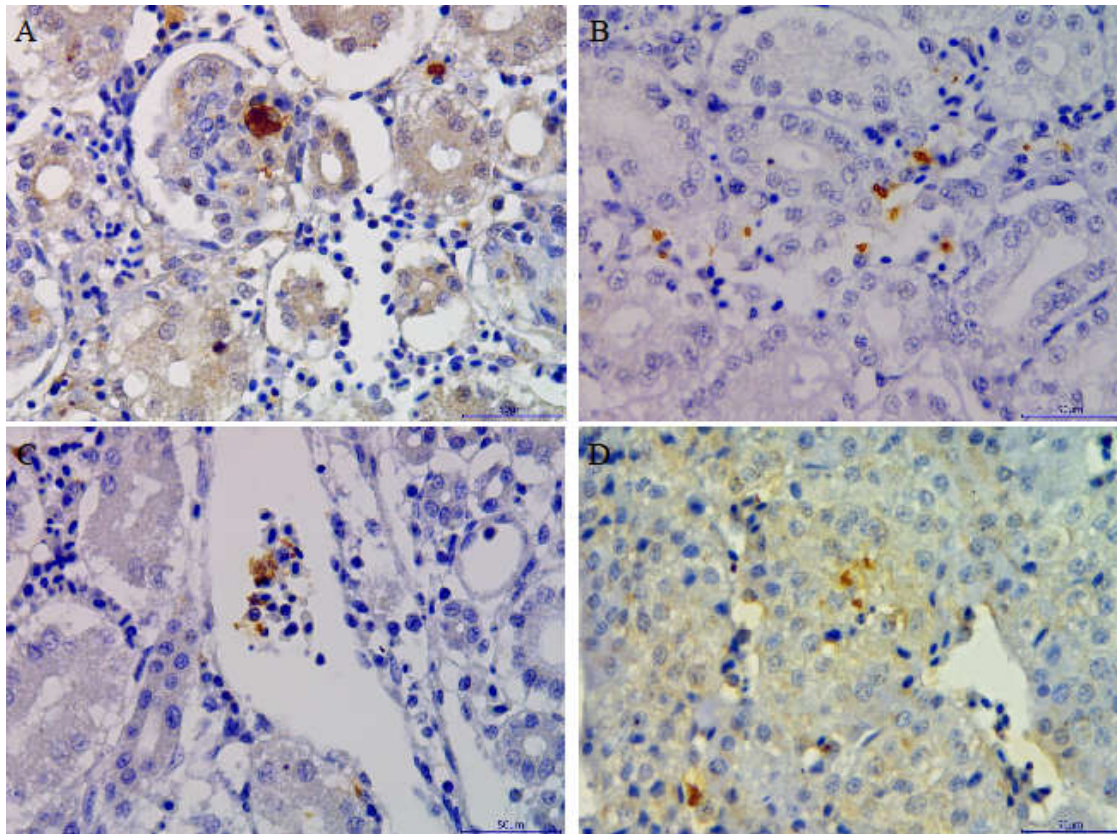
A e B: Bolsa cloacal: marcação marrom no citoplasma de macrófagos entre os folículos linfoides. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **C e D:** Medula óssea: marcação marrom no citoplasma de macrófagos ou livres nas áreas de lesão. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33 – Imagens imuno-histoquímicas de múltiplos órgãos das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e intranasal



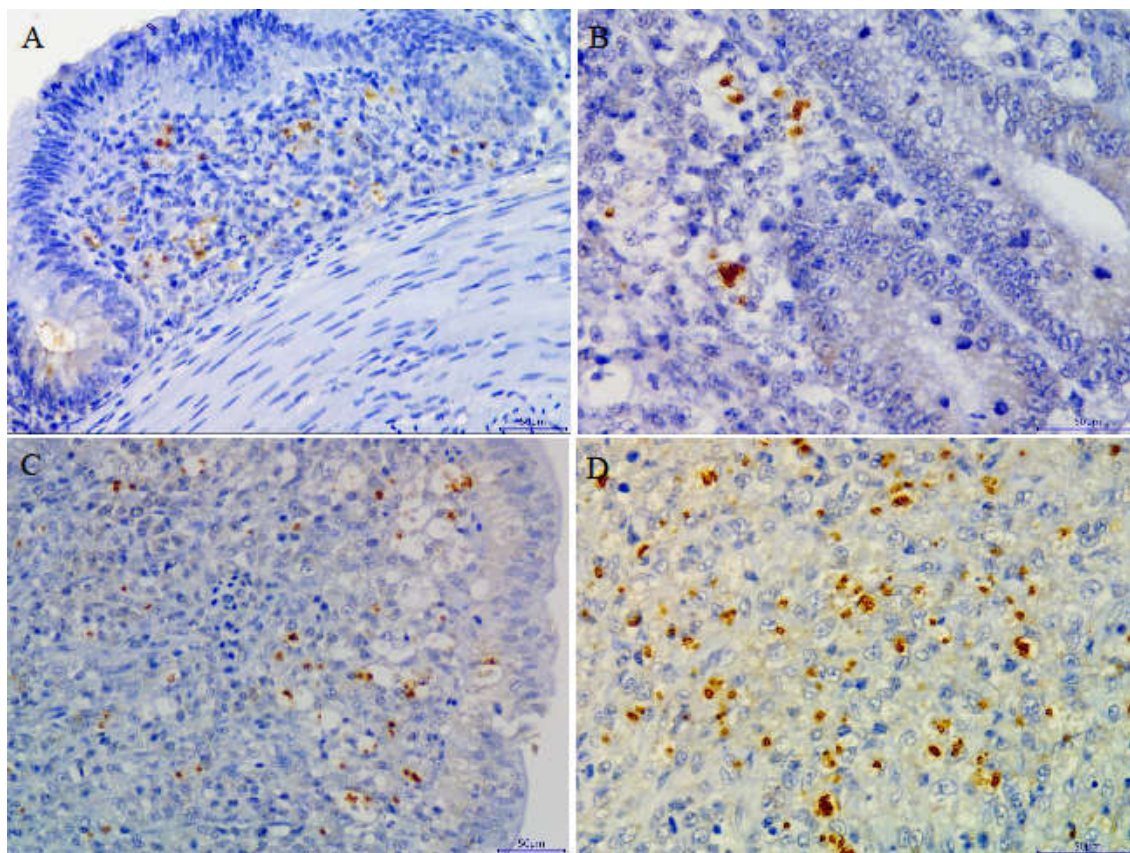
A: Encéfalo: marcação isolada e focal no citoplasma de macrófago na parede vascular. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **B:** Encéfalo: área focal de marcação na região de inflamação. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **C:** Duodeno: lâmina própria com marcação marrom no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **D:** Testículo: marcação focal e isolada no citoplasma de macrófago no interstício. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 34 – Imagens imuno-histoquímicas dos rins e da adrenal das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e intranasal



A: Rim: marcação focal no tufo glomerular e citoplasma de macrófago no interstício. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **B:** Rim: marcação discreta no citoplasma de macrófagos no interstício. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **C:** Rim: espaço intravascular com marcação discreta no citoplasma de monócito. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **D:** Adrenal: marcação focal e discreta no parênquima. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 – Imagens imuno-histoquímicas do intestino das aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e intranasal



A: Ceco: lâmina própria com marcação moderada no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **B:** Íleo: lâmina própria na região de criptas com marcação discreta no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x. **C:** Íleo: região subepitelial e lâmina própria com marcação moderada no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 40x. **D:** Cólon: camada muscular com marcação intensa no citoplasma de macrófagos. Anti-*Salmonella*, DAB, objetiva 60x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em alguns casos com lesões discretas e focais, após o recorte, não foi mais possível obter corte com a área de lesão e, conseqüentemente, não foi possível obter a marcação do agente na lesão. Nos baços das aves do grupo C e nos baços e fígados das aves do grupo A com resultado negativo na contagem bacteriológica, o resultado também foi negativo pela imuno-histoquímica. Órgãos como pâncreas, duodeno e testículo não apresentaram lesões histológicas (Figuras 33C e 33D). No entanto, após a realização da imuno-histoquímica, em raros casos observou-se marcação discreta da bactéria no citoplasma de macrófagos ocasionais no parênquima desses órgãos.

4.2.5 Bacteriologia

A média das contagens bacterianas em fígado e baço foram maiores nos grupos de inoculação por via intranasal e na dose 10^8 UFC/mL. Os resultados das contagens das colônias bacterianas em placa estão resumidos nas tabelas 6 e 7 a seguir:

Tabela 6 – Resultado da contagem bacteriana em Log_{10} UFC/mL no 3º, 5º e 6º dpi de aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e por via intranasal

Grupo	3º dpi			5º dpi			6º dpi		
	Animal	Fígado	Baço	Animal	Fígado	Baço	Animal	Fígado	Baço
A	A1	N	(-)	A1	7,41	7,96	A1	(-)	(-)
	A2	N	(-)	A2	N	N	A2	(-)	(-)
	A3	N	(-)	A3	7,38	6,93	A3	(-)	(-)
B	B1	5,25	(-)	B1	7,66	7,15	B1	7,06	6,38
	B2	5,04	(-)	B2	7,18	6,08	B2	7,23	6,93
	B3	6,68	(-)	B3	6,28	5,41	B3	7,79	5,60
C	C1	N (+)	(-)	C1	7,88	7,68	C1	(-)	(-)
	C2	N (+)	(-)	C2	7,81	7,71	C2	(-)	(-)
	C3	N (+)	(-)	C3	7,53	7,15	C3	(-)	(-)
D	D1	5,30	(-)	D1	7,13	6,20	D1	(-)	(-)
	D2	6,34	(-)	D2	7,37	6,66	D2	(-)	(-)
	D3	5,68	(-)	D3	7,42	6,93	D3	(-)	(-)

A: inoculação via oral 10^5 UFC/mL

B: inoculação via oral 10^8 UFC/mL

C: inoculação via intranasal 10^5 UFC/mL

D: inoculação via intranasal 10^8 UFC/mL

dpi = dia(s) pós-inoculação

(-) = amostra sem realização da bacteriologia

N = amostra negativa na contagem e após o enriquecimento

N (+) = amostra negativa na contagem e positiva após enriquecimento

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 – Resultado da contagem bacteriana em Log_{10} UFC/mL no 7º, 9º e 12º dpi de aves inoculadas com *Salmonella Gallinarum* por via oral e por via intranasal

Grupo	7º dpi			9º dpi			12º dpi		
	Animal	Fígado	Baço	Animal	Fígado	Baço	Animal	Fígado	Baço
A	A1	7,23	6,32	A1	N	N	A1	N	N
	A2	N	N	A2	N	N	A2	N	N
	A3	N	N	A3	N	N	A3	N	N
C	C1	4,95	3,97	C1	5,60	4,26	(-)	(-)	(-)
	C2	7,76	7,19	C2	5,11	4,38	(-)	(-)	(-)
	C3	6,75	5,53	C3	N	N	(-)	(-)	(-)
D	D1	5,09	4,64	D1	5,59	4,12	(-)	(-)	(-)
	D2	6,26	5,31	D2	4,76	4,72	(-)	(-)	(-)
	D3	6,16	5,21	D3	4,73	3,91	(-)	(-)	(-)

A: inoculação via oral 10^5 UFC/mL

C: inoculação via intranasal 10^5 UFC/mL

D: inoculação via intranasal 10^8 UFC/mL

dpi = dia(s) pós-inoculação

N = amostra negativa na contagem e após o enriquecimento

(-) = amostra sem realização da bacteriologia

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.6 Análise estatística

Sobre a via de inoculação, houve efeito sobre a chance de ocorrência das seguintes lesões: hepatite, miocardite, trombos glomerulares, pneumonia, tiflíte e esplenite, ou seja, a modificação da dose de infecção (dose maior) aumentou a chance de aparecimento de laringite, ileíte, tiflíte, mielite e saculite. Houve efeito da interação entre via de inoculação e dose para as lesões do tipo trombos glomerulares, tiflíte e esplenite, para as quais a dose maior e a via intranasal foram determinantes para a ocorrência das lesões. Na tabela 8 estão demonstradas as razões de chances dessas avaliações com efeito significativo. E no apêndice A estão reunidas todas as avaliações das lesões histológicas.

Tabela 8 – Resultados da análise estatística para razão de chance de ocorrência das lesões histológicas com efeito significativo

Lesão	Variável	Efeito	Razão de chances	IC 95%	p-valor
Hepatite	Via (Oral)	-1,65	0,191	0,001 – 0,244	0,005
Miocardite	Via (Oral)	-3,05	0,047	0,005 – 0,242	0,001
Trombos glomerulares	Via (Oral)	-1,88	0,151	0,035 – 0,557	0,006
	Via x Dose (Oral: 10 ⁸)	1,94	7,019	1,159 – 46,296	0,037
Laringite	Dose (10 ⁸)	2,68	14,697	3,632 – 83,043	<0,001
Pneumonia	Via (Oral)	-3,76	0,023	0,001 – 0,248	0,006
Ileíte	Dose (10 ⁸)	4,31	75,168	7,349 – 768,816	<0,001
	Via (Oral)	-1,71	0,017	0,031 – 0,763	0,029
Tiflíte	Dose (10 ⁸)	1,79	6,034	1,864 – 22,143	0,004
	Via x Dose (Oral: 10 ⁸)	2,39	10,913	1,535 – 95,002	0,021
Esplenite	Via (Oral)	-2,50	0,082	0,017 – 0,320	<0,001
	Via x Dose (Oral: 10 ⁸)	4,09	59,805	4,576 – 1830,004	0,004
Mielite óssea	Dose (10 ⁸)	3,55	35,130	7,824 – 220,468	<0,001
Saculite	Dose (10 ⁸)	2,52	12,505	3,380 – 56,546	<0,001

Para o número de segmentos de intestino afetados, espera-se maior acometimento de segmentos do intestino nas aves de inoculação por via intranasal (mediana = 1, valor mínimo = 0 e valor máximo = 3), quando comparada com a via oral (mediana = 0, valor mínimo = 0 e valor máximo = 4) (p-valor <0,01). Há, também, maior acometimento de segmentos de intestino nas aves de inoculação na dose 10⁸ UFC/mL (mediana = 2, valor mínimo = 0 e valor máximo = 4) quando comparada com a dose 10⁵ UFC/mL (mediana = 0, valor mínimo = 0 e valor máximo = 2) (p-valor <0,01).

Com relação ao número de órgãos acometidos durante a infecção, espera-se maior acometimento de órgãos nas aves de inoculação por via intranasal (mediana = 6, valor mínimo = 0 e valor máximo = 13), quando comparada com a via oral (mediana = 4, valor mínimo = 0 e valor máximo = 8) (p-valor <0,01). Pela dose de inoculação, espera-se maior acometimento de órgãos nas aves de inoculação na dose 10^8 UFC/mL (mediana = 6, valor mínimo = 2 e valor máximo = 13), quando comparada com a dose 10^5 UFC/mL (mediana = 4, valor mínimo = 0 e valor máximo = 9) (p-valor <0,01).

Para os resultados bacteriológicos, com relação à contagem no fígado, há maior contagem na via de inoculação nasal (média = 4,34 e desvio padrão = 0,646) do que a via oral (média = 1,73 e desvio padrão = 0,556) (p-valor <0,05). Para a dose de inoculação, há maior contagem na dose de inoculação de 10^8 UFC/mL (média = 6,04 e desvio padrão = 0,773) do que na dose 10^5 UFC/mL (média = 1,73 e desvio padrão = 0,556) (p-valor <0,01). Espera-se maior contagem bacteriana no fígado, quando há aumento da dose ao utilizar a via oral (dose 10^5 média = 1,73 e desvio padrão = 0,556/ dose 10^8 média = 6,04 e desvio padrão = 0,773), mas para a via intranasal não (dose 10^5 média = 4,34 e desvio padrão = 0,646/ dose 10^8 média = 5,88 e desvio padrão = 0,646) (p-valor <0,05).

Para contagem bacteriana no baço, há maior contagem na via de inoculação nasal (média = 5,29 e desvio padrão = 0,563) do que a via oral (média = 3,25 e desvio padrão = 0,472) (p-valor <0,05). Para a dose de inoculação, há maior contagem na dose de inoculação de 10^8 UFC/mL (média = 4,72 e desvio padrão = 0,542) do que na dose 10^5 UFC/mL (média = 3,82 e desvio padrão = 0,496) (p-valor <0,01).

5 DISCUSSÃO

Com base nos achados macroscópicos, histológicos e imuno-histoquímicos foi possível realizar a reprodução experimental das lesões encontradas no surto natural. Lesões não descritas no surto natural e não documentadas na literatura também foram visualizadas nas aves experimentalmente infectadas por *Salmonella Gallinarum*. Além disso, a inoculação por via intranasal mostrou-se mais efetiva na reprodução sistêmica do tifo aviário quando comparada à via oral, pois afetou um número maior e diferente de órgãos, incluindo diferentes segmentos do intestino. Esses achados foram confirmados com base nas lesões histológicas encontradas após a infecção experimental das aves e por marcação *in situ* da bactéria por meio da técnica de imuno-histoquímica.

O tifo aviário é mais comumente relatado em aves adultas. No entanto, surtos em aves jovens nos primeiros dias de vida são cada vez mais frequentes. Nesses casos, o principal fator

envolvido está relacionado a falhas de manejo e biossegurança nas granjas, diretamente relacionadas ao aumento na demanda da produção (De Carli *et al.*, 2017). Apesar disso, não há transmissão vertical do agente, uma vez que, para salmonelas aviárias, esse tipo de transmissão ocorre apenas com *Salmonella Pullorum* (Berchieri Júnior *et al.*, 2000). Nesses casos, muitas vezes ocorre uma pseudotransmissão vertical, na qual ovos são contaminados no momento da postura através do contato com a cloaca da ave infectada, e a bactéria pode permanecer viável na superfície da casca desses ovos no período de incubação (Berchieri Júnior *et al.*, 2001).

Em um estudo realizado no Brasil, os autores constataram que, nos ovos contaminados naturalmente, a bactéria pode permanecer viável na gema e/ou câmara de ar e até mesmo passar para outros ovos após ter a casca trincada na incubadora. Embora esses ovos não eclodam, materiais como albúmen, casca e gema servem como uma fonte de contaminação na incubadora para os pintinhos recém-eclodidos (Celis-Estupiñan *et al.*, 2017). No surto natural do presente estudo, a apresentação clínica da doença ocorreu em aves aos cinco dias de idade, sendo possível que o momento da infecção nessas aves tenha ocorrido ainda no incubatório.

Comparado a outros sorovares do gênero *Salmonella*, estudos com *Salmonella Gallinarum* (incluindo biovar *Pullorum* e *Gallinarum*), ainda são insuficientes e não respondem todas as questões sobre a doença (Zhou, 2022). Estudos experimentais frequentemente utilizam a via oral como forma de infecção, enquanto que a via respiratória é pouco estudada e descrita. O primeiro experimento que realizou infecção por *Salmonella Gallinarum* por via respiratória foi documentado em 2008. Nesse estudo, as aves foram inoculadas por via intratraqueal e apresentaram maiores taxas de morbidade e mortalidade quando comparadas ao grupo de inoculação por via oral (Basnet *et al.*, 2008). A infecção por *Salmonella* por via respiratória através da inalação de aerossóis pode acontecer em ambientes como o incubatório e até mesmo em galpões. No incubatório, a poeira e os aerossóis gerados a partir de ovos contaminados são fatores de risco para infecção de pintinhos por esta via, e nos galpões, o fluxo de ar e partículas de poeira geradas a partir de cama contaminada são determinantes para infecção em aves adultas (Kallapura *et al.*, 2014). Em um estudo experimental, constatou-se que a patogenicidade da infecção por *Salmonella Pullorum* através de aerossóis é dose dependente (Cheng *et al.*, 2020). No presente trabalho, pôde-se constatar a relação entre dose e o aumento de chances na ocorrência de lesões incomuns como laringite, ileíte, tiflíte, mielite óssea e inflamação do saco da gema. Ainda, o acometimento maior de órgãos e segmentos do intestino durante a infecção são dose e via dependentes.

Contudo, a interação entre infecção e progressão da doença pela via respiratória ainda é pouco conhecida. Acredita-se que, em pintinhos, a infecção por via respiratória ocorra mais

facilmente devido à imaturidade do tecido linfoide respiratório quando comparado ao tecido linfoide gastrointestinal (Kallapura *et al.*, 2014). Nesses casos, a hipótese sugerida é que a *Salmonella* penetre nas células epiteliais da mucosa na região do tecido linfoide associado aos brônquios (BALT), seios paranasais ou narina, infecte as células no tecido linfoide, e posteriormente, migre para a via sistêmica causando as mesmas lesões da via oral (Basnet *et al.*, 2008; Kallapura *et al.*, 2014). No presente experimento, tanto pela via intranasal quanto pela via oral houve a reprodução sistêmica da doença, no entanto, quando a bactéria foi inoculada pela intranasal, a doença foi reproduzida com maior patogenicidade, pois acometeu um número maior de órgãos e segmentos do intestino quando comparado à via oral. Além disso, pôde-se constatar maior probabilidade na ocorrência de lesões como hepatite, miocardite, trombos glomerulares, pneumonia, tiflíte e esplenite pela via intranasal, bem como contagem bacteriana maior no fígado e no baço.

Em estudos de infecção experimental que utilizaram a via respiratória, as alterações pulmonares foram caracterizadas por um quadro de pneumonia intersticial com o acometimento dos capilares aéreos por infiltrado inflamatório (não especificado), indicando assim um envolvimento da via sistêmica na patogênese da lesão (Basnet *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2020; Shivaprasad 2000). No presente estudo, todos os grupos (VO e VI) desenvolveram lesões pulmonares caracterizadas por pneumonia intersticial predominantemente histiocitária, afetando diversas regiões do pulmão (capilares aéreos, septos interlobulares e região subpleural). Esses achados confirmam o envolvimento da via sistêmica de infecção na patogênese da lesão pulmonar. Em apenas em uma ave do grupo A, no 5º dpi, ocorreu broncopneumonia e nesse caso, acredita-se que houve uma extensão do processo inflamatório primário intersticial para o interior dos parabrônquios e brônquios.

Lesões no sistema respiratório constaram também de laringite e traqueíte, lesões essas descritas pela primeira vez na literatura em infecções por *Salmonella Gallinarum* em pintinhos. Lesões em laringe e traqueia não foram encontradas em estudos com sorovares de *Salmonella* da subespécie *enterica*, mesmo em outras espécies animais. Excepcionalmente, em duas serpentes infectadas naturalmente pela subespécie *arizonae*, lesão similar foi relatada (Orós *et al.*, 1996). Embora os achados tenham sido predominantes no grupo D de inoculação intranasal na dose maior, houve também casos nos grupos de inoculação por via oral e intranasal na dose menor, o que sugere que lesões de laringe e traqueia também são importantes na patogênese da salmonelose sistêmica em aves. Os achados foram atribuídos a infecção por *Salmonella Gallinarum* por meio da marcação *in situ* do agente na área da lesão.

Como diagnósticos diferenciais para as lesões na laringe e traqueia devem ser consideradas a infecção por *Mycoplasma gallisepticum* ou vírus da bronquite infecciosa das galinhas. No entanto, na presente investigação, não havia perda de cílios, necrose epitelial e o infiltrado inflamatório era predominantemente histiocitário. Além disso, houve também inflamação da camada muscular do esôfago na porção cranial adjacente a laringe. Possivelmente nestes casos houve uma extensão do processo inflamatório da laringe, uma vez que a lesão estava presente somente em casos de laringite transmural.

Na infecção por via oral, *Salmonella Pullorum* e *Gallinarum* atingem o intestino, ultrapassam as células epiteliais, principalmente da região da tonsila cecal, infectam o tecido linfóide e rapidamente migram para a circulação sistêmica, multiplicando-se em órgãos como fígado e baço (Barrow; Freitas Neto, 2011). No entanto, colonização e permanência no intestino por esses agentes não ocorrem, uma vez que essas bactérias possuem mudanças genéticas que não favorecem sua multiplicação e competição com a microbiota intestinal; dentre os fatores envolvidos, destaca-se a perda da função da SPI-1 e 3 na patogênese da doença e perda de algumas vias metabólicas (Barrow; Freitas Neto, 2011; Chappell *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a ausência de flagelo e, conseqüentemente, dos antígenos flagelares produz uma baixa resposta inflamatória intestinal no momento da infecção (Barrow; Freitas Neto, 2011). Somada a esses fatores, há também a baixa produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e IFN- γ nas fases iniciais da infecção por *Salmonella Gallinarum* (Ojima *et al.*, 2021). Com isso, quadros de enterite em pintinhos relacionados a infecção por *Salmonella Pullorum* e *Gallinarum* em aves são incomuns e, quando descritos, são restritos a estudos experimentais (Henderson; Bounous; Lee, 1999; Ojima *et al.*, 2021).

Shivaprasad (2000) relatou que, em estágios crônicos da infecção no ceco, pode haver infiltrado inflamatório composto por heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos que se infiltram até a camada muscular. No experimento definitivo, bem como no surto natural e experimento piloto do presente estudo, enterite com acometimento de diversas porções do intestino, principalmente ceco e íleo foram encontrados. No experimento definitivo houve enterite em todos os grupos, com destaque para o grupo de via oral e intranasal na dose maior do inóculo (grupos B e D). Essas aves desenvolveram enterite nas fases iniciais da infecção, no 3º dpi. Além disso, por meio da imuno-histoquímica foi possível observar a presença da bactéria em todas as camadas intestinais acometidas ao decorrer da infecção. Possivelmente, há fatores envolvidos que contribuiriam para manifestação diferente nesse estudo, tais como diferenças na virulência da bactéria que incitaram maior capacidade de invasão ou resposta inflamatória do hospedeiro.

Durante o processo de bacteremia, *Salmonella Pullorum* e *Gallinarum* têm predileção por órgãos linfoides como baço, bolsa cloacal e medula óssea (Barrow; Freitas Neto, 2011). Apesar das lesões esplênicas serem frequentemente encontradas e descritas em surtos naturais e experimentais, lesões na bolsa cloacal e medula óssea são raramente documentadas. Em um estudo experimental após a infecção de aves aos 40 dias de vida por *Salmonella Pullorum*, foram relatadas lesões na bolsa cloacal no 2º dia pós-inoculação caracterizadas por infiltrado de macrófagos e heterófilos entre os folículos linfoides com depleção linfóide e, no 4º dia, necrose dos folículos foi observada e associada à presença da bactéria por meio da imuno-histoquímica. Os autores desse estudo ainda concluíram que a disseminação sistêmica a partir da bolsa cloacal é possível sem ocorrer invasão intestinal prévia (Henderson; Bounous; Lee, 1999). Lesões semelhantes na bolsa cloacal também são descritas em perus de um dia e dois meses de vida após infecção experimental por *Salmonella Gallinarum* (Beyaz *et al.*, 2010). No presente experimento, as lesões na bolsa cloacal causadas pela *Salmonella Gallinarum* em pintinhos são as primeiras descritas na literatura, reproduzidas por via oral e intranasal.

O isolamento de *Salmonella* em amostras da medula óssea de aves infectadas pode ser obtido (Molenaar *et al.*, 2024). Há, também, descrição da marcação *in situ* desse agente por meio de imuno-histoquímica na medula óssea de codornas acometidas por *Salmonella Gallinarum* em um surto espontâneo (Casagrande *et al.*, 2014). Contudo, não há descrições de lesões histológicas na medula óssea decorrente da infecção por *Salmonella Gallinarum*. No presente trabalho, as lesões encontradas na medula óssea foram atribuídas à ação direta do agente e confirmadas por meio da imuno-histoquímica.

Durante a progressão da infecção por *Salmonella*, sepse e anemia são achados frequentes (Chappell *et al.*, 2009). Anemia é atribuída a um quadro de hemólise extravascular (Smith, 1955). Nesses casos, ocorre uma destruição das hemácias pela fagocitose por células do sistema monócito-macrófago, principalmente no fígado pela opsonização das hemácias devido à ação dos antígenos bacterianos (Assoku; Penhale, 1978). Com isso, o achado de eritrofagocitose em algumas aves é justificável pelo quadro septicêmico e hemolítico causado pela infecção por *Salmonella Gallinarum*.

Outros achados relacionados à sepse são os quadros hemorrágicos encontrados nas fases agudas da infecção, principalmente no intestino (Chappell *et al.*, 2009). No presente experimento, as múltiplas hemorragias encontradas macroscopicamente e microscopicamente em órgãos como pulmões, rins e intestino, principalmente nas aves que morreram naturalmente, foram atribuídas à sepse. Esses achados são corroborados pela marcação da bactéria no citoplasma de monócitos em vasos do pulmão e rins pela imuno-histoquímica.

Lesões renais, quando descritas na infecção por *Salmonella Gallinarum*, são caracterizadas principalmente por nefrite intersticial (Freitas Neto *et al.*, 2007). No entanto, não há descrições de alterações glomerulares em aves sendo causadas por esse agente. O quadro de trombose glomerular e glomerulonefrite foram relacionados ao processo de sepse, sendo que em algumas aves houve marcação do agente pela imuno-histoquímica em macrófagos presentes no tufo glomerular.

No presente experimento, microtrombos foram encontrados em vasos de órgãos como pulmão e rim. Acredita-se que, nesses casos, houve um dano vascular direto pela ação da bactéria associado a mudanças hemodinâmicas geradas no processo septicêmico. Alterações vasculares, como microtrombos em vasos de múltiplos órgãos, foram descritas em periquitos infectados naturalmente por *Salmonella Gallinarum* (Tunca *et al.*, 2012).

A inflamação do saco da gema, caracterizada por infiltrado histiocitário e heterofílico, também foi documentada previamente, frequentemente associada a quantidade intensa de *Salmonella* (Shivaprasad, 2000). O mais provável nesses casos é uma inflamação gerada pela migração da bactéria por via hematogênica, independentemente da via de inoculação, uma vez que no experimento a lesão estava presente em todos os grupos.

No presente experimento, outras lesões menos frequentes, como encefalite, aerossaculite e adrenalite foram atribuídas como consequência da infecção sistêmica e, embora incomuns, são possíveis de acontecer. No testículo não havia alterações histológicas em nenhuma das aves do estudo, no entanto, em quatro aves havia presença da bactéria em alguns macrófagos ocasionais no parênquima testicular. Esses achados sugerem a capacidade da bactéria de migrar para o sistema reprodutor e eventualmente causar lesões reprodutivas mesmo que em casos de *Salmonella Gallinarum* a via de transmissão vertical não ocorra.

6 CONCLUSÃO

A inoculação experimental em pintinhos com *Salmonella Gallinarum* possibilitou reproduzir lesões incomuns intestinais e respiratórias encontradas em um surto natural. Os achados foram reproduzidos independentemente da via de inoculação e associados a marcação *in situ* pela imuno-histoquímica. A recuperação da bactéria no fígado e baço também foi obtida pelo isolamento bacteriano. Contudo, constatou-se um quadro mais patogênico da doença nas aves que foram inoculadas pela via intranasal, o que torna essa via de inoculação importante na patogênese da doença tanto em infecções experimentais quanto em surtos naturais.

Destaca-se também a importância da avaliação sistemática dos órgãos na histopatologia em casos de surtos de *Salmonella*, uma vez que, pelo experimento, foi possível observar lesões em múltiplos órgãos, alguns ainda não relatados. Contudo, há também a necessidade de estudos, genômicos da bactéria utilizada no experimento (oriunda do surto natural) para entender melhor sua interação com o hospedeiro e tentar encontrar possíveis alterações genéticas ou mutações que justifiquem sua maior patogenicidade.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2019. São Paulo: ABPA, 2022.
- ASSOKU, R. K. G.; PENHALE, W. J. The anaemia in fowl typhoid: immuno-pathogenesis and associated patterns of erythrocyte destruction. *J Comp Pathol*, v. 88, n. 2, p. 219-236, 1978.
- BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid-new thoughts on old diseases: A review. *Avian Pathol*, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2011.
- BARROW, P. A.; JONES, M. A.; SMITH, A. L. *et al.* The long view: *Salmonella* – the last forty years. *Avian Pathol*, v. 41, n. 5, p. 413-420, 2012.
- BASNET, H. B.; KWON, H. J.; CHO, S. H. *et al.* Reproduction of fowl typhoid by respiratory challenge with *Salmonella Gallinarum*. *Avian Dis*, v. 52, n. 1, p. 156-159, 2008.
- BATISTA, D. F. A.; FREITAS NETO, O. C.; ALMEIDA, A. M. *et al.* Molecular identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by a duplex PCR assay. *J Vet Diagn Invest*, v. 28, n. 4, p. 419-422, 2016.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathol*, v. 30, n. 3, p. 221-231, 2001.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H.; PINHEIRO, L. A. S. *et al.* Experimental *Salmonella Gallinarum* infection in light laying hen lines. *Braz J Microbiol*, v. 31, n. 1, p. 50-52, 2000.
- BEYAZ, L.; ATASEVER, A.; AYDIN, F. *et al.* Pathological and clinical findings and tissue distribution of *Salmonella Gallinarum* infection in turkey poults. *Turk J Vet Anim Sci*, v. 34, n. 2, p. 101-110, 2010.
- BHUNIA, A. K. *Salmonella enterica*. In: BHUNIA, A. K. *Foodborne Microbial Pathogens*. New York: Springer, 2018. v. 27, p. 271-287. (Food Science Text Series).
- CASAGRANDE, R. A.; BARTH WOUTERS, A. T.; WOUTERS, F. *et al.* Fowl typhoid (*Salmonella Gallinarum*) outbreak in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Avian Dis*, v. 58, n. 3, p. 491-494, 2014.
- CELIS-ESTUPIÑAN, A. L. DEL P.; BATISTA, D. F. A.; CARDOZO, M. V. *et al.* Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil. *Avian Pathol*, v. 46, n. 4, p. 416-425, 2017.
- CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P. *et al.* The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 128, n. 1-3, p. 53-59, 2009.
- CHENG, Y.; SIHUA, Z.; LU, Q. *et al.* Evaluation of young chickens challenged with aerosolized *Salmonella Pullorum*. *Avian Pathol*, v. 49, n. 5, p. 507-514, 2020.
- COSTA, J. N. B. Estudo retrospectivo da ocorrência de Salmonelose no Brasil no período de 2000 a 2018. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2020.
- DAVIES, R.; BRESLIN, M. Observations on *Salmonella* contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis had been used. *Avian Pathol*, v. 33, n. 2, p. 133-144, 2004.

- DE CARLI, S.; GRÄF, T.; KIPPER, D. *et al.* Molecular and phylogenetic analyses of *Salmonella* Gallinarum trace the origin and diversification of recent outbreaks of fowl typhoid in poultry farms. *Vet Microbiol*, v. 212, p. 80-86, 2017.
- 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. *Appl Environ Microbiol*, v. 77, n. 12, p. 4136-4146, 2011.
- FREITAS NETO, O. C.; ARROYAVE, W.; ALESSI, A. C. *et al.* Infection of commercial laying hens with *Salmonella* Gallinarum: Clinical, anatomopathological and haematological studies. *Rev Bras Cienc Avic*, v. 9, n. 2, p. 133-141, 2007.
- FREITAS NETO, O. C.; PENHA FILHO, R. A. C.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R. L.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N. *et al.* (ed.). *Doenças das aves*. 3. ed. Campinas: FACTA, 2020. p. 495-516.
- GAST, R. K.; GUARD-BOULDIN, J.; GURAYA, R. *et al.* Effect of prior passage through laying hens on invasion of reproductive organs by *Salmonella* Enteritidis. *Int J Poult Sci*, v. 8, p. 116-121, 2009.
- GAST, R. K.; PORTER, R. E. *Salmonella* infections. In: SWAYNE, D. E.; BOULIANNE, M.; LOUGUE, C. M. *et al.* (ed.). *Diseases of Poultry*. 14th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2020. cap. 16, p. 719-753.
- GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's. *Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer, 2004. p. 114-124.
- GORHAM, S. L.; KADAVIL, K.; LAMBERT, H. *et al.* Persistence of *Salmonella* Enteritidis in young chickens. *Avian Pathol*, v. 20, n. 3, p. 433-437, 1991.
- HENDERSON, S. C.; BOUNOUS, D. I.; LEE, M. D. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. *Infect Immun*, v. 67, n. 7, p. 3580-3586, 1999.
- ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M. *et al.* Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014.
- JAJERE, S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*, v. 12, n. 4, p. 504-521, 2019.
- KALLAPURA, G.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; PUMFORD, N. R. *et al.* Evaluation of respiratory route as a viable portal of entry for *Salmonella* in poultry. *Vet Med Res Rep*, p. 59-73, 2014.
- KIPPER, D.; MASCITTI, A. K.; DE CARLI, S. *et al.* Emergence, dissemination and antimicrobial resistance of the main poultry-associated *Salmonella* serovars in Brazil. *Vet Sci*, v. 9, n. 8, p. 405, 2022.
- LANGRIDGE, G. C.; FOOKESA, M.; CONNOR, T. R. *et al.* Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 112, n. 3, p. 863-868, 2015.
- LEE, Y. J.; MO, I. P.; KANG, M. S. Protective efficacy of live *Salmonella* Gallinarum 9R vaccine in commercial layer flocks. *Avian Pathol*, v. 36, n. 6, p. 495-498, 2007.

LUNA, L. G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw Hill; 1968.

MAPA. Salmonelas. *Gov.br*, Brasília, 06 jan. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/salmonelas>. Acesso em: 09 mar. 2024.

MOLENAAR, R. J.; DIJKMAN, R.; TER VEEN, C. *et al.* A *Salmonella* Pullorum outbreak with neurological signs in adult layers and outbreak investigation using whole genome sequencing. *Avian Pathol*, v. 53, n. 1, p. 44-55, 2024.

OJIMA, S.; OKAMURA, M.; OSAWA, N. *et al.* Characteristics of systemic infection and host responses in chickens experimentally infected with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. *J Vet Med Sci*, v. 83, n. 7, p. 1147-1154, 2021.

OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, A. C. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. *Braz J Microbiol*, v. 36, n. 1, p. 51-56, 2005.

ORÓS, J.; RODRIGUEZ, J. L.; HERRÁEZ, P. *et al.* Respiratory and digestive lesions caused by *Salmonella arizonae* in two snakes. *J Comp Pathol*, v. 115, n. 2, p. 185-189, 1996.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org>.

SHIVAPRASAD, H.L.; BARROW, P. A. Pullorum disease and fowl typhoid. In: D. E. SWAYNE, J. R.; GLISSON, L. R.; MCDOUGALD, L. K. *et al.* (ed.). *Diseases of Poultry*. 13th ed. Ames: Iowa State Press, 2013. p. 678-693.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev Sci Tech*, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SMITH, H. W. The susceptibility of different breeds of chickens to experimental *Salmonella* Gallinarum infection. *Poult Sci*, v. 35, n. 3, p. 701-705, 1956.

SMITH, H. W. Observations on experimental fowl typhoid. *J Comp Pathol*, v. 65, p. 37-54, 1955.

TELLEZ, G.; HARGIS, B.; BIELKE, L. *et al.* Evaluation of respiratory route as a viable portal of entry for *Salmonella* in poultry. *Vet Med Res Rep*, v. 5, p. 59-73, 2014.

TUNCA, R.; TOPLU, N.; KIRKAN, Ş. *et al.* Pathomorphological, immunohistochemical and bacteriological findings in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) naturally infected with *Salmonella* Gallinarum. *Avian Pathol*, v. 41, n. 2, p. 203-209, 2012.

VOSS-RECH, D.; KRAMER, B.; SILVA, V. S. *et al.* Longitudinal study reveals persistent environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. *Vet Microbiol*, v. 233, p. 118-123, 2019.

WALES, A. D.; DAVIES, R. H. A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. *Avian Pathol*, v. 40, n. 5, p. 429-436, 2011.

ZANETTI, N. S.; CARLI, S.; SOUZA, M. N. *et al.* Molecular detection and characterization of *Salmonella* Gallinarum from poultry farms in Brazil. *J Appl Poult Res*, v. 28, n. 4, p. 1335-1341, 2019.

ZHOU, X.; KANG, X.; ZHOU, K.; YUE, M. A global dataset for prevalence of *Salmonella* Gallinarum between 1945 and 2021. *Sci Data*, v. 9, n. 1, p. 495, 2022.

APÊNDICE A – Resultados da análise estatística para razões de chances de todas as lesões histológicas nos grupos infectados com *Salmonella Gallinarum* nas doses 10⁵ UFC/mL e 10⁸ UFC/mL por via oral e por via intranasal

Lesão	Variável	Efeito	Razão de chances	IC 95%	p-valor
Hepatite	Via (Oral)	-1,65	0,191	0,001 – 0,244	0,005
	Dose (108)	36,65	>1000	<0,001 – >1000	0,994
	Via x Dose (Oral: 108)	-32,32	<0,001	<0,001 – >1000	0,995
Miocardite	Via (Oral)	-3,05	0,047	0,005 – 0,242	0,001
	Dose (108)	34,56	>1000	<0,001 – >1000	0,993
	Via x Dose (Oral: 108)	4460,66	<1000	<0,001 – >1000	0,994
Trombos glomerulares	Via (Oral)	-1,88	0,151	0,035 – 0,557	0,006
	Dose (108)	-0,65	0,520	0,152 – 1,719	0,284
	Via x Dose (Oral: 108)	1,94	7,019	1,159 – 46,296	0,037
Nefrite	Via (Oral)	-36,24	<0,001	<0,001 – >1000	0,994
	Dose (108)	0,64	1,898	0,381 – 10,075	0,432
	Via x Dose (Oral: 108)	34,71	>1000	<0,001 – >1000	0,995
Glomerulonefrite	Via (Oral)	-1,12	0,324	0,064 – 1,392	0,143
	Dose (108)	-0,43	0,647	0,156 – 2,570	0,538
	Via x Dose (Oral: 108)	0,67	1,957	0,056 – 42,771	0,674
Renal	Via (Oral)	-2,36	0,094	0,022 – 0,343	<0,001
	Dose (108)	-1,00	0,365	0,094 – 1,277	0,123
	Via x Dose (Oral: 108)	2,22	9,297	1,451 – 67,153	0,021
Laringite	Via (Oral)	-1,45	0,232	0,008 – 2,326	0,264
	Dose (108)	2,68	14,697	3,632 – 83,043	<0,001
	Via x Dose (Oral: 108)	0,35	1,431	0,008 – 50,758	0,812
Traqueíte	Via (Oral)	-18,52	<0,001	<0,001 – >1000	0,996
	Dose (108)	1,16	3,19	0,307 – 73,175	0,358
	Via x Dose (Oral: 108)	18,72	>1000	<0,001 – >1000	0,996
Pneumonia	Via (Oral)	-3,76	0,023	0,001 – 0,248	0,006
	Dose (108)	2,04	7,747	0,654 – 209,144	0,135
	Via x Dose (Oral: 108)	0,31	1,368	0,034 – 40,656	0,854
Jejunite transmural	Via (Oral)	0,82	2,282	0 – >1000	0,999
	Dose (108)	21,57	0,797	0 – >1000	0,998
	Via x Dose (Oral: 108)	-2,18	0,112	<0,001 – >1000	0,999
Jejunite não transmural	Via (Oral)	-0,25	0,777	0 – >1000	0,999
	Dose (108)	-0,27	0,756	0 – >1000	0,999
	Via x Dose (Oral: 108)	20,58	>1000	0 – >1000	0,998
Jejunite	Via (Oral)	0,81	2,259	<0,001 – >1000	0,996
	Dose (108)	20,48	>1000	<0,001 – >1000	0,999
	Via x Dose (Oral: 108)	18,15	>1000	<0,001 – >1000	0,998
Ileíte transmural	Via (Oral)	-0,44	0,637	<0,001 – >1,1000	0,999
	Dose (108)	20,21	>1000	<0,001 – >1000	0,996
	Via x Dose (Oral: 108)	1,16	3,20	<0,001 – >1000	0,99
Ileíte não transmural	Via (Oral)	-16,06	<0,001	<0,001 – >1000	0,993
	Dose (108)	3,31	27,494	4,323 – 555,167	0,003
	Via x Dose (Oral: 108)	14,77	>1000	<0,001 – >1000	0,993
	Via (Oral)	-31,23	<0,001	<0,001 – >1000	0,993

Ileíte	Dose (108)	4,31	75,168	7,349 – 768,816	<0,001
	Via x Dose (Oral: 108)	30,12	>1000	<0,001 – >1000	0,993
Tiflite transmural	Via (Oral)	-0,40	0,663	<0,001 – >1000	0,999
	Dose (108)	19,03	>1000	<0,001 – >1000	0,994
	Via x Dose (Oral: 108)	2,55	12,866	<0,001 – >1000	0,999
Tiflite não transmural	Via (Oral)	-1,69	0,184	0,032 – 0,786	0,032
	Dose (108)	1,91	6,820	2,061 – 25,966	0,002
	Via x Dose (Oral: 108)	0,94	2,572	0,364 – 21,627	0,358
Tiflite	Via (Oral)	-1,71	0,017	0,031 – 0,763	0,029
	Dose (108)	1,79	6,034	1,864 – 22,143	0,004
	Via x Dose (Oral: 108)	2,39	10,913	1,535 – 95,002	0,021
Colite transmural	Via (Oral)	-0,81	0,443	0 – >1000	0,997
	Dose (108)	21,24	>1000	0 – >1000	0,999
	Via x Dose (Oral: 108)	20,05	>1000	0 – >1000	0,999
Colite não transmural	Via (Oral)	-17,82	<0,001	<0,001 – >1000	0,994
	Dose (108)	0,52	1,688	0,228 – 15,478	0,609
	Via x Dose (Oral: 108)	19,50	>1000	<0,001 – >1000	0,994
Colite	Via (Oral)	-18,27	<1000	<0,001 – >1000	0,991
	Dose (108)	0,40	1,493	0,310 – 7,667	0,615
	Via x Dose (Oral: 108)	19,30	>1000	<0,001 – >1000	0,991
Esplenite	Via (Oral)	-2,50	0,082	0,017 – 0,320	<0,001
	Dose (108)	-0,16	0,849	0,187 – 3,748	0,826
	Via x Dose (Oral: 108)	4,09	59,805	4,576 – 1830,004	0,004
Bursite	Via (Oral)	-18,00	<0,001	<0,001 – >1000	0,992
	Dose (108)	0,40	1,493	0,347 – 6,554	0,584
	Via x Dose (Oral: 108)	19,49	>1000	<0,001 – >1000	0,991
Mielite	Via (Oral)	-0,52	0,590	0,083 – 3,269	0,561
	Dose (108)	3,55	35,130	7,824 – 220,468	<0,001
	Via x Dose (Oral: 108)	-1,77	0,169	0,013 – 2,160	0,164
Saculite	Via (Oral)	-0,74	0,476	0,096 – 2,025	0,329
	Dose (108)	2,52	12,505	3,380 – 56,546	<0,001
	Via x Dose (Oral: 108)	-0,41	0,663	0,080 – 5,721	0,702