

## Comportamento de células do sistema imune frente ao desafio com *Salmonella* Enteritidis em aves tratadas e não tratadas com ácidos orgânicos<sup>1</sup>

Fernanda Flores<sup>2\*</sup>, Maristela Lovato<sup>2</sup>, César G. Wilsmann<sup>2</sup>, Fabio L. Gazoni<sup>2</sup>, Flávio Silveira<sup>2</sup>, Luis F. Caron<sup>3</sup> e Breno C.B. Beirão<sup>3</sup>

**ABSTRACT.**- Flores F., Lovato M., Wilsmann C.G., Gazoni F.L., Silveira F., Caron L.F. & Beirão B.C.B. 2012. [Behavior of cells of immune system to the challenge with *Salmonella* Enteritidis in birds treated and untreated with organic acids.] Comportamento de células do sistema imune frente ao desafio com *Salmonella* Enteritidis em aves tratadas e não tratadas com ácidos orgânicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(6):495-502. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: fer\_vetfb@yahoo.com.br

Salmonellosis is an important zoonosis, considered the leading cause of bacterial infections, and is associated with the consumption of poultry products. As alternative control, organic acids have been widely used. However, little is known about the immune status of poultry production, and an evaluation of this status is necessary to protect against disease and to ensure the safe application of therapeutic agents or prophylactic vaccination. This study aimed to verify the behavior of the immune system of birds previously infected with *Salmonella* Enteritidis (SE) treated with a compound of organic acids in different concentrations administered via water and food, compared with the infected birds and untreated. One hundred and twenty broilers were orally inoculated with 1ml of SE at a concentration of  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL, at 1 and 2-days-old and divided into six treatments with two repetitions of 200, 400, 500 and 1000ppm organic acid. From 35-days-old birds of all groups were collected aliquots of 3mL of blood into a tube containing EDTA for the evaluation of immune cells by flow cytometry. We then analyzed the percentages of circulating CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>β</sup><sup>+</sup>, MHC I<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>, TCRVβ1<sup>+</sup>, CD28<sup>++</sup> and TCRVβ2. For microbiological analysis were collected caecal tonsils of these birds. We found that organic acids in dosages 1000ppm 500ppm in water and in feed for 2 to 7 days before slaughter, respectively, were effective in reducing SE infection in broilers, proven by microbiological method and demonstrated through the behavior of immune cells. The infected birds showed a lower proportion of circulating T helper cells compared with infected poultry, but treated with AO or with the uninfected group. The same trend can be observed for CD28<sup>+</sup> cells, and MHC II<sup>bright+</sup> TCRVβ 1<sup>+</sup>, and with lower resolution, for CD8<sup>β</sup><sup>+</sup>.

INDEX TERMS: Salmonellosis, *Salmonella* Enteritidis, control, immune system, flow cytometry.

<sup>1</sup> Recebido em 8 de dezembro de 2011.

Aceito para publicação em 9 de fevereiro de 2012.

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, defendida no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em 7 de novembro de 2011.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. \*Autor para correspondência: fer\_vetfb@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Av. Cel. Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, Curitiba, PR 81531-900, Brasil.

**RESUMO.**- A Salmonelose é uma importante zoonose, considerada a principal causa de infecções bacterianas, sendo associada ao consumo de produtos avícolas. Como alternativa de controle, ácidos orgânicos têm sido amplamente usados. No entanto, pouco se conhece sobre o estado imunológico de aves de produção, e uma avaliação deste *status* é necessária para proteger frente a enfermidades e para garantir à aplicação segura de agentes terapêuticos ou imunização profilática. Este trabalho teve como objetivo verificar o comportamento do sistema imunológico das aves previamente infectadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) tratadas

com um composto de ácidos orgânicos em diferentes concentrações administrado via água e ração comparando com as aves infectadas e não tratadas. Foram inoculados 120 frangos de corte com 1mL de SE, via oral, na concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL, no 1º e 2º dia de idade, divididos em seis tratamentos com duas repetições, utilizando 200, 400, 500 e 1000ppm do ácido orgânico. Aos 35 dias de vida das aves, foram coletados, de todos os grupos, alíquotas de sangue de 3mL em tubo contendo EDTA para a avaliação das células imunes através de citometria de fluxo. Foram analisadas as porcentagens circulantes de células CD4<sup>+</sup>, CD8β<sup>+</sup>, MHC I<sup>+</sup>, MHC II<sup>+</sup>, TCRVβ1<sup>+</sup>, TCRVβ2<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>. Para análise microbiológica foram coletadas tonsilas cecais destas aves. Observou-se com esse estudo que os ácidos orgânicos nas dosagens 1000ppm na água e 500ppm na ração durante, dois e sete dias respectivamente antes do abate, foram eficazes na redução da infecção por SE em frangos de corte, comprovadas pelo método microbiológico e demonstradas através do comportamento das células do sistema imune. No presente estudo as aves infectadas apresentaram uma proporção menor de células T auxiliares circulantes quando comparadas às aves infectadas, mas tratadas com o AO ou com o grupo não infectado. A mesma tendência pode ser observada para as células CD28<sup>+</sup>, TCRVβ1<sup>+</sup> e MHC II<sup>bright+</sup>, e, com menor resolução, para CD8β<sup>+</sup>.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Salmonelose, *Salmonella* Enteritidis, controle, sistema imunológico, citometria de fluxo.

## INTRODUÇÃO

A Salmonelose é uma das principais causas de infecções bacterianas de origem alimentar em humanos e está associada a diversas fontes, no entanto o consumo de produtos avícolas, como ovos e carnes são amplamente correlacionados (Oldfield 2001). No período de 2000 a 2005, a *Salmonella* Enteritidis (SE) foi o sorotipo mais isolado em abatedouros de aves nos Estados Unidos (Altekruse et al. 2006). No sul do Brasil a SE foi o sorotipo predominante em infecções alimentares em humanos (Vaz et al. 2007, Oliveira et al. 2009, 2010). Este patógeno pode infectar as aves por várias formas, nas quais as mais relacionadas à infecção do plantel são a água, alimento e ambiente contaminado (Flôres 2001).

Nas últimas décadas a principal forma de controle de enfermidades bacterianas em granjas avícolas foi os antimicrobianos. No entanto, o uso destas drogas como medida preventiva tem sido questionada uma vez que extensos relatos surgiram sobre a resistência aos antimicrobianos entre bactérias patogênicas (Parry 2003). Cox & Pavic (2010) mostraram que alguns antibióticos podem facilitar a colonização, aumentar a excreção e prolongar a disseminação de *Salmonella* spp. Desta forma, a proibição de diversos antibióticos na avicultura tem gerado a necessidade do desenvolvimento de novas formas de controle das infecções bacterianas.

Neste contexto, probióticos e ácidos orgânicos, dentre outros, têm sido propostos como candidatos a preencher esta lacuna (Kabir 2009). Probióticos foram definidos como aditivos compostos por micro-organismos vivos

que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro modulando o sistema imune (Gaggia 2010). No entanto, alguns estudos demonstraram que eles não são efetivos no tratamento de aves infectadas com *Salmonella* spp. (Mead 2000). Os ácidos orgânicos têm sido amplamente usados na avicultura e quando administrados na água ou alimento tem capacidade de eliminar bactérias através da redução do pH e pela diminuição da capacidade de aderência da fímbria bacteriana à parede intestinal (Wales 2010). Entretanto, assim como os antibacterianos, os acidificantes têm induzido o desenvolvimento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes (Heres et al. 2004, Dunkley et al. 2009).

O produto utilizado neste trabalho tem em sua composição ácido cítrico, ascórbico e lático e vem sendo empregado como alternativa ao controle bacteriano em avicultura. O seu mecanismo de ação é pela interação através do contato com a membrana celular bacteriana promovendo alterações na permeabilidade seletiva causando a morte da bactéria por lise osmótica (Ostermann 2005).

O sistema imune pode ser separado em inato e adaptativo, que trabalham juntos no combate e eliminação dos possíveis agentes patogênicos. Geralmente a ativação do sistema imune diminui o desempenho das aves modernas e para maximizar a eficiência produtiva ele deve ser mantido vigilante e ativado apenas quando requerido. Uma vez ativado, a resolução rápida ou transição rápida do inato para o adaptativo é desejável para minimizar as perdas de produtividade (Buehler 2008)

Contudo, pouco se conhece sobre o estado imunológico de aves de produção, aparentemente saudáveis, e que são constantemente imunizadas e passam por intensos processos de seleção de características zootécnicas desejáveis (Bridle et al. 2006). As populações de linfócitos do sangue periférico parecem ser bons marcadores para avaliar a imunocompetência dos animais, incluindo aves. Sabe-se, por exemplo, que a proporção CD4:CD8 é reduzida em aves criadas comercialmente quando comparadas com aves "Specific Pathogen Free" (SPF), parâmetro que indica menor imunocompetência, como aumento na suscetibilidade as diversas enfermidades (Ewald et al. 1996, Bridle et al. 2006).

Em situações de desafio, as subpopulações de linfócitos circulantes ajudam a compreender a patogenia e evolução das infecções, e como controlá-las. Assim, por exemplo, a subpopulação de linfócitos T citotóxicos no baço de galinhas é maior em aves criadas em granjas avícolas do que em aves que cresceram em laboratório (Erf 1998), bem como em aves estimuladas por diferentes antígenos (Parmentier et al. 1995).

A avaliação dos padrões imunológicos de aves criadas comercialmente é necessária para proteger contra doenças associadas com manejo intenso e para garantir a aplicação segura de agentes terapêuticos visando à imunização profilática (Dietert 1994). Esta é atualmente realizada, sobre o sistema imune em situações comerciais, como sorologia e aferição do tamanho de órgãos linfóides e possa não ser tão sensíveis quanto o desejado, ou tampouco ter a capacidade de elucidar o mecanismo das alterações ocasionadas pelos agentes patogênicos (Heckert et al. 2002, Bolis et al. 2003, Mendonça et

al. 2009). As avaliações realizadas na maior parte dos estudos voltados à imunofenotipagem de linfócitos aviários estão focadas em amostras do baço e timo, havendo alguns poucos estudos sobre as populações celulares circulantes, de mais fácil avaliação (Bridle et al. 2006, Fair et al. 2008).

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar o fenótipo celular. Eles são capazes de ler ao menos os parâmetros de tamanho e granulidade celular e alguns comprimentos de onda.

O citômetro avalia cada célula individualmente, gravando vários parâmetros sobre a mesma célula. Assim, é permitido identificar uma população homogênea dentro de uma população heterogênea, ao contrário de espectrofluorímetros, por exemplo, que avaliam a população como um todo (Beirão 2011).

Acredita-se que uma importante ferramenta utilizada para reduzir *Salmonellas* em aves é aumentar a resistência da ave para o organismo através da estimulação do sistema imunológico. A vacinação e a administração de citocinas/quimiocinas e imunomoduladores têm sido os métodos utilizados para aumentar a resistência à infecção por *Salmonella* nas aves. Estudos mais aprofundados sobre o sistema imunológico aviário auxiliarão no desenvolvimento de métodos mais eficazes para estimular a imunidade efetiva e melhorar as chances para uma criação de aves livres de salmonelas. Este micro-organismo é considerado patógeno intracelular, sendo que a imunidade celular desempenha um papel importante na imunidade protetora contra infecções (Holt et al. 2010).

O objetivo deste estudo foi verificar o comportamento do sistema imunológico das aves infectadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) que receberam tratamento com ácidos orgânicos (AO) em diferentes concentrações administrado via água e ração comparando com as aves infectadas e não tratadas com este composto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Avaliação *in vivo*

O experimento foi conduzido no bloco experimental do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias situado no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria, Brasil. Foram alojados em baterias 120 fêmeas de corte, com um dia de idade, da linhagem Cobb divididas em seis tratamentos com duas repetições. A dieta utilizada foi à base de milho e farelo de soja sem a adição de substâncias antimicrobianas. Os frangos foram inoculados com 1mL via oral de SE contendo  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL no 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> dia de idade.

O desenho experimental foi composto pelos seguintes tratamentos: (T1) aves não desafiadas; (T2) aves desafiadas e não tratadas; (T3) aves desafiadas e tratadas com 200ppm de AO via ração dos 29 aos 35 dias e 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; (T4) aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; (T5) aves desafiadas e tratadas com 500ppm na ração dos 29 aos 35 dias de idade; e (T6) aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade.

### Coleta de sangue e necropsia

A coleta de sangue dos frangos foi realizada aos 35 dias de vida das aves com seringa e agulha estéreis, utilizando-se dos protocolos-padrão de contenção dos animais e assepsia (FAO 2002)

através de punção cardíaca. Após a coleta, alíquotas do sangue de 3mL foram então colocadas em tubo de ensaio de 10cm sem vácuo contendo anticoagulante (EDTA).

Após a coleta as aves foram eutanasiadas, necropsiadas e tonsilas cecais foram coletadas assepticamente para análises microbiológicas.

O projeto foi registrado e aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFSM sob o número 016/2010.

### Avaliação dos componentes do sistema imune

A avaliação das células imunes foi realizada pela técnica de citometria de fluxo, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba. Foram analisadas as porcentagens circulantes de células CD4<sup>+</sup>, CD8β<sup>+</sup>, MHC I<sup>+</sup>, MHC II<sup>+</sup>, TCRVβ1<sup>+</sup>, TCRVβ2<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>. Precedendo-se as análises pelo citômetro de fluxo, as células mononucleares são separadas dos demais componentes do sangue, e em seguida são marcadas por anticorpos específicos. Segue-se uma breve descrição da metodologia.

### Isolamento das células mononucleares e marcação para análise por citometria de fluxo

Células mononucleares foram separadas do sangue total através de separação por gradiente de densidade utilizando Ficoll (Histopaque-1077<sup>®</sup>, *Sigma-Aldrich*), baseado em protocolo previamente estabelecido por Fair et al.(2008). Em síntese, o sangue foi diluído 1:1 em PBS (solução salina tamponada e fosfatada com pH 7,4) para um volume final de 2mL. Essa diluição é adicionada acima do 1mL de Ficoll em um tubo estéril de 15mL (de plástico graduado tipo Falcon). As amostras foram centrifugadas em centrífuga (5804 R Eppendorf) a 400 $\times$ g, por 30 minutos a temperatura ambiente.

A capa flogística resultante foi então coletada e transferido para outro tubo de 15mL. As células foram lavadas duas vezes com 4mL de PBS e centrifugadas a 400 $\times$ g por 7 minutos. O sedimento final foi ressuspenso em 1mL de solução de paraformaldeído em PBS 1% para a fixação das células. Trinta minutos após a ressusensão, as células foram centrifugadas a 400 $\times$ g por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas nas mesmas condições anteriormente descritas. O sedimento final foi ressuspenso em PBS com BSA (albumina de soro bovino - *Sigma-Aldrich*) 1%. As células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer (NewOptics).

Marcação única foi realizada para todos os anticorpos usando anticorpo primário diluído 1:10 em PBS (pH 7,4) (anticorpos nas seguintes concentrações: 0,5mg/mL para os anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A diluição foi homogeneizada com 10<sup>6</sup> células mononucleares e mantida à temperatura ambiente em local escuro por 20 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com 2mL de PBS, centrifugadas a 400 $\times$ g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado. As células receberam o anticorpo secundário (1μL de diluição de 1:1000) ou Estreptavidina FITC (concentração de 0,5 mg/mL) (diluído 1:10), de acordo com a especificação de cada anticorpo. As células foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente em local escuro, e em seguida lavadas com 2mL de PBS e centrifugadas. O sedimento final foi ressuspenso em 250μL de PBS com BSA 1%.

### Anticorpos

Os anticorpos monoclonais primários anti-proteínas de superfície celular de frangos foram adquiridos da Southern Biotechnology Associates, Inc. USA. O Anticorpo secundário (usado para MHC classe II e para anticorpo controle isotópico) foi Fluoresceína (FITC) AffiniPure fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-camundongo IgG+IgM (H+L) (Accurate Chemical & Scientific Corp.) Conjugado

de Streptavidina FITC (para anticorpos primários biotinilados) (Southern Biotech), específico para d-Biotina, de *Streptomyces avidinii*.

### Citometria de fluxo

Todas as amostras passaram por citometria dentro de 4 horas após a marcação. A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson). Fluorescência verde (FITC) foi detectada no canal FL1 (nm 530/30) (Fig.1). As células foram analisadas em pelo menos 10.000 eventos no *gate* de linfócitos (com base na dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC)), o que inclui trombócitos contaminantes, de morfologia muito semelhante aos linfócitos (BOHLS et al. 2006). Os dados foram analisados com o software FlowJo® (TreeStar) ou WinMDI 2.9 (Joseph Trotter).

### Análise microbiológica

As amostras de tonsilas cecais coletadas foram submetidas à fenotipagem para *Salmonella* spp. conforme o protocolo recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL 2003), o qual consiste dos seguintes procedimentos: pré-enriquecimento em água peptonada<sup>4</sup> 1% (37°C/24h), enriquecimento seletivo nos caldos rappaport-vasiliadis<sup>1</sup> (42°C/24h) e tetratonato<sup>1</sup> acrescido de solução verde brilhante e iodo-iodeto (37°C/24h), semeadura em ágar verde brilhante e ágar xilose lisina desoxicolato<sup>1</sup> (37°C/24h). Após foi observada a presença ou ausência de colônias com características fenotípicas de *Salmonella* spp., e submetidas à análise bioquímica em ágar tríplice de açúcar e ferro<sup>1</sup>, ágar lisina-ferro<sup>1</sup>, meio sim<sup>1</sup> (*syulphide indol motility*), caldo uréia<sup>1</sup> e citrato de Simmons<sup>1</sup>.

### Análise estatística

A porcentagem média, desvio padrão, teste ANOVA e o teste de Tukey/Kramer foram utilizados para averiguar as diferenças estatísticas entre os tratamentos na avaliação por citometria de fluxo ( $P \leq 0.05$ ) utilizando o programa StatView (SAS Institute Inc.).

Os resultados da presença/ausência de SE foram comparados utilizando o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para determinar a diferença entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ). O teste foi realizado utilizando-se o programa estatístico SAS Versão 9.2 (SAS 2010).

## RESULTADOS

Em frangos de corte experimentalmente infectados com SE foi constatado que aos 35 dias de idade houve uma redução na presença de SE em cecos das aves tratados com AO tanto via água como ração quando utilizados nas concentrações de 1000ppm e 500ppm respectivamente (Quadro 1).

Os resultados da avaliação do sistema imune através da citometria de fluxo realizadas neste estudo (Fig.2) concordam com as observações microbiológicas da ação do produto encontradas no presente trabalho. O grupo controle negativo (T1) teve a maior quantidade média de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8 $\beta$ <sup>+</sup>, MHC II<sup>bright+</sup> e, juntamente com o T4 TCRV $\beta$ 1<sup>+</sup> que reduziu em 95 % a presença de SE.

No presente estudo as aves infectadas apresentaram uma proporção menor de células T auxiliares circulantes quando comparadas às aves infectadas, mas tratadas com o AO ou com o grupo não infectado. A mesma tendência pode ser observada para as células CD28<sup>+</sup>, TCRV $\beta$ 1<sup>+</sup> e MHC II<sup>bright+</sup>, e, com menor resolução, para CD8 $\beta$ <sup>+</sup>.

Nas marcações citadas, pode ser observada uma diminuição na quantidade dessas células quando na presença da

### Quadro 1. Teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) comparando o percentual de aves positivas para *Salmonella* Enteritidis nos diferentes tratamentos

| Tratamentos   | Positivos/N | % de positivos     |
|---|-------------|--------------------|
| T1 - Aves não desafiadas;   | 0/20        | 0% <sup>b</sup>    |
| T2 - Aves desafiadas e não tratadas;  | 10/20       | 50% <sup>a</sup>   |
| T3 - Aves desafiadas e tratadas com 200ppm de AO via ração dos 29 aos 35 dias e 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; | 5/20        | 25% <sup>b,c</sup> |
| T4 - Aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade;   | 1/20        | 5% <sup>b</sup>    |
| T5 - Aves desafiadas e tratadas; com 500ppm na ração dos 29 aos 35 dias de idade;   | 1/20        | 5% <sup>b</sup>    |
| T6 - Aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade.  | 12/20       | 60% <sup>a</sup>   |

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem pelo teste de  $\chi^2$ . ( $P=0,0001$ ); N: 20 aves por tratamento, total: 120 aves.

infecção e um retorno gradual à condição do grupo controle entre o grupo T2 e T4, quando o tratamento tornou-se efetivo em reduzir a carga bacteriana. O grupo T6 não obteve sucesso em eliminar as bactérias apresentando resultados similares à T2, como observado na análise microbiológica e imunológica. Embora o T5 tenha sido capaz de reduzir a quantidade de SE isoladas, a avaliação imunológica não demonstrou relação referente a essa diminuição, aparecendo T5 com níveis de células similares ao grupo infectado para as marcações já discutidas, embora haja sinais de recuperação em CD8 $\beta$ <sup>+</sup>, TCRV $\beta$ 1<sup>+</sup> e altos índices em MHC II<sup>bright+</sup>.

## DISCUSSÃO

A redução de SE no ceco dos frangos de corte avaliada neste trabalho concorda com diversos autores que relataram eficiência dos AO no controle de infecções por SE, *Campylobacter* e outros agentes (Heres et al. 2004, Ostermann 2005, Bassan et al. 2008).

Segundo a literatura, o uso de ácidos orgânicos na água antes do abate dos animais (Byrd et al. 2001) administrados via ração (Pickler 2011) pode ser uma alternativa viável para redução de micro-organismos patogênicos e também apresentar resultados satisfatórios de ganho de peso médio (GPM) e conversão alimentar (CA). Além disso, o último autor sugere que a via de administração dos AO (água ou ração) foi eficaz, mas pode ter respostas diferentes dependendo da interação do micro-organismo estudado com o hospedeiro e a microbiota intestinal. Nava et al. (2009) utilizando técnicas moleculares indicaram que o uso de AO na água de frangos por 22 dias consecutivos, afeta a população microbiana no íleo e que, animais tratados com AO apresentaram maior número de *Lactobacillus* e de bactérias totais.

Os AO associados com atividade antimicrobiana são os ácidos graxos de cadeia curta, tanto monocarboxílicos, como fórmico, acético, propiônico e o butírico ou carboxilados com o grupo hidroxila como láctico, málico, tartárico e o cítrico. Acredita-se que o eles exercem atividade antimicrobiana devido a redução do pH no interior da célula microbiana. No ambiente celular, o ácido se dissocia alterando o pH citoplasmático, afetando o metabolismo e levando a morte da bactéria (Ostermann 2005).

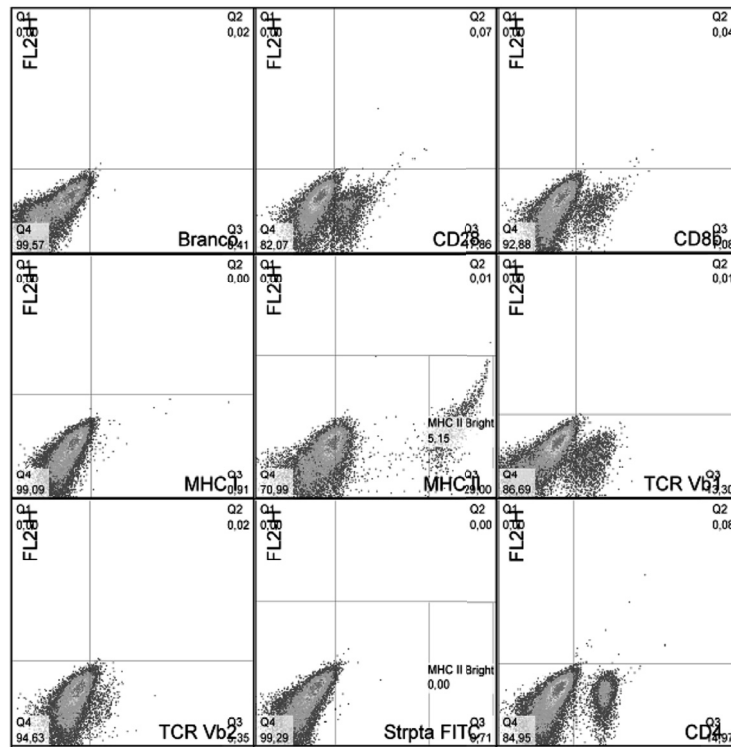


Fig. 1. Gráficos representativos da avaliação citométrica dos parâmetros imunológicos.

Nota: \*Todas as amostras eram lidas no canal FL1H (nm530/30). \*\*FL2H - Canal de leitura (nm585/42); Strepta FITC - Conjugado de estreptavina FITC para anticorpos primários biotilinaados; Células circulantes analisadas: CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, MHC I<sup>+</sup>, MHC II<sup>+</sup>, TCRVβ1<sup>+</sup>, TCRVβ2<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>.

Alguns AO não necessitam reduzir o pH no citoplasma para exercer sua atividade antimicrobiana. Por exemplo, no caso do ácido sórbico, que não reduz o pH citoplasmático e acredita-se que a membrana citoplasmática seja o primeiro sítio de ação deste ácido (Stratford et al. 2009). A lesão da membrana, a perda da sua integridade e o aumento da permeabilidade a prótons, levam a morte do micro-organismo. Neste sentido, AO são utilizados na alimentação animal para melhorar o desempenho e para controlar a população de micro-organismos patogênicos no intestino, em sistemas de manejo intensivo. Suas vantagens além da produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas e aminoácidos é que também irá atuar como mecanismo de exclusão competitiva, desenvolvimento de defesas intestinais como o muco, estimulação e proliferação de células epiteliais intestinais (enterócitos). Assim, são empregados para melhorar o desempenho zootécnico das aves e como moduladores da microbiota intestinal (Pickler 2011).

O uso de citometria de fluxo para avaliar as subpopulações de linfócitos de aves é considerado como altamente sensível, e os anticorpos disponíveis comercialmente são bastante específicos sendo que a precisão da avaliação da imunocompetência é superior a outros métodos, como, por exemplo, o leucograma comum, a medida do tamanho de barbeta após injeção de um agente de desafio ou a aferição do tamanho da bursa (Bridle et al. 2006, Fair et al. 2008, Beirão 2011).

A proporção linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, MHC II<sup>bright+</sup> e, TCRVβ1<sup>+</sup> para os grupos T1 e T4 após a avaliação pela ci-

tométrica de fluxo concordaram com os achados de Pickler (2011) testando aves com 21 dias de idade, após 7 dias de inoculação com SE e tratados com AO via ração e aos resultados de Beirão (2011) que comparou aves comuns de diferentes linhagens *versus* aves "Specific Pathogen Free" entre 1 dia e 60 semanas frente ao desafio com SE.

A imunidade contra *Salmonellas* aviárias envolve o deslocamento de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> para o local da infecção (Van Immerseel et al. 2002, Barua & Yoshimura 2004) e consequente redução na quantidade circulante dessas células (Asheg et al. 2003). A defesa imunológica das aves envolve linfócitos T dos três tipos de receptor TCR ( $\gamma\delta$ ,  $\alpha\beta$  Vβ1 e  $\alpha\beta$  Vβ2). As células TCRVβ1 expressam menores quantidades de CD28 do que as células TCRVβ2, indicando menor grau de ativação destas. Ambos os TCR $\alpha\beta$  podem expressar em sua superfície CD4 simultaneamente com CD8 $\alpha\alpha$ . Após a imunização, um aumento na quantidade circulante de TCR está associado à montagem de resposta protetora e efetiva proteção quando submetido ao desafio. Todavia, respostas distintas podem ser observadas entre a imunização e o desafio (Berndt 2006).

Cada anticorpo primário utilizado define um grupo de células de acordo com a respectiva função. O CD4 reconhece linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) (Chan 1988), e, especialmente em aves, uma população relativamente grande de células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (duplo-positivas) (Luhtala et al. 1997).

Receptores CD8 são compostos de um dímero de moléculas  $\alpha$  e  $\beta$  (Chan 1988), portanto, são CD8 $\alpha\alpha$  ou CD8 $\alpha\beta$

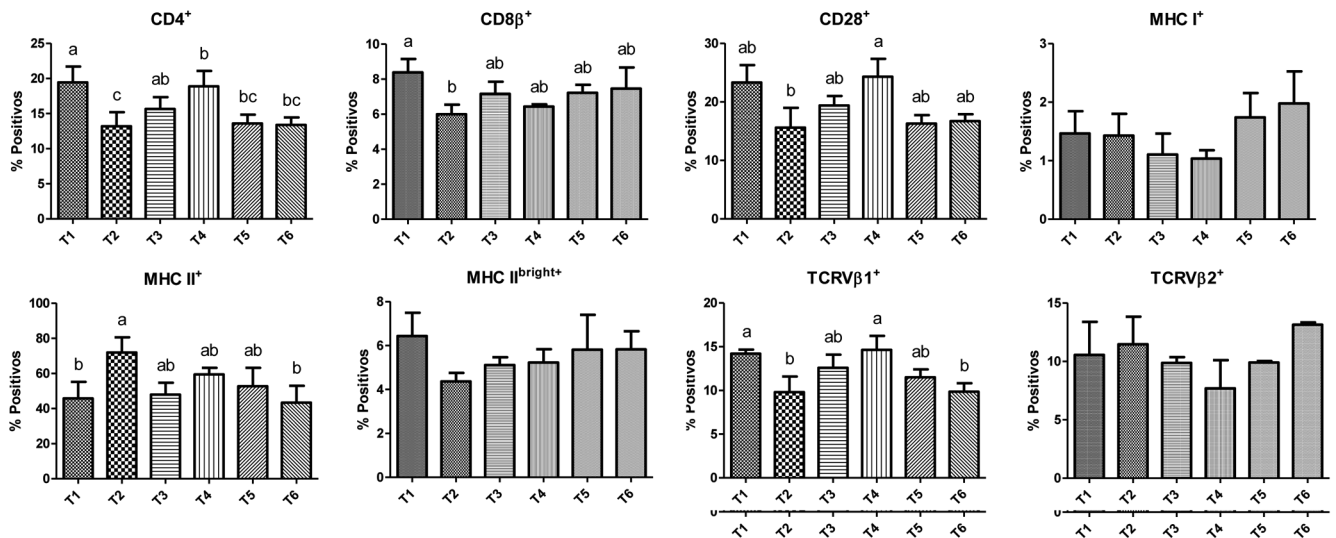


Fig. 2. Quantidade circulante dos diversos subtipos celulares estudadas neste trabalho em aves infectadas experimentalmente com *Salmonella* Enteritidis de acordo com os tratamentos.

Nota: (T1) Aves não desafiadas; (T2) Aves desafiadas e não tratadas; (T3) Aves desafiadas e tratadas com 200ppm de AO via ração dos 29 aos 35 dias e 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; (T4) Aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade; (T5) Aves desafiadas e tratadas com 500ppm na ração dos 29 aos 35 dias de idade; (T6) Aves desafiadas e tratadas com 400ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade. "a", "b" e "c" indicam diferenças estatísticas entre os grupos. "ab" e "bc" indicam grupos não estatisticamente diferentes de "a", "b" e "c". Teste de Tukey/Kremer.

(Tregaskes 1995). Isso é relevante porque células citotóxicas têm os receptores CD8αβ, que são capazes de interagir com o MHC I, enquanto que as células duplo-positivas expressam a molécula CD8αα (Luhtala et al. 1997). Asheg et al (2003) demonstraram haver uma redução no número de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de galinhas infectadas com SE em comparação com o grupo controle não-infectado. Em aves vacinadas e submetidas à infecção com SE houve aumento na quantidade de células citotóxicas no ceco das aves (Berndt 2006), indicando que pode haver saída de células da circulação com destino ao tecido desafiado.

Segundo Berndt (2006) a capacidade dos sorotipos de *Salmonella* entrarem na mucosa cecal e a invasão de camadas inferiores afeta tanto o nível quanto a natureza da resposta imune no tecido. A SE possui alta capacidade invasiva e pode facilmente ser encontrada nas células da lâmina própria, aumentando o recrutamento de granulócitos, células CD8<sup>+</sup> e interleucinas.

Galinas têm três diferentes receptores de linfócito T (TCR), TCR γδ (TCR1), TCR αβ Vβ1 (TCR2) e TCR αβ Vβ2 (TCR3). Neste trabalho, os dois últimos marcadores foram utilizados. Cada célula individual expressa apenas um tipo de TCR em sua superfície, e os três tipos são capazes de estarem presentes tanto em células CD4 quanto CD8 (Davison et al. 2008, Berndt 2006). Acredita-se que o TCR2 esteja envolvido na imunidade de mucosa, ao estimular a produção de IgA (Cihak et al. 1993, Zekarias et al. 2002). Supõe-se que um grande estímulo infeccioso poderia ter provocado a saída de células TCR2 da circulação.

O CD28 é um receptor de coestimulação da ativação de células T quando esta entra em contato com células apresentadoras de antígeno (APCs). A interação entre CD28 e B7 (nas APCs) é essencial para a montagem da resposta imune (Linsley & Ledbetter 1993). Uma redução na propor-

ção de CD28 circulante é visto na fase aguda de processos infecciosos devido ao destinamento dessas células para os órgãos linfóides secundários, em um processo conhecido como *homing*, ou devido à excessiva ativação e consequente senescência das células, em um processo em que a molécula CD28 é perdida (Papagno et al. 2004). Pode-se supor que este tenha sido o que ocorreu no presente estudo. A quantidade circulante de CD28 foi reduzida quando os animais foram desafiados e não foram submetidos a qualquer tratamento (T2), o que poderia significar, portanto, *homing* ou ativação dessas células. Porém quando os animais foram submetidos a um tratamento com AO (T3 e T4), parece ter havido recuperação dos níveis sanguíneos dessas células.

Cerca de 10% dos linfócitos são positivos para MHC II, e desses, aparentemente cerca de 90% são linfócitos B (Hála 1981). A marcação para MHC II também demonstra uma subpopulação que tem alta expressão dessas moléculas (denominada de MHC II<sup>bright+</sup>). Acredita-se que a população MHC II<sup>bright+</sup> seja composta principalmente por células dendríticas, a principal APC, mas também por monócitos que já foram ativados, ou seja, estão expressando antígenos estranhos acoplados ao MHC (Davison 2008). Pode-se supor que o processo de *homing* possa também ter algum papel na redução da quantidade circulante dessas células ativadas.

Muitos estudos em camundongos e humanos têm demonstrado um declínio na função do sistema imunológico com a idade resultando em um aumento da incidência de doenças infecciosas, não infecciosas e mortalidade. A quantidade e proporção de subpopulações de células T têm sido relacionadas com a susceptibilidade à doença. Portanto, a compreensão relacionada à imunocompetência com a idade através da avaliação de populações de linfócitos T circulantes em frangos, aparentemente saudáveis, criados

comercialmente é de fato relevante para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento, bem como promover medidas de saúde para o plantel (Bridle et al. 2006). Neste estudo foram utilizadas aves com 35 dias de idade, consideradas jovens. Analisando-se o papel de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no fornecimento de resposta imunológica contra infecções percebe-se que quando existe uma diminuição por diversos fatores, a suscetibilidade para a Salmonelose aumenta (Kamalavenkatesh et al. 2005).

Notavelmente, as reações de células T e as respostas da imunidade celular parecem ser de importância central para a defesa contra infecções por *Salmonella* em frangos (Berndt 2006).

Portanto, conhecer o funcionamento imunológico é de fundamental importância já que o estado imune tem um papel crítico na defesa da ave contra patógenos. Como nos mamíferos, o sistema imune das aves é complexo e compreende uma série de células e fatores solúveis que devem trabalhar juntos para produzir uma resposta imune protetora. Ainda deve se levar em consideração que a indução da resposta imune é diferente entre os diversos patógenos, incluindo diferenças significativas também entre os sorotipos, como é o caso das *Salmonellas* que possuem habilidade de induzir respostas diferentes dependendo do sorotipo em questão (Chappell et al. 2009).

Diversos patógenos são endêmicos em regiões de produção avícola e a exposição a estes pode prejudicar as funções do sistema imune. Por isso manter o plantel em condições de sanidade adequadas utilizando-se produtos que reduzem a carga bacteriana e que mantêm níveis imunológicos adequados contribui para o melhor desempenho das aves e para a qualidade de produtos avícolas.

## CONCLUSÕES

As dosagens de AO de 1000ppm na água e 500ppm na ração durante 2 e 7 dias, respectivamente, antes do abate, foram eficazes na redução da infecção por SE em frangos de corte, comprovadas pelo método microbiológico e demonstradas através do comportamento das células do sistema imune.

O grupo T1 (controle não infectado) e o T4 (aves desafiadas e tratadas com 1000ppm de AO via água dos 34 aos 35 dias de idade) tiveram a maior quantidade média de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8β<sup>+</sup>, MHC II<sup>bright+</sup> e TCRVβ1<sup>+</sup>.

O T5 (aves desafiadas e tratadas com 500ppm de AO na ração dos 29 aos 35 dias de idade) foi capaz de reduzir a quantidade de SE isoladas, porém a avaliação imunológica não demonstrou correspondência constante a essa melhora, aparecendo T5 com níveis de células similares ao T2 (grupo infectado não tratado) embora com sinais de recuperação em CD8β<sup>+</sup>, TCRVβ1<sup>+</sup> e altos índices em MHC II<sup>bright+</sup>, indicando que pode haver saída de células da circulação com destino ao tecido desafiado.

Ocorrência do efeito *homing* para redução de células CD28 e MHC II<sup>bright+</sup> circulantes.

Os grupos infectados têm maior proporção de células circulantes e um retorno gradual é observado quanto o tratamento torna-se efetivo na redução da carga bacteriana.

**Agradecimentos.**- Ao Professor Luis Felipe Caron da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a IMUNOVA Análises Biológicas pela parceria na realização da análise de citometria de fluxo; Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

## REFERÊNCIAS

- Altekruse S.F., Bauer N., Chanlongbutra A., DeSagun R., Naugle A., Schlosser W., Umholtz R. & White P. 2006. *Salmonella* Enteritidis in Broiler Chickens, United States, 2000-2005. Emer. Infect. Dis. 12(12):1848-1852.
- Ashg A.A., Levkut M., Revajová V., Sevcikova Z., Kolodzieyski L. & Pisl J. 2003. Dynamics of lymphocyte subpopulations in immune organs of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. Acta Vet. Brno 72(3):359-364.
- Barua A. & Yoshimura Y. 2004. Ovarian cell-mediated immune response to *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens (*Gallus domesticus*). Poul. Sci. 83(6):997-1002.
- Bassan J.D., Flôres M.L., Antoniazzi T., Bianchi E., Kuttel J. & Trindade M.M. 2008. Controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. Rural Sci. 38(7):1961-1965.
- Beirão B.C.B. 2011. Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo. Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.131.
- Berndt A., Pieper J. & Methner U. 2006. Circulating gamma delta t cells in response to *Salmonella* enterica serovar Enteritidis exposure in chickens. Infect. Immun. 74(7):3967-3978.
- Bohls R.L., Smith R., Ferro P.J., Silvy N.J., Li Z. & Collisson E.W. 2006. The use of flow cytometry to discriminate avian lymphocytes from contaminating thrombocytes. Dev. Comp. Immunol. 30(9):843-850.
- Bolis D., Paganini F., Simon V., Zuanaze M., Neto H.S., Correa A. & Ito N. 2003. Gumboro disease: Evaluation of serological and anatomopathological responses in vaccinated broiler chickens challenged with very virulent virus strain. Braz. J. Poul. Sci. 5(2):137-146.
- Brasil 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa SDA N.62, de 26 de agosto de 2003. Secretaria da defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF. 76p.
- Bridle B.W., Julian R., Shewen P.E., Vaillancourt J.P. & Kaushik A.K. 2006. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. Can. J. Vet. Res. 70(3):183-190.
- Buehler D.M. 2008. Bottlenecks, budgets and immunity: The costs and benefits of immune function over the annual cycle of red knots (*Calidris canutus*). Tese de Doutorado, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Groningen, Groningen, NL. 248p.
- Byrd J.A., Hargis B.M., Caldwell D.J., Bailey R.H., Herron K.L., McReynolds J.L., Brewer R.L. & Kubena L.F. 2001. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. Poul. Sci. 80(3):278-283.
- Chan M.M., Chen C.L.H., Ager L.L. & Cooper M.D. 1988. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. J. Immunol. 140 (7):2133-2138.
- Chappell L., Kaiser P., Barrow P., Jones M.A., Johnston C. & Wigley P. 2009. The immunology of avian systemic salmonellosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 128 (1):53-59.
- Cihak J., Losch U., Hoffmann-Fezer G., Chen C.H., Cooper M.D. & Ziegler-Heitbrock H.W.L. 1993. In vivo depletion of chicken t-cell subsets. Scand. J. Immunol. 38(2):123-129.
- Cox J.M. & Pavic A. 2010. Advances in enteropathogen control in poultry production. J. Appl. Microbiol. 108(3):745-755.
- Davison F., Kaspers B. & Schat K. 2008. Avian Immunology. London, UK. 496p.
- Dietert R.R., Golemboski K.A. & Austic R.E. 1994. Environment-immune interactions. Poul. Sci. 73(7):1062-1076.
- Dunkley K.D., Callaway T.R., Chalova V.I., McReynolds J.L., Hume M.E., Dunkley C.S., Kubena L.F. & Ricke S.C. 2009. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. Anaerobe 15(1):26-35.

- Erf G.F., Bottje W.G. & Bersi T.K. 1998. CD4, CD8 and TCR defined t-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62(4):339-348.
- Ewald S.J., Lien Y.Y., Li L. & Johnson L.W. 1996. B-haplotype control of cd4/cd8 subsets and TCRV beta usage in chicken t lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53(3/4):285-301.
- Fair J.M., Taylor-McCabe K.J., Shou Y. & Marrone B.L. 2008. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125(3): 268-273.
- FAO 2002. A Basic Laboratory Manual for the Small Scale Production and Testing of i-2 Newcastle disease vaccine. Food and Agriculture Organization, Rome. 27p.
- Flôres M.L. 2001. Avaliação da técnica em cadeia pela polimerase na detecção de *Salmonella* sp em ovos de galinhas artificialmente contaminados, em ovos comerciais do tipo colonial e em alimentos a base de ovos, envolvidos em surtos de infecções alimentares. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 126p.
- Gaggia F., Mattarelli P. & Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food. Microbiol.* 141(1):515-528.
- Hála K., Boyd R. & Wick G. 1981. Chicken major histocompatibility complex and disease. *Scand. J. Immunol.* 14(6):607-616.
- Heckert R.A., Estevez I., Russek-Cohen E. & Pettit-Riley R. 2002. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. *Poult. Sci.* 81(4):451-457.
- Heres L., Engel B., Urlings H.A.P., Wagenaar J.A. & Van Knapen F. 2004. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. *Vet. Microbiol.* 99(3):259-267.
- Holt P.S., Vaughn L.E. & Gast R.K. 2010. Flow cytometric characterization of Peyer's patch and cecal tonsil T lymphocytes in laying hens following challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133(2):276-281.
- Kabir S.M.L. 2009. The role of probiotics in the poultry industry. *International J. Mol. Sci.* 10(8):3531-3546.
- Kamalavenkatesh P., Vairamuthu S., Balachandran C., Murali-Manohar B. & Dhinakar-Raj G. 2005. Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken. *Mycopathologia* 159(2):273-279.
- Linsley P.S. & Ledbetter J.A. 1993. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 11(1):191-212.
- Luhtala M., Lassila O., Toivanen P. & Vainio O. 1997. A novel peripheral CD4+ CD8+ T cell population: inheritance of CD8alpha expression on CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 27(1):189-193.
- Mead G.C. 2000. Prospects for 'competitive exclusion' treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *Vet. J.* 159(2):111-123.
- Mendonça J.F.P., Martins N.R.S., Carvalho L.B., Sá M.E.P. & Melo C.B. 2009. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. *Rural Sci.* 39(8):2559-2566.
- Nava G.M., Attene-Ramos M.S., Gaskins H.R. & Richards J.D. 2009. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. *Vet. Microbiol.* 137(3/4):345-353.
- Oldfield E.C. 2001. Emerging foodborne pathogens: Keeping your patients and your families safe. *Rev. Gastroenterol. Dis.* 1(4):177-186.
- Oliveira F.A., Geimba M.P., Pasqualotto A.P., Brandelli A., Pasquali G., da Silva W.P. & Tondo E.C. 2009. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in southern Brazil. *Food Contr.* 20(6):606-610.
- Oliveira F.A., Pasqualotto A.P., Silva W.P. & Tondo E.C. 2010. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. *Food Res. Int.* (In publication)
- Ostermann P. 2005. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. *Ave World* 3(15):28-31.
- Papagno L., Spina C.A., Marchant A., Salio M., Rufer N., Little S., Dong T. & Appay V. 2004. Immune activation and cd8+ t-cell differentiation towards senescence in hiv-1 infection. *PLoS-Bio.* 2(2):173-185.
- Parmentier H.K., Kreukniet M.B., Goeree B., Davison T.F., Jeurissen S.H.M., Harmsen E.G.M. & Nieuwland M.G.B. 1995. Differences in distribution of lymphocyte antigens in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48(1/2):155-168.
- Parry C.M. 2003. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Opin. Infect. Dis.* 169(5):467-472.
- Pickler L. 2011. Ácidos orgânicos via água e via ração para controlar *Salmonella enterica* serovar Enteritidis e Minnesota em frangos. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 67p.
- SAS Institute Inc. 2010. Version 9.2. SAS, Cary, NC.
- Stratford M., Plumridge A., Nebe-von-Caron G. & Archer D.B. 2009. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *Int. J. Food Microbiol.* 136(1):37-43.
- Tregaskes C.A., Kong F.K., Paramithiotis E., Chen C.L.H., Ratcliffe M.J.H., Davison T.F. & Young J.R. 1995. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol.* 154(9):4485-4494.
- Van Immerseel F., De Buck J., De Smet I., Mast J., Haesebrouck F. & Ducatelle R. 2002. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. *Dev. Comp. Immunol.* 26(4):355-364.
- Vaz C.S.L., Streck A.F., Tramontina T., Cardoso M.R.I. & Canal C.W. 2007. Use of a modified AFLP protocol to discriminate *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Enteritidis isolates. *Acta Sci. Vet.* 35(1):41-48.
- Wales A.D., Allen V.M. & Davies R.H. 2010. Chemical Treatment of Animal Feed and Water for the Control of *Salmonella*. *Foodborne Pathogens Dis.* 7(1):1-15.
- Zekarias B., Ter-Huurne A.A.H.M., Landman W.J.M., Rebel J.M.J., Pol J.M.A. & Gruys E. 2002. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet. Res.* 33(2):109-125.