

ESTUDO HEMATOLÓGICO EM AVES INOCULADAS COM *SALMONELLA GALLINARUM*

A.L.S.P. Cardoso, E.N.C. Tessari, A.G.M. Castro

¹Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Instituto Biológico, Rua Bezerra Paes, 2278, CEP 13690-000, Descalvado, São Paulo, Brasil. E-mail: alspscardoso@linkway.com.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi observar as alterações hematológicas que ocorrem nos frangos de corte durante a fase aguda do tifo aviário. Parâmetros hematológicos foram investigados no sangue de trinta e seis aves infectadas com *Salmonella gallinarum* e comparados com trinta e seis aves de um grupo controle. As colheitas de sangue foram realizadas aos 24, 26, 31, 38, 45 e 52 dias de idade. Com o desenvolvimento da fase aguda da doença, foi observada uma severa anemia macrocítica e hipocrômica, leucocitose e heterofilia com presença de células jovens.

PALAVRAS-CHAVE: Aves, hematologia aviária, *Salmonella gallinarum*.

ABSTRACT

HEMATOLOGICAL STUDY IN BROILERS INOCULATED WITH *SALMONELLA GALLINARUM*. The objective of this study was to observe the hematology changes that take 2 broilers during acute fowl typhoid. Hematological parameters were investigated in the blood of thirty-six birds infected with *Salmonella gallinarum* and compared with thirty-six birds of a control group. The blood samples were taken on days 24, 26, 31, 38, 45 and 52. During the development of the acute disease, was observed a severe macrocytic and hypochromic anemia, leucocytosis and heterophilia with juvenile cells.

KEY WORDS: Poultry, avian hematology, *Salmonella gallinarum*.

INTRODUÇÃO

Salmonella gallinarum é o agente responsável pelo tifo aviário caracterizado como uma doença sistêmica bastante severa que causa perdas econômicas na avicultura mundial, pois provoca alta morbidade e mortalidade, queda na produção de ovos e pintainhos de baixa qualidade (BERCHIERI JÚNIOR, 2001).

No Brasil, o tifo aviário tem sido diagnosticado em áreas de exploração de aves de postura comercial, mas também pode ocorrer em aves reprodutoras para corte e postura (BERCHIERI JÚNIOR, 2000). É uma enfermidade com características de septicemia e toxicemia. Há congestão dos órgãos internos e anemia (ASSOKU *et al.*, 1970b) provocada pela destruição de hemácias pelo sistema reticuloendotelial (ASSOKU & PENHALE, 1970). Nos quadros agudos, as alterações não são muito proeminentes. O fígado e o baço aumentam de 3 a 4 vezes de tamanho (ASSOKU *et al.*, 1970a).

O diagnóstico do tifo aviário baseia-se nos sinais, lesões, isolamento e identificação do agente. Os exames hematológicos são importantes para direcionar

o agente causador desta enfermidade por meio da morfologia dos leucócitos e das hemácias, além de auxiliar no diagnóstico.

Paralelamente ao crescimento da atividade avícola, ocorreu grande desenvolvimento dos métodos de diagnósticos e de profilaxia das doenças aviárias. Entretanto, aspectos básicos relacionados à fisiologia e avaliações clínico laboratoriais foram pouco estudadas. Em diversas enfermidades avícolas, observam-se alterações nos parâmetros hematológicos (KOHAYAGANA *et al.*, 2001).

O emprego da hematologia e da química sanguínea é representativo para estabelecer um diagnóstico definitivo, permitindo orientar e aprofundar a natureza de diversas situações fisiopatológicas que afetam as aves (NORIEGA, 2000).

As células do sistema imunológico das aves dividem-se, de acordo com a morfologia nuclear. Os agranulócitos são constituídos por linfócitos, macrófagos, monócitos e trombócitos. Os granulócitos são constituídos por heterófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos e a morfologia destas células varia de acordo com as espécies aviárias (NORIEGA, 2000; MORGULIS, 2002).

Nas aves os monócitos, macrófagos, heterófilos e linfócitos constituem os componentes celulares das respostas imunológicas (ELSBACH, 1980; POWELL, 1987; MORGULIS, 2002). Os trombócitos são células altamente fagocíticas (CAMPBELL & DEIN, 1984; NORIEGA, 2000), os monócitos possuem capacidade de fagocitar partículas estranhas, mas pouca capacidade regulatória (MORGULIS, 2002) e os macrófagos são considerados a primeira linha de defesa contra os agentes infecciosos sendo fundamentais na regulação da resposta imunológica tanto natural quanto específica (KLASING, 1998; QURESHI, 1998) e participam da inflamação aguda (MORGULIS, 2002).

A principal função dos heterófilos é de fagocitose (MORGULIS, 2002), que se realiza como resposta a um estímulo quimiotático (NORIEGA, 2000) e são importantes mediadores da imunidade natural das aves (HARMON, 1998).

O hematócrito permite avaliar a parte globular em uma amostra de sangue. Baixo índice de hematócrito pode ser observado em doenças agudas ou crônicas, septicemias e doenças hemorrágicas (CAMPBELL & DEIN, 1984).

É importante medir as proteínas plasmáticas no sangue para detectar processos inflamatórios graves (NORIEGA, 2000).

A concentração da hemoglobina é importante para determinar a capacidade de oxigenação tissular que prevalece nos seres vivos (NORIEGA, 2000) e também é importante para classificar um processo anêmico (STURKIE, 1976).

Os índices de Wintrobe (WINTROBE, 1933): hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e volume corpuscular médio (VCM) detectam a presença de anemia e avaliam a capacidade que a medula óssea tem de produzir hemácias de tamanho e capacidade metabólica normais, assim como o conteúdo de hemoglobina.

A anemia nas aves pode ser causada por hemorragia, destruição das hemácias ou diminuição na sua produção. Certas infecções bacterianas como as salmoneloses, podem causar anemia provocada pela destruição de hemácias (CAMPBELL & DEIN, 1984). Estudos de BUXTON (1959, 1960) e ASSOKU *et al.* (1970b) mostraram que durante o curso da infecção na fase aguda da infecção por *S. gallinarum* em galinhas houve severa anemia.

A contagem total de leucócitos é necessária para poder interpretar com maior certeza a natureza de uma infecção viral ou bacteriana quando se associa com a interpretação da contagem diferencial de leucócitos ou também avaliar o estado geral de um animal (NORIEGA, 2000).

A contagem diferencial de leucócitos é de extrema importância para o diagnóstico de doenças aviárias (ANDERSON & STEPHENS, 1970) e em conjunto com a contagem total é possível determinar o diagnóstico de uma maneira mais precisa (NORIEGA, 2000).

Na maioria das espécies das aves, a percentagem de linfócitos é maior que qualquer outro elemento celular compreendendo entre 40 a 70% da contagem total, sendo os heterófilos o segundo grupo. Ao contrário observa-se em avestruz e faisão, onde os mais abundantes são os heterófilos (NORIEGA, 2000).

As leucocitoses geralmente devem-se as heterofilias e suas causas mais comuns são infecções generalizadas que podem ser devido a septicemias causadas por salmonelas (MORGULIS, 2002). A duração ou evolução da doença pode ser estimada por um processo agudo, que geralmente inicia com um desvio característico para esquerda. Com a progressão da doença, o número de formas imaturas diminui, persistindo, porém a leucocitose com a maioria de heterófilos maduros (FERREIRA NETO *et al.*, 1978).

Diante das considerações referidas, o presente estudo foi elaborado com o objetivo de verificar alterações hematológicas que ocorrem durante a fase aguda da infecção causada por *S. gallinarum* em frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, em Descalvado, Estado de São Paulo. Foram utilizados 77 pintainhos (machos e fêmeas) de um dia de idade, com peso médio de 48 gramas, da linhagem Cobb, procedentes de matrizes de corte com idade de 42 semanas. 5 deles foram submetidos a exames sorológico e microbiológico, certificando de serem livres de *S. gallinarum*. O restante foi casualmente distribuído em dois grupos: controle e experimental, contendo 36 aves cada e criados em condições experimentais, tratados "ad libitum" com água clorada e ração comercial.

O inóculo foi preparado com cepa de *Salmonella gallinarum* proveniente de lote de matriz de postura. A cepa bacteriana foi mantida em ágar Nutriente¹ com glicerina tamponada e estocada a 4° C positivos. A cultura foi preparada a partir de uma alçada da cultura pura em 3 mL de caldo BHI¹ (Brain Heart Broth) e incubada a 37° C, durante 24 horas. A cultura continha aproximadamente 1,2 x

¹Difco

10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. Aos 20 dias de idade as aves do grupo experimental foram inoculadas oralmente com 0,4 mL de 10⁸ ufc de *S. gallinarum*.

Aos 24°, 26°, 31°, 38°, 45° e 52° dias de idade das aves, após 4, 6, 11, 18, 25 e 32 dias da inoculação foram colhidas por punção cardíaca amostras de sangue de 5 aves aleatoriamente de cada grupo, para posterior análises hematológicas e sorológica. Para a realização das análises hematológicas, o sangue foi colhido com anticoagulante EDTA² (ácido etilenodiaminotetraacético), na proporção de 0,1 mL para 1,0 mL de sangue.

Os exames hematológicos e sorológico foram realizados em cada uma das aves e foi calculada a média das cinco aves para cada uma das seis colheitas dos dois grupos.

As aves foram pesadas separadamente e foi calculada a média dos pesos de cinco aves para cada uma das seis colheitas dos grupos. Após realização da necrópsia, foram retiradas amostras dos órgãos: fígado, coração e baço para avaliação microbiológica, fazendo-se um "pool" desses órgãos. Para a realização do exame histopatológico, parte destes órgãos foram conservados em solução de formol a 10% em salina 0,85%.

O "pool" de órgãos macerados foram transferidos para dois diferentes caldos de enriquecimento seletivo: Tetrationato-Novobiocina¹ e Rappaport-Vassiliadis¹, na proporção de 1 g e 0,1 g em 10 mL, respectivamente, incubados à 37° e 42° C em estufa bacteriológica durante 24 horas. A partir dos caldos, efetuou-se a semeadura em ágar Verde Brilhante¹ e em ágar Hecktoen¹ e foram incubadas a 37° C, durante 24 horas. As colônias suspeitas foram semeadas em ágar Lisina-Ferro¹, Tríplice Açúcar Ferro¹, uréia¹ e motilidade-indol¹. As amostras compatíveis com salmonela foram submetidas a sorotipificação utilizando-se anti-soros específicos³.

Foram determinadas as seguintes provas hematológicas: hematócrito realizado através do método do microhematócrito, determinação das proteínas plasmáticas efetuada pelo método de refratometria, determinação da hemoglobina realizada através do método cianometahemoglobina, contagem total de hemácias e de leucócitos realizada em hematocitômetro. A contagem diferencial leucocitária e de trombócitos foi realizada através de esfregaços sanguíneos, sem anticoagulante, corados com hematoxilina-eosina (Panótico Rápido LB⁴). Foram determinados valores relativos e absolutos de

linfócitos, heterófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos. Pelas fórmulas padronizadas foram calculados os seguintes índices de Wintrobe: hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e volume corpuscular médio (VCM). A dosagem de hemoglobina foi realizada conforme descrita por CAMPBELL & DEIN (1984) e as demais metodologias hematológicas foram realizadas de acordo com NORIEGA (2000).

Com o soro sanguíneo das aves foi realizada a soraglutinação rápida em lâmina com antígeno comercial⁵ para pulorose.

Para a análise estatística aplicou-se o teste de "Tukeys Studentized Range" (HSD), utilizando programa Statistical Analysis System (SAS 1989-1996), em nível de significância $p < 0,05$. Para os eosinófilos relativos e basófilos relativos foi aplicada uma transformação em log (x). Foi feita transformação em x^2 para: hemácias, leucócitos, linfócitos relativos, heterófilos relativos, monócitos relativos, células atípicas relativas, trombócitos, linfócitos absolutos, heterófilos absolutos, monócitos absolutos, eosinófilos absolutos, basófilos absolutos e células jovens absolutas.

RESULTADOS

As aves do grupo experimental no início da infecção apresentaram sinais de: prostração, apatia, diarreia amarelo-esverdeada e ganho de peso inferior, quando comparadas com as aves do grupo controle. Houve uma diferença estatisticamente significativa na média do peso das aves dos grupos controle e experimental.

Na primeira colheita foi possível visualizar as alterações macroscópicas, mas com o desenvolver da doença, estas foram melhores evidenciadas sendo observada hepatoesplenomegalia, o fígado apresentou-se friável, com presença de pontos esbranquiçados e em algumas aves, tornou-se bronzeado. Surgiram focos brancos no coração, seguidos de pericardite.

Aos 26, 29, 31, 35 e 39 dias de idade morreram 2, 1, 1, 1 e 1 aves do grupo experimental, respectivamente, totalizando um índice de mortalidade de 16,7% durante todo o experimento.

No exame histopatológico, em todos os controles observou-se cortes de: coração, fígado e baço dentro dos padrões de normalidade. Em todos os casos experimentais, observou-se: processo inflamatório cres-

¹Difco

²Analisa Diagnóstica

³Sanofi Diagnostics Pasteur

⁴Laborclin

⁵Intervet

cente no parênquima hepático e no miocárdio e pericárdio caracterizados por infiltrado linfocitário e heterofílico e focos de necrose. Nos fragmentos de baço, em todos os cortes observou-se hiperplasia da polpa branca e vermelha. \

A sorologia rápida foi negativa em todas as amostras de sangue em todas colheitas das aves do grupo controle. Apresentou-se positiva nas aves do grupo experimental a partir da 3ª colheita realizada após 11 dias da inoculação, permanecendo positiva até a última realizada 32 dias após a inoculação.

Em todas as amostras das colheitas do grupo controle o isolamento bacteriológico para *S. gallinarum* foi negativo e nas aves do grupo experimental foi positivo a partir da 1ª colheita, realizada após 4 dias da inoculação. Esta positividade persistiu até a 6ª colheita.

Os resultados das médias das 5 aves dos grupos controle e experimental para cada uma das 6 colheitas estão apresentados nas Tabelas de 1 a 6.

Os valores normais descritos no presente trabalho foram baseados em resultados de hemogramas considerados normais em galinhas citados por LUCAS & JAMROZ (1961) e NORIEGA (2000). Os valores do grupo controle obtidos neste experimento, foram considerados normais e também usados como base para comparar com os resultados das aves infectadas.

As aves com tifo aviário apresentaram anemia e leucocitose com heterofilia, indicando que as alterações no sangue são fatores significativos na etiologia da doença.

Durante a fase aguda da infecção, os valores de hematócrito no grupo experimental diminuíram e começaram a normalizar a partir da 5ª colheita, havendo diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle.

Apesar dos valores das proteínas plasmáticas do grupo controle e grupo experimental estarem dentro da normalidade, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pois a proteína plasmática do grupo experimental apresentou valores mais elevados que os do grupo controle. Os valores do grupo experimental começaram a diminuir a partir da 5ª colheita, apresentando-se inferior ao valor do grupo controle na 6ª colheita.

Os valores da concentração da hemoglobina das aves infectadas apresentaram-se bem inferiores aos das aves controle em todas as colheitas, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

No início da infecção, quatro dias após a inoculação, o número de hemácias na circulação diminuiu bruscamente e foi se elevando gradativamente nas colheitas seguintes, existindo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O valor do índice de VCM apresentou-se elevado nas aves do grupo experimental quando comparado com o grupo controle, havendo diferença es-

taticamente significativa entre os grupos. O valor do índice de CHCM apresentou-se inferior nas aves do grupo experimental, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O valor do índice de HCM apresentou-se elevado nas aves do grupo experimental apenas na 1ª, 2ª e 3ª colheitas, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O número de leucócitos apresentou-se elevado logo no início da infecção, atingiu um pico na 4ª e na 5ª colheitas e começou a declinar após a 5ª colheita, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O número relativo de linfócitos diminuiu durante a infecção e apresentou-se dentro dos parâmetros normais na 6ª colheita, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O número relativo de heterófilos aumentou durante a infecção e a partir da 4ª colheita começou a declinar, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Os monócitos, eosinófilos e basófilos não apresentaram alterações em seus números relativos durante o experimento, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Houve presença de células imaturas na circulação sanguínea, predominando heterófilos não segmentados, observando-se assim um desvio para a esquerda. Essas células imaturas designamos como células jovens no presente estudo, que aumentaram no decorrer da infecção. Tiveram um pico na 3ª colheita e começaram a declinar, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Foram observados trombócitos agrupados nos esfregaços sanguíneos das aves do grupo experimental e o número destes aumentou no decorrer da infecção, atingiu um pico máximo na 4ª colheita e começou a declinar, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O número absoluto de linfócitos apresentou-se inferior durante a infecção quando comparado ao grupo controle e começou a elevar-se a partir da 3ª colheita, havendo diferença significativa entre os grupos.

O número absoluto de heterófilos apresentou-se elevado durante a infecção quando comparado com o grupo controle, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O número absoluto de monócitos, eosinófilos e basófilos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos durante o experimento.

O número absoluto de células jovens apresentou-se elevado durante a infecção em comparação ao grupo controle, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 1 - Valores hematológicos obtidos das médias de 5 aves do grupo controle em cada uma das 6 colheitas realizadas, demonstrando as médias do peso em gramas e dos valores numéricos de: hematócrito/% (Ht), proteínas plasmáticas/g/dl (PP), hemoglobina/g/dL (Hb), hemácias/10⁶mL (Hm), volume corpuscular médio/fl (VCM), concentração da hemoglobina corpuscular média/g/dL (CHCM) e hemoglobina corpuscular média/pg (HCM).

Colheitas	Idade Dias	Peso g	Ht %	PP g/dl	Hb g/dL	Hm 10 ⁶ mL	VCM fl	CHCM g/dL	HCM pg
1 ^a	24	619,2	32,0	3,68	8,39	2,37	34,98	26,27	35,41
2 ^a	26	738,0	30,6	3,32	8,46	2,27	134,61	27,67	37,22
3 ^a	31	980,8	32,0	3,04	8,39	2,29	140,48	26,24	36,80
4 ^a	38	1231,6	34,2	3,34	8,46	2,32	147,21	24,90	36,44
5 ^a	45	1714,0	34,4	3,40	8,39	2,37	144,82	24,48	35,88
6 ^a	52	1980,8	37,0	3,04	8,39	2,31	160,09	22,72	36,32

Tabela 2 - Valores hematológicos obtidos das médias de 5 aves do grupo experimental em cada uma das 6 colheitas realizadas, demonstrando as médias do peso em gramas e dos valores numéricos de: hematócrito/% (Ht), proteínas plasmáticas/g/dL (PP), hemoglobina/g/dL (Hb), hemácias/10⁶mL (Hm), volume corpuscular médio/fl (VCM), concentração da hemoglobina corpuscular média/g/dL (CHCM) e hemoglobina corpuscular média/pg (HCM).

Colheitas	Idade Dias	Peso g	Ht %	PP g/dL	Hb g/dl	Hm 10 ⁶ mL	VCM fl	CHCM g/dL	HCM pg
1 ^a	24	507,2	25,2	4,54	5,59	0,78	374,57	22,61	80,66
2 ^a	26	500,8	23,4	3,44	4,99	1,16	204,54	21,79	43,55
3 ^a	31	636,8	23,2	4,02	4,99	1,22	189,62	21,68	40,87
4 ^a	38	842,0	26,8	5,24	4,65	1,36	213,31	17,36	36,05
5 ^a	45	1311,2	31,4	5,10	5,39	1,59	200,85	17,45	35,30
6 ^a	52	1764,4	35,4	2,94	6,99	1,88	191,93	19,76	36,44

Tabela 3 - Valores hematológicos obtidos das médias de 5 aves do grupo controle em cada uma das 6 colheitas realizadas, demonstrando as médias dos valores numéricos de leucócitos/10³mL (Leu) e de trombócitos/10³mL (Tro) e dos valores relativos de: linfócitos/% (Lin), heterófilos/% (Het), monócitos/% (Mon), eosinófilos/% (Eos), basófilos/% (Bas) e células jovens/% (CJ).

Colheitas	Idade Dias	Leu 10 ³ mL	Linf %	Het %	Mon %	Eos %	Bas %	CJ %	Tro 10 ³ mL
1 ^a	24	17,32	63,8	31,8	4,0	0,2	0,2	0	29,4
2 ^a	26	13,92	60,4	35,6	4,0	0	0	0	26,8
3 ^a	31	15,88	58,8	37,8	3,2	0,2	0	0	26,6
4 ^a	38	19,92	60,2	35,6	3,6	0	0,6	0	30,2
5 ^a	45	28,72	56,8	38,0	4,8	0,2	0,2	0	28,4
6 ^a	52	23,16	59,6	35,0	5,0	0,2	0,2	0	29,6

Tabela 4 - Valores hematológicos obtidos das médias de 5 aves do grupo controle em cada uma das 6 colheitas realizadas, demonstrando as médias dos valores absolutos de: linfócitos/mL (Lin), heterófilos/mL (Het), monócitos/mL (Mon), eosinófilos/mL (Eos), basófilos/mL (Bas) e células jovens/mL (CJ).

Colheitas	Idade Dias	Lin mL	Het mL	Mon mL	Eos mL	Bas mL	CJ mL
1 ^a	24	11046	5522	674	44	34	0
2 ^a	26	8466	4882	572	0	0	0
3 ^a	31	9194	6176	482	28	0	0
4 ^a	38	12096	6984	734	0	106	0
5 ^a	45	16290	10938	1370	64	58	0
6 ^a	52	13834	8076	1162	44	44	0

Tabela 5 - Valores hematológicos obtidos das médias de 5 aves do grupo experimental em cada uma das 6 colheitas realizadas, demonstrando as médias dos valores numéricos de leucócitos / 10³ml (Leu) e de trombócitos / 10³ml (Tro) e dos valores relativos de: linfócitos / % (Lin), heterófilos / % (Het), monócitos / % (Mon), eosinófilos / % (Eos), basófilos / % (Bas) e células jovens / % (CJ).

Colheitas	Idade Dias	Leu 10 ³ ml	Lin %	Het %	Mon %	Eos %	Bas %	CJ %	Tro 10 ³ ml
1 ^a	24	24,80	20,2	64,0	5,4	0	0,6	9,8	45,0
2 ^a	26	36,88	19,6	67,2	3,2	0	0,4	9,6	40,0
3 ^a	31	39,60	10,4	60,4	2,2	0,6	0	26,4	67,6
4 ^a	38	91,94	14,8	68,6	2,6	0	0,4	13,6	94,2
5 ^a	45	93,80	20,0	59,8	6,8	0	0	13,4	76,6
6 ^a	52	50,28	35,6	52,8	6,0	0	0,2	5,4	52,4

Tabela 6 - Valores hematológicos obtidos das médias de 5 aves do grupo experimental em cada uma das 6 colheitas realizadas, demonstrando as médias dos valores absolutos de: linfócitos / mL (Lin), heterófilos / mL (Het), monócitos / mL (Mon), eosinófilos / mL (Eos), basófilos / mL (Bas) e células jovens / mL (CJ).

Colheitas	Idade Dias	Lin mL	Het mL	Mon mL	Eos mL	Bas mL	CJ mL
1 ^a	24	5028	15954	1320	0	120	2378
2 ^a	26	7118	24864	1184	0	166	3548
3 ^a	31	3308	21696	714	236	0	13646
4 ^a	38	13316	62628	2358	0	380	12958
5 ^a	45	18290	56148	6318	0	0	13044
6 ^a	52	17396	26810	2864	0	56	3154

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Verificou-se uma redução nos valores do hematócrito das aves do grupo experimental nas quatro primeiras colheitas, correspondentes ao pico da infecção. Estes valores apresentaram-se abaixo dos valores normais, indicando um processo anêmico. A partir da 5^a colheita, o valor do hematócrito começou a normalizar-se coincidindo com o início da recuperação das aves. POMEROY & NAGARAJA (1991) confirmaram que aves inoculadas experimentalmente *S. gallinarum* tiveram valor do hematócrito alterado, apresentando anemia.

O número total de hemácias apresentou uma queda brusca de 67% nas aves doentes após quatro dias da inoculação com *S. gallinarum*. Entretanto, a medida que as aves foram se recuperando os valores numéricos das hemácias do grupo experimental foram aumentando gradativamente. A concentração da hemoglobina das aves do grupo experimental apresentou-se inferior ao valor normal de referência e também quando comparada com as aves do grupo controle.

Os valores do VCM apresentaram-se elevados durante toda a infecção, indicando macrocitose. Os valores do CHCM apresentaram-se diminuídos durante todo o experimento. Os valores do HCM

apresentaram-se elevados nas três primeiras colheitas e diminuíram nas colheitas seguintes, indicando hipocromia. Estas estimativas juntamente com a visualização em lâminas indicaram anemia macrocítica e hipocrômica. NORIEGA (2000) citou que a macrocitose é indicativa de alterações na maturação celular da medula óssea.

ASSOKU *et al.* (1970b) reportaram alterações hematológicas em galinhas com tifo aviário. Durante a fase aguda da infecção, verificaram queda de 50% no valor do hematócrito, diminuição súbita nos níveis da concentração da hemoglobina, perda repentina no número de hemácias, coincidindo com o pico da infecção. O valor do VCM foi quase que dobrado durante a infecção, o valor do HCM também teve um aumento similar e o índice de CHCM não teve seu valor alterado. Estas estimativas indicaram uma anemia macrocítica e normocítica, com evidências de policromasia. A severa anemia foi marcada pela presença de reticulocitose. Exames histopatológicos revelaram hiperplasia da medula óssea e eritropoiese extramedular no fígado e baço, confirmando aumento da atividade eritropoiética. Portanto, concluíram que a anemia observada não foi devido a inibição da atividade hematopoiética e sim pela destruição das hemácias.

Durante a infecção aguda nas aves causada por *S. gallinarum*, ASSOKU *et al.* (1970a) observaram severa

anemia juntamente com reticulocitose e hepatoesplenomegalia. Estas mudanças são consequências do aumento da destruição extravascular das hemácias e não devido a inibição da atividade hematopoiética. Verificaram diminuição nos índices da concentração de hemoglobina, hematócrito e na contagem total de hemácias das aves infectadas.

ASSOKU & PENHALE (1974), durante a fase aguda do tifo aviário verificaram uma severa anemia hemolítica, com perda de mais de 70% do total das hemácias da circulação sanguínea.

No presente trabalho, a contagem global de leucócitos do grupo experimental aumentou gradativamente durante a infecção por *S. gallinarum*, obteve um pico na 4ª e 5ª colheitas, entre 18 e 25 dias após a infecção e a partir daí, o número de leucócitos começou a diminuir, indicando que a infecção estava cessando. A medida que as aves foram recuperando-se, o estímulo à medula óssea passa a ser menos intenso até cessar, ocasião em que a contagem leucocitária volta a seus valores referenciais. Estes resultados estão de acordo com ASSOKU *et al.* (1970b); ALLAN & DUFFUS (1971) e KOKOSHAROV (1998) que observaram leucocitose e heterofilia nas aves com tifo aviário.

Os heterófilos são importantes na inflamação e na imunidade das aves (HARMON, 1998). O presente estudo mostrou claramente a importância dos heterófilos durante a infecção por bactéria. O número relativo de heterófilos aumentou rapidamente logo no início da infecção, permaneceu elevado durante todo o experimento e começou a diminuir na última colheita quando as aves começaram a se recuperar.

Foi verificado aparecimento de células jovens na circulação sanguínea das aves infectadas com *S. gallinarum*, apresentando um pico após 11 dias da inoculação e foi diminuindo gradativamente conforme as aves foram se recuperando. Provavelmente estas células jovens são da linhagem heterofílica, sendo que neste caso há forte solicitação medular e este quadro é característico de infecção bacteriana. A percentagem dos mielócitos (células jovens) acentuou no quarto dia após a infecção com *S. gallinarum* em experimento realizado por KOKOSHAROV (1998).

O número relativo de linfócitos do grupo experimental diminuiu. Este resultado está de acordo com ASSOKU *et al.* (1970b), onde o número de linfócitos encontrados foi inferior ao nível dos valores normais. Entretanto, ALLAN & DUFFUS (1971) não verificaram linfopenia nas aves com tipo aviário.

WILSON (1946) e RUSOV & DUKIC (1980) verificaram que o aparecimento dos sintomas letais do tifo aviário é acompanhado de leucocitose, heterofilia, linfopenia, granulocitose imatura e diminuição do número de hemácias.

Os valores percentuais de monócitos, eosinófilos e basófilos nas aves dos grupos controle e experimental

no presente trabalho permaneceram dentro dos valores normais, o que também foi observado em estudos de ALLAN & DUFFUS (1971) e KOKOSHAROV (1998).

As alterações dos parâmetros hematológicos sanguíneos foram evidentes entre os grupos durante toda a infecção por *S. gallinarum* em frangos de corte, demonstrando ser uma infecção aguda que, em concordância com FERREIRA NETO *et al.* (1978) e MORGULIS (2002), um processo infeccioso agudo geralmente é iniciado com um característico desvio para a esquerda, com presença de células jovens. Evidenciamos também diferenças nos sinais clínicos, no exame bacteriológico e anatomopatológico, logo após a 1ª colheita aos 4 dias após a inoculação com *S. gallinarum*. O exame sorológico apresentou-se positivo a partir da 3ª colheita aos 11 dias após a inoculação, quando comumente evidenciam-se os níveis de anticorpos séricos (GAST & BEARD, 1991). Os parâmetros hematológicos e demais exames realizados começaram a se normalizar a partir da 6ª colheita, após 32 dias da inoculação quando as aves começaram a se recuperar.

O índice de mortalidade das aves infectadas foi de 16,7% durante todo o experimento. Este índice baixo pode ser devido a baixa virulência da cepa bacteriana e da resistência das aves utilizadas.

No presente experimento foi observado agrupamentos de trombócitos e aumento de seu número. Conforme NORIEGA (2000), agrupamentos destas células indicam a presença de uma enfermidade septicêmica ou um processo inflamatório. O grande número de trombócitos presentes no sangue revela que estas células são importantes na imunidade das aves contra vários patógenos que poderão alcançar a corrente circulatória (MORGULIS, 2002). Entretanto, ASSOKU *et al.* (1970b) encontraram níveis de trombócitos abaixo dos valores normais em aves com tifo aviário.

Os valores da proteína plasmática das aves infectadas não excedeu o valor normal, embora NORIEGA (2000) citou que se esse valor é aumentado, pode ser devido a um processo inflamatório em que aumenta a quantidade de globulinas, como ocorre durante infecções bacterianas. Entretanto, os valores das aves do grupo experimental apresentaram-se mais elevados quando comparados com os valores das aves do grupo controle, o que pode indicar processo inflamatório causado por bactéria.

Os resultados do presente estudo confirmaram as descrições dos parâmetros hematológicos reportados por outros autores, determinando mudanças hematológicas, a natureza e a severidade da anemia que ocorre durante a fase aguda da infecção causada pela *S. gallinarum*. Estas observações indicam que a anemia é um importante sinal na síndrome da doença. A severidade da anemia foi refletida pela acentuada queda no número de hemácias, diminuição na concentração de hemoglobina e no valor do hematócrito,

juntamente com hiperplasia da medula óssea indicada pela acentuada leucocitose com presença de células jovens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, D. & DUFFUS, W.P. The immunopathology in fowls (*Gallus domesticus*) of acute and subacute *Salmonella gallinarum* infection. *Res. Vet. Sci.*, v.12, p.140-151, 1971.
- ANDERSON, E.L. & STEPHENS, J.F. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with *Salmonella*. *Appl. Microbiol.*, v.19, n.5, p.726-730, 1970.
- ASSOKU, R.; PENHALE, W.; BUXTON, A. An immunological basis for the anaemia of acute *Salmonella gallinarum* infection of chicken. I. Haematological changes and their association with *in vivo* modification of the erythrocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, v.7, p.865-874, 1970a.
- ASSOKU, R.K. & PENHALE, W.J. An immunological basis for the anaemia of acute *Salmonella gallinarum* infection of chicken. II. The relationship of the immune response to the development of the haemolytic anaemia. *Clin. Exp. Immunol.*, v.7, p.875-883, 1970.
- ASSOKU, R.K.G.; PENHALE, W.J.; BUXTON, A. Haematological changes in acute experimental *Salmonella gallinarum* infection in chickens. *J. Comp. Pathol.*, v.80, p.473-485, 1970b.
- ASSOKU, R.K.G. & PENHALE, W.J. The pathogenesis of fowl typhoid: the influence of anaemia and erythrocyte clearance on the susceptibility of the fowl to bacterial endotoxin. *J. Comp. Pathol.*, v.84, p.443-453, 1974.
- BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.) *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.185-195.
- 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, p.221-231, 2001.
- BUXTON, A. The *in vivo* sensitization of avian erythrocytes with *Salmonella gallinarum* polysaccharide. *Immunology*, v.2, p.203, 1959.
- BUXTON, A. Pathological changes in the blood of chickens infected with *Salmonella gallinarum*. *J. Comp. Pathol.*, v.70, p.175, 1960.
- CAMPBELL, T.W. & DEIN, F.J. Avian Hematology. The Basics. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.14, n.2, p.223-248, 1984.
- ELSBACH, P. Degradation of microorganisms by phagocytic cells. *Rev. Infect. Dis.*, v.2, p.106-128, 1980.
- FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. *Patologia Clínica Veterinária*. Belo Horizonte: Rabelo e Brasil, 1978. 293p.
- GAST, R.K. & BEARD, C.W. Detecção de anticorpos específicos para salmonela sorogrupo D na gema de ovos produzidos por galinhas infectadas com *Salmonella Enteritidis*. *Poultry Sci.*, v.70, p.1273-1276, 1991.
- HARMON, B.G. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Sci.*, v.77, p.972-977, 1998.
- KLASING, K.C. Avian macrophages: regulators of local and systemic immune responses. *Poultry Sci.*, v.77, p.983-989, 1998.
- KOHAYAGANA, A.; SAUKAS, T.N.; BORETTI, L.P.; BORSA, A.; KUIBIDA, K. Valores hematológicos em frangos de corte de criação industrial no Estado de São Paulo. *Rev. Bras. de Ciênc. Av.*, Campinas: FACTA. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Prêmio José Maria Lamas da Silva, supl.3, p.82, 2001.
- KOKOSHAROV, T. Changes in the white blood cells and specific phagocytosis in chicken with experimental acute fowl typhoid. *Vet. Arh.*, v.68, p.33-38, 1998.
- LUCAS, A.M. & JAMROZ, C. *Atlas of Avian Haematology*. Washington, DC: U.S.D.A., 1961. (Monograph, 25).
- MORGULIS, M.S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds.) *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. 375p.
- NORIEGA, M.L.V.C. *Apuntes de hematología aviar*. México: Universidad Nacional Autónoma, 2000. 70p. (Apostila).
- POMEROY, B.S. & NAGARAJA, K.V. Fowl typhoid. In: CALNAK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; YODER, H.W. (Eds.). *Diseases of poultry*. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p.87-99.
- POWELL, P.C. Immune mechanisms in infections of poultry. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.15, p.87-113, 1987.
- QURESHI, M.A. Role of macrophages in avian health and disease. *Poultry Sci.*, v.77, p.978-982, 1998.
- RUSOV, G. & DUKIC, B. Dijagnosticki zanacaj citomorfoloske dijagnosticke akutne salmoneloze zivine. *Veterinaria*, Sarajevo, v.29, p.289-292, 1980.
- SAS System for windows (Programa), Release 6, 12. Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina USA 27513.
- STURKIE, P.D. Blood: Physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. In: STURKIE, P.D. *Avian Physiology*. New York: Springer-Verlag, 1976. p.53-75.
- WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of eritrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.*, Leipzig, v.51, p.31, 1933.
- WILSON, J.E. Fowl typhoid: Certain aspects of experimentally produced disease. *Vet. Rec.*, v.58, p.269-272, 1946.

Recebido em 29/10/02

Aceito em 2/1/03